AVANT-PROJET DE RÉSOLUTION
OENO-MICRO 19-662O Et3

DÉNOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES À COAGULASE POSITIVE

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU l'article 2, paragraphe iv, de l'Accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

CONSIDÉRANT les travaux du Groupe d'experts « Microbiologie »,

CONSIDÉRANT les travaux de la Sous-commission « Méthodes d'analyses » sur l'élaboration de méthodes d'analyse pour le jus de raisin, le jus de raisin concentré, le jus de raisin reconstitué et le nectar de raisin,

CONSIDÉRANT le projet de résolution OENO-SCMA 19-662L, qui fait référence à des méthodes pour l'analyse microbiologique du jus de raisin, du jus de raisin concentré, du jus de raisin reconstitué et du nectar de raisin, telles qu'indiquées dans le tableau ci-après :

Détection et comptage des colonies de microorganismes aérobies à 30 °C	UNE-EN ISO 4833-1:2014 / UNE-EN ISO 4833-2:2014
Détection et comptage des colonies de coliformes à 30 °C	ISO 4832:2006
Détection et comptage des colonies d'*Escherichia coli* □-glucuronidase positives	ISO 16649-2:2001
Détection et comptage des colonies de staphylocoques *à* coagulase-positive	UNE-EN ISO 6888-1:2000 / UNE-EN ISO 6888-2:2000

CONSIDÉRANT que le projet de résolution OENO-SCMA 19-662L doit être retiré de la procédure par étapes de l'OIV et être remplacé par des projets de résolution décrivant les méthodes individuelles,

SUR PROPOSITION du Groupe d'experts « Microbiologie »,

DÉCIDE d'adopter la méthode d'analyse microbiologique suivante pour le jus de raisin, le jus de raisin concentré, le jus de raisin reconstitué et le nectar de raisin :

DÉNOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES À COAGULASE POSITIVE

1. **Domaine d'application**

Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les jus par comptage des unités formant colonies en milieu solide.

2. Principe

Les staphylocoques à coagulase positive se développent de manière caractéristique à 37 °C en milieu sélectif solide au plasma de lapin et au fibrinogène bovin mettant en évidence l'activité coagulase. Le nombre de staphylocoques coagulase positive par millilitre d'échantillon est calculé à partir des colonies ainsi obtenues.

3. Réactifs

3.1 Eau peptonée tamponnée (EPT)

Peptone de caséine	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogénophosphate de disodium dodécahydraté ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	9,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,5 g
Eau	1000 mL

Dissoudre en chauffant et en agitant.
Ajuster à pH 7,0 ± 0,2 à 25 °C.
Répartir 9 mL en tubes avec bouchon vissé.
Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

3.2 Gélose RPF (plasma de lapin et fibrinogène)

3.2.1 Milieu de base

Triptone	10,00 g
Extrait de viande	5,00 g
Extrait de levure	1,00 g
Pyruvate de sodium	10,00 g
Glycine	12,00 g
Chlorure de lithium	5,00 g
Agar-agar	12 à 22 g
Eau	1000 mL

Dissoudre en chauffant et en agitant.
Ajuster à pH 7,2 ± 0,2 à 25 °C.
Répartir à hauteur de 90 mL par bouteille ou fiole.

Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.
Maintenir à 45 °C ± 2 °C.
3.2.2 Supplément lyophilisé (pour 90 mL de milieu de base)

Plasma de lapin-EDTA	2,5 mL
Fibrinogène bovin	0,5 g
Trypsine (inhibiteur)	2,5 mg
Tellurite de potassium	2,5 mg

Reconstituer avec 10 mL d'eau stérile préchauffée à 37 °C.
Additionner au milieu de base en conditions aseptiques.

4. Matériel et appareillage

4.1. Flacons en verre avec bouchon vissé de 500 mL
4.2 Pipettes graduées de 1 mL de classe A ou pipette automatique
4.3 Tubes à essai avec bouchon vissé
4.4 Autoclaves, 121 °C ± 3 °C
4.5 Bain-marie à 45 °C ± 2 °C
4.6 Étuve de culture réglée à 37 °C ± 1 °C
4.7 Étuve de stérilisation à 170 °C ± 10 °C pour la préparation du matériel stérile
4.8 pH-mètre
4.9 Agitateur magnétique chauffant
4.10 Balance à fléaux d'une précision de ± 0,01 g
4.11 Boîtes de Petri de 90 mm de diamètre, stériles
4.12 Loupe pour le comptage des colonies
4.13 Portoirs
4.14 Cabines à flux laminaire ou bec Bunsen pour travailler en conditions de stérilité

5. Préparation des échantillons

Le jus étant une matrice liquide, il peut être ensemencé directement.
5.1 Préparation des dilutions décimales
Prélever 1 mL de jus et le diluer dans un tube avec 9 mL d'EPT ; il s'agit de la dilution à 10^{-1}.

Répéter l'opération en prélevant 1 mL de la dilution à 10^{-1} et en la diluant dans 9 mL

d'EPT ; il s'agit de la dilution à 10^{-2}. Procéder de cette manière autant de fois que nécessaire en fonction de la charge microbienne du jus.

6. Analyses

Ensemencer au moins deux boîtes de Petri par échantillon, soit de dilutions successives, soit deux boîtes de la même dilution.

Remarque 1 : L'ensemencement peut être réalisé en double afin d'augmenter le degré de confiance dans les résultats, en ensemençant deux boîtes de Petri par dilution dans deux dilutions successives et en procédant au comptage final sur quatre boîtes.

6.1 Ensemencement en profondeur

Prendre une boîte de Petri stérile. Transférer 1 mL de l'échantillon pour essai à l'aide d'une pipette stérile. Prendre une autre boîte de Petri. Transférer 1 mL de la première dilution de l'échantillon pour essai (10^{-1}) à l'aide d'une nouvelle pipette stérile. Répéter cette procédure avec les dilutions suivantes.

Dans les 15 min, couler dans chaque boîte de Petri environ 15 mL du milieu RPF à 45 °C ± 2 °C en mélangeant soigneusement l'inoculum au milieu de culture en faisant tourner les boîtes de Petri jusqu'à obtenir une distribution homogène de l'inoculum. Laisser se solidifier sur une surface plane.

6.2 Incubation

Retourner les boîtes de Petri et les incuber à 37 °C ± 1 °C pendant 21 ± 3 heures. Si nécessaire, réincuber pendant 21 ± 3 heures supplémentaire.

Après la période d'incubation, procéder au comptage des colonies caractéristiques de toutes les boîtes de Petri, en ne prenant en compte que les boîtes ne contenant pas plus de 150 colonies caractéristiques. Il faut qu'au moins une boîte contienne au moins 10 colonies.

Les colonies caractéristiques sont de couleur noire ou grise, entourées d'un halo de précipitation indiquant une activité coagulase.

7 Calculs

Calculer le nombre N de colonies présentes dans l'échantillon, à partir de deux dilutions successives, à l'aide de la formule suivante :

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

où :

- C = somme des colonies comptées dans les boîtes retenues

v = volume de l'inoculum ensemencé dans chaque boîte, en millilitres

n1 = nombre de boîtes retenues pour la première dilution

n2 = nombre de boîtes retenues pour la deuxième dilution

d = taux de dilution correspondant à la première dilution retenue

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Lors de cette opération, si le troisième chiffre est inférieur à 5, ne pas modifier le chiffre précédent. Si le troisième chiffre est égal ou supérieur à 5, rajouter une unité au chiffre antérieur. Noter le résultat comme le nombre de colonies par millilitre, exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x, où x est la puissance appropriée de 10 (par ex., $3,7 \times 10^2$ UFC/mL).

BIBLIOGRAPHIE

ISO 6888-2:1999 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.