

<p align="center"><b>MINISTERE DU COMMERCE</b></p>
--

**Arrêté du 4 Chaoual 1435 correspondant au 31 juillet 2014 rendant obligatoire la méthode utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.**

-----

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 14-154 du 5 Rajab 1435 correspondant au 5 mai 2014 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

**Arrête :**

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.

Art. 2. — Pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Chaoual 1435 correspondant au 31 juillet 2014.

Amara BENYOUNES.

-----

ANNEXE

**Méthode utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive**

La présente méthode spécifie une technique pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies obtenues en milieu solide (milieu au plasma de lapin et au fibrinogène) après incubation en aérobie à 35° C ou 37° C.

**1. TERMES ET DEFINITIONS**

Pour les besoins de la présente méthode, les termes et définitions suivants s'appliquent.

**1.1 Staphylocoques à coagulase positive**

Bactéries formant des colonies caractéristiques en milieu sélectif gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène, lorsque l'essai est effectué selon la technique spécifiée dans la présente méthode.

## 1.2 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 technique spécifiée dans la présente méthode.

## 2. PRINCIPE

**2.1** Ensemencement en profondeur du milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène, coulé dans deux boîtes de Petri, 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 ou de la suspension mère, à raison de deux boîtes par dilution.

**2.2** Incubation de ces boîtes à 35° C ou 37° C pendant 18 h à 24 h et, si nécessaire, 24 h supplémentaires.

**2.3** A partir du nombre de colonies caractéristiques par boîte de Petri, calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

## 3. DILUANT ET MILIEUX DE CULTURE

### 3.1 Diluant

Se conformer aux règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

### 3.2 Milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène.

**NOTE-** Des milieux commercialisés conformes aux spécifications de la présente méthode peuvent être utilisés. Cependant, en raison de la variabilité constatée des lots de fabrication du supplément, il est recommandé de tester, avant utilisation, chaque lot de solution de fibrinogène bovin et de plasma de lapin en effectuant des contrôles positifs et négatifs.

#### 3.2.1 Milieu de base

Voir la méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*staphylococcus aureus* et autres espèces) technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker, à l'exception de la répartition du milieu de base, à raison de 90 ml par flacon.

## 3.2.2 Solutions

### 3.2. 2.1 Solution de tellurite de potassium

Préparer la solution de tellurite de potassium comme indiqué dans la méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*staphylococcus aureus* et autres espèces), technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.

### 3.2.2.2 Solution de fibrinogène bovin

#### 3.2.2.2.1 Composition

Fibrinogène bovin..... 5g à 7g  
(Selon la pureté du fibrinogène bovin).

Eau stérile..... 1 00 ml

#### 3.2.2.2.2 Préparation

En opérant aseptiquement, dissoudre le fibrinogène bovin dans l'eau, juste avant l'utilisation.

### 3.2.2.3 Solution de plasma de lapin et d'inhibiteur de trypsine

#### 3.2.2.3.1 Composition

Plasma de lapin avec EDTA pour coagulase (plasma coagulase EDTA)..... 30 ml

Inhibiteur de trypsine..... 30 mg

#### 3.2.2.3.2 Préparation

En opérant aseptiquement, dissoudre les composants dans l'eau, juste avant l'utilisation.

### 3.2.3 Milieu complet

#### 3.2.3.1 Composition

Milieu de base (3.2.1 )..... 90 ml

Solution de tellurite de potassium (3.2. 2.1 )..... 0,25 ml

Solution de fibrinogène bovin (3.2.2.2)..... 7,5 ml

Solution de plasma de lapin et d'inhibiteur de trypsine (3.2.2.3)..... 2,5 ml

#### 3.2.3.2 Préparation

Faire fondre le milieu de base, puis le laisser refroidir à 48° C ± 1° C dans un bain d'eau (4.3).

Ajouter de façon aseptique les trois solutions, préalablement réchauffées à 48° C ± 1° C dans un bain d'eau et, après chaque addition, mélanger soigneusement par rotation, afin de minimiser la formation de mousse.

Utiliser le milieu complet immédiatement après sa préparation, afin d'éviter une précipitation du plasma.

**NOTE-** En cas d'utilisation d'une solution commercialisée de fibrinogène bovin et de plasma de lapin, respecter scrupuleusement les instructions du fabricant pour la préparation de cette solution et du milieu complet (notamment la température du milieu de base). Sinon, le milieu peut perdre complètement son activité.

### 3.3 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Voir la méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (staphylococcus aureus et autres espèces), technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.

## 4. APPAREILLAGE ET VERRERIE

**NOTE-** 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 et, en particulier, ce qui suit :

**4.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave) ;**

**4.2 Etuve**, permettant de maintenir les milieux inoculés, les boîtes et les flacons à l'intérieur d'une plage de températures de  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ou  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**4.3 Bain d'eau**, ou dispositif similaire, réglable à  $48^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**4.4 Boîtes de Petri**, stériles, en verre ou en matière plastique.

**4.5 Pipettes graduées à écoulement total**, de 1 ml, 2 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml, 0,1 ml et 0,5 ml.

## 5. ECHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

## 6. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

## 7. MODE OPERATOIRE

### 7.1 Prise d'essai, suspension mère et dilution

Voir la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique .

## 7.2 Ensemencement et incubation

**7.2.1** Prendre deux boîtes de Petri stériles (4.4). A l'aide d'une pipette stérile (4.5), transférer dans chacune des boîtes 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre deux autres boîtes de Petri stériles, transférer dans chacune des boîtes 1 ml de la première dilution décimale.

Répéter ces opérations avec des dilutions successives, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution décimale.

**7.2.2** Couler, dans chacune des deux boîtes de Petri (7.2.1), le milieu complet (3.2.3) utilisé extemporanément (ne pas le maintenir en surfusion), de façon à obtenir une épaisseur d'environ 3 mm.

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

**7.2.3** Après solidification complète, retourner les boîtes ainsi préparées et les faire incuber à l'étuve (4.2) réglée à  $35^{\circ}\text{C}$  ou  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 18 h à 24 h et, si nécessaire, réincuber pendant 18 h à 24 h supplémentaires.

## 7.3 Comptage des colonies

Après une période d'incubation (7.2.3), les staphylocoques forment de petites colonies noires ou grises ou même blanches, entourées d'un halo de précipitation indiquant une activité de coagulase. Des colonies de *proteus* peuvent présenter en début d'incubation un aspect similaire à celui des colonies de staphylocoques à coagulase positive. Cependant, après 24 h ou 48 h d'incubation, elles prennent un aspect de culture en nappe plus ou moins brunâtre et envahissante qui permet de ne pas les confondre avec les staphylocoques.

Procéder au comptage des colonies caractéristiques pour chaque boîte.

**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.

## 8. EXPRESSION DES RESULTATS

### 8.1 Cas général

Retenir celles des boîtes qui contiennent 300 colonies au maximum, dont 100 colonies caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme, au moins, 15 colonies caractéristiques.

Calculer le nombre  $N$  de staphylocoques à coagulase positive présents par millilitre ou par gramme de produit en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Où :

$\sum C$  : Somme des colonies de staphylocoques caractéristiques sur l'ensemble des boîtes retenues ;

$V$  : Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

$n_1$  : Nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

$n_2$  : Nombre de boîtes retenues à la seconde dilution ;

$d$  : Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (la suspension mère est une dilution).

Arrondir à deux chiffres significatifs les résultats obtenus.

Noter le résultat comme étant le nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre (produit liquide) ou par gramme (autre produit), exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par  $10^x$ , où  $x$  est la puissance appropriée de 10.

### EXEMPLE

Un dénombrement d'un produit après ensemencement avec 0,1 ml de produit a donné les résultats suivants :

— à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ) : 66 colonies caractéristiques et 54 colonies caractéristiques ;

— à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ) : 4 colonies caractéristiques et 7 colonies caractéristiques ;

$$N = \frac{66 + 54 + 4 + 7}{2,2 \times 10^{-2}} = 5955$$

Le résultat, après arrondissement, est  $6 \times 10^{-3}$ .

### 8.2 Estimation de petits nombres

**8.2.1** Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), contiennent chacune moins de 15 colonies, exprimer le résultat comme suit :

a) pour les produits liquides, nombre estimé de staphylocoques à coagulase positive par millilitre :

$$N_e = \frac{C}{2}$$

Où :

$C$  : Somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive comptées (7.3) sur les deux boîtes retenues ;

b) pour les autres produits, nombre estimé de staphylocoques à coagulase positive par gramme :

$$N_e = \frac{C}{2 \times d}$$

Où :

$C$  : Somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive comptées (7.3) sur les deux boîtes retenues ;

$d$  : Taux de dilution de la suspension mère.

**8.2.2** Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), ne contiennent aucune colonie de staphylocoques à coagulase positive, exprimer le résultat comme suit :

— moins de 1 staphylocoque à coagulase positive par millilitre (produits liquides) ;

— moins de  $1/d$  staphylocoque à coagulase positive par gramme (autres produits), où  $d$  est le taux de dilution de la suspension mère.

## 9. FIDELITE

### 9.1 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants (nombre de staphylocoques à coagulase positive par gramme ou par millilitre, transformés en  $\log_{10}$ ) ou le rapport, sur une échelle normale, entre le plus élevé et le plus bas des deux résultats d'essai obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un intervalle de temps le plus court possible, n'excédera que dans 5% des cas au plus la limite de répétabilité.

### 9.2 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels (nombre de staphylocoques à coagulase positive par gramme ou par millilitre, transformés en  $\log_{10}$ ) ou le rapport, sur une échelle normale, entre le plus élevé et le plus bas des deux résultats d'essai obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera que dans 5% des cas au plus la limite de reproductibilité.