

RPF Supplément (Rabbit Plasma Fibrinogène)

356-4618

DOMAINE D'APPLICATION

Supplément utilisé avec la base Baird-Parker supplémentée pour dénombrer directement à 37°C (sans confirmation des colonies) les Staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) dans les produits destinés à la consommation humaine ou animale.

REFERENCE(S) NORMATIVE(S)

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

- **NF EN ISO 6888-2 (Octobre 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 (IC: V08-014-2)
- **NF EN ISO 6888-3 (Juin 2003)** : Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) - Partie 3 : Recherche et méthode NPP pour les faibles nombres
- **NF V08-057-2 (Janvier 2004)** : Microbiologie des aliments - Méthode de routine pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C - Partie 2: Technique sans confirmation des colonies
- **FIL 145A (1997)** : Lait et produits à base de lait - Dénombrement des *Staphylococcus aureus* coagulase-positifs - Technique de comptage des colonies

EAUX

- **NF T90-421 (Août 2006)** : Qualité de l'eau - Examens bactériologiques des eaux de piscines (Révision de la NF T90-421 : 1989)
- **XP T90-412 (Juin 2006)** : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Staphylocoques - Méthode par membrane filtration
- **NF T90-461/A2 (Mai 2007)** : Qualité de l'eau - Microbiologie - Contrôle qualité des milieux de culture

PRINCIPE

Le principe du milieu complet (supplément RPF + base Baird-Parker supplémentée) repose sur l'aptitude des Staphylocoques à coagulase positive à réduire le tellurite (colonies grises à noires), et à transformer le fibrinogène du plasma en fibrine grâce à leur activité coagulase (halo blanchâtre d'opacification autour des colonies).

Le milieu complet est rendu inhibiteur vis-à-vis des autres bactéries par le chlorure de lithium et le tellurite de potassium.

PRESENTATION

Supplément RPF / Lyophilisé
Coffret de 10 flacons **code 356-4618**
(= Quantité pour 900 ml de base)

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Prêt-à-l'emploi : + 2 - 8°C
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement

FORMULE THEORIQUE (par flacon)

Plasma de lapin	2,5 ml
Fibrinogène bovin	0,375 g
Inhibiteur de trypsine	2,5 mg
Tellurite de potassium	2,5 mg

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) (NON FOURNI(S))

- **Baird Parker (base supplémentée en L-Glycine et Pyruvate de Sodium)**
 - Déshydraté : 500 g (code 356-4814)
 - Prêt à l'emploi : 6 flacons de 90 ml + 6 suppléments RPF lyophilisés (code 357-8618)
- **Eau distillée stérile** pour la réhydratation du supplément RPF (code 355-4154)

Voir Fiche(s) Technique(s) correspondante(s)

MATERIEL NECESSAIRE (NON FOURNI)

(liste non exhaustive)

- Agitateur-homogénéisateur
- Boîtes de Petri stériles (Ø = 90 mm)
- Pipettes stériles (0,1 ml; 1 ml, 10 ml,.....)
- Etaleurs stériles
- Bain-marie avec une précision de ± 1°C
- Etuve ou enceinte thermostatée avec une précision de ± 1°C
- Tout matériel courant d'un laboratoire

RPF Supplément (Rabbit Plasma Fibrinogène)

REHYDRATATION DU SUPPLEMENT RPF

- Reprendre le lyophilisat en ajoutant aseptiquement et lentement 10 ml d'eau distillée stérile préchauffée à 37°C* dans le flacon.

- **Agiter si nécessaire à l'aide d'un Vortex** le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution.

Si nécessaire, placer le flacon dans une étuve à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'à parfaite dissolution du lyophilisat.

*Facilite la dissolution du gâteau.

PREPARATION DU MILIEU COMPLET (Base Baird-Parker supplémentée + supplément RPF)

- Ajouter aseptiquement le contenu d'un flacon de supplément RPF reconstitué à 90 ml de base gélosée Baird-Parker supplémentée, refroidie et maintenue à $44 - 47^\circ\text{C}$ (= milieu complet).

- Agiter de façon à bien homogénéiser l'ensemble.

NB : Pour plus d'informations, sur les codes 356-4814 et 357-8618, se référer à leur Fiche Technique correspondante intitulée respectivement Baird- Parker et Baird Parker + RPF.

Un flacon de supplément RPF réhydraté permet de compléter 90 ml de gélose de base Baird-Parker supplémentée en L-Glycine et Pyruvate de Sodium.

PROTOCOLE

• Préparation des échantillons

A effectuer conformément à la norme du produit concerné.

• Ensemencement et incubation

- Transférer, à l'aide de pipettes stériles, 1 ml de l'échantillon à analyser (produit liquide) ou 1 ml de la suspension mère (autres produits) et/ou 1 ml de ses dilutions décimales dans les boîtes de Pétri stériles.

- Couler rapidement une quantité d'environ 10 ml du milieu complet.

- Homogénéiser et laisser refroidir sur une surface fraîche et horizontale.

- Après solidification complète, retourner les boîtes et incuber à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 h ou 48 h si nécessaire.

NB: L'ensemencement peut également être pratiqué en surface.

LECTURE ET INTERPRETATION

• Comptage des colonies (UFC)

- Après la période d'incubation, procéder au comptage des colonies caractéristiques. Les staphylocoques à coagulase positive forment des colonies grises à noires entourées d'un halo blanchâtre d'opacification indiquant une activité de la coagulase.

NB :

- Comme la gélose au plasma de lapin et au fibrinogène est basée sur une réaction coagulase, il n'est pas nécessaire de confirmer cette activité.

- Retenir que les boîtes contenant au moins de 15 colonies caractéristiques et moins de 300 colonies au total.

- Selon les différentes méthodes de calcul, les boîtes contenant moins de 15 colonies ou aucune colonie peuvent être retenues (estimation de petits nombres).

• Expression des résultats/Calculs

Pour le mode de calcul, se reporter à la norme NF ISO 7218 et à la norme spécifique.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la solution mère (ou de la dilution 10^{-1} dans le cas d'un produit solide) et le moment où les dilutions entrent en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 15 minutes.

- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

PERFORMANCES/CONTROLE QUALITE DU TEST

Les performances culturales sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

Cf. tableau page suivante...

CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

RPF Supplément

(Rabbit Plasma Fibrinogène)

MICRO-ORGANISMES	Aspect des colonies après 24-48h d'incubation à 37°C	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Réduction du Tellurite	Positive Colonies noires
	Halo	Positive
	Croissance	PR* ≥ 0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Réduction du Tellurite	Positive Colonies noires
	Halo	Positive
	Croissance	PR* ≥ 0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	Réduction du Tellurite	Positive Colonies noires
	Halo	Positive
	Croissance	RR = [66 % - 150 %]
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Réduction du Tellurite	Colonies grises à noires
	Halo	Négatif
	Croissance	Faible à bonne
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Pas de croissance	

* PR = Nombre total de colonies obtenu sur 2 boîtes de milieu Baird Parker / Nombre total de colonies obtenu sur 2 boîtes de gélose TCS

MOTS CLES

RPF / Supplément / *Staphylococcus* / Produits alimentaires / Dénombrement / Fibrinogène / Coagulase / Milieu.

BIBLIOGRAPHIE

- **SAWHNEY D. (1986):** The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar. *Journal of Applied Bacteriology*, 61, 149-155.
- **BECKERS H.J. et al. (1984) :** Evaluation of a pour-plate system with rabbit plasma – bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. *Can. J. Microbiol*, 30, 470-474.