
GÉLOSE BAIRD-PARKER RPF

DENOMBREMENT ET CONFIRMATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose de Baird-Parker avec plasma de lapin et fibrinogène (RPF = Rabbit Plasma Fibrinogen) permet la détection et la numération directes des staphylocoques pathogènes. Ce milieu présente l'avantage de très nettement réduire le nombre de tests de confirmation lorsque la présence de staphylocoques à coagulase positive ne se manifeste pas de façon évidente sous l'aspect de colonies bien typiques sur d'autres milieux sélectifs. Dans la plupart des cas, le milieu permet d'effectuer à la fois le dénombrement et la confirmation en une seule opération.

La formule-type de la gélose répond à la composition définie dans les normes en microbiologie des aliments NF EN ISO 6888, NF EN ISO 6888-2 et NF EN ISO 6888-3.

Elle répond aussi à la norme NF T90-412 utilisée pour le contrôle des eaux.

2 HISTORIQUE

La production de coagulase libre, considérée comme étant le caractère principal utilisé pour la reconnaissance de la pathogénicité des staphylocoques et notamment de *Staphylococcus aureus*, a été à l'origine de la mise au point du milieu de Baird-Parker au plasma de lapin et fibrinogène. Les premiers essais d'incorporation de plasma à des milieux de culture gélosés ont révélé des discordances entre les résultats obtenus par le test de mise en évidence de la coagulase en tube et la formation d'un halo caractéristique de fibrine autour des colonies. Les écarts observés résultaient du fait que certaines souches, possédant bien une coagulase, activaient également le système plasminogène-plasmine. Ce phénomène provoquait une fibrinolyse dont la conséquence se manifestait par la disparition du halo. Pour pallier cette difficulté, l'addition du facteur antitrypsique de la graine de soja a été recommandée.

En 1976, afin de favoriser la mise en évidence de la coagulase produite par *Staphylococcus aureus*, Devoyod *et al.* ont étudié l'incorporation de plasma de porc au milieu de Baird-Parker. Ultérieurement, Hauschild a amélioré les performances du milieu de Devoyod en y incluant du fibrinogène bovin et le facteur antitrypsique, tout en diminuant corrélativement la quantité de plasma. En 1983, Beckers *et al.* ont modifié le milieu de Hauschild en remplaçant le plasma de porc par le plasma de lapin, plus classiquement utilisé pour l'épreuve de la coagulase. Ces auteurs ont égalementensemencé le milieu en profondeur, contrairement à la technique antérieurement pratiquée en double couche par Devoyod. Enfin, la formulation a été améliorée par Sawhney en 1986, au terme de son étude relative à la toxicité du tellurite de potassium vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dans un milieu au plasma de lapin avec fibrinogène.

3 PRINCIPES

La croissance des staphylocoques est favorisée par le pyruvate de sodium et la glycine.

La microflore secondaire est inhibée en présence de chlorure de lithium, de tellurite de potassium (ajouté extemporanément), ainsi que par la forte concentration en glycine.

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.

La coloration noire des colonies de *Staphylococcus aureus* est due à la réduction du tellurite de potassium en tellure. De plus, la présence de tellurite favorise l'inhibition de la microflore contaminante à Gram positif.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu Baird Parker-Plasma de lapin fibrinogène

- Tryptone	9,0 g
- Extrait de viande	4,5 g
- Extrait autolytique de levure.....	0,9 g
- Pyruvate de sodium	9,0 g
- Glycine	10,8 g
- Chlorure de lithium.....	4,5 g
- Agar agar bactériologique.....	13,5 g
- Fibrinogène bovin.....	5 g
- Plasma de lapin, EDTA.....	25 mL
- Inhibiteur de trypsine.....	25 mg
- Tellurite de potassium.....	25 mg

Pour 58 g de base déshydratée BK055

- Tryptone	10,0 g
- Extrait de viande.....	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	1,0 g
- Pyruvate de sodium.....	10,0 g
- Glycine	12,0 g
- Chlorure de lithium.....	5,0 g
- Agar agar bactériologique	15,0 g

pH du milieu de base à 25 °C : 7,2 ± 0,2

Pour un flacon de supplément BS034

(Qsp 100 mL)

- Fibrinogène bovin.....	0,5 g
- Plasma de lapin, EDTA.....	2,5 mL
- Inhibiteur de trypsine.....	2,5 mg
- Tellurite de potassium.....	2,5 mg

Pour un flacon de supplément BS038

(Qsp 500 mL)

- Fibrinogène bovin	2,5 g
- Plasma de lapin, EDTA.....	12,5 mL
- Inhibiteur de trypsine	12,5 mg
- Tellurite de potassium.....	12,5 mg

5 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 58 g de milieu déshydraté (BK055) dans 950 mL d'eau distillée ou déminéralisée. Il se produit une augmentation de volume permettant d'atteindre 1 litre de milieu de base.
- 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 :**
58 g pour 950 mL

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Utilisation des milieux de base prêt-à-liquéfier :

- Faire fondre les milieux de base compris dans les kits ou préparés à l'avance pendant le minimum de temps nécessaire à leur reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47°C.

Réhydratation des suppléments lyophilisés :

- Reprendre le lyophilisat en ajoutant aseptiquement le volume d'eau distillée stérile précisé ci-dessous.
 - Qsp 100 mL de milieu complet (BS034, BS045) : 10 mL d'eau stérile
 - Qsp 500 mL de milieu complet (BS038) : 50 mL d'eau stérile
 - Qsp 200 mL de milieu complet, spécifique au kit BT010 (BS075) : 10 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 des milieux complets

- Pour 90 mL de base inclus dans le kit BT005 ou préparée à partir du déshydraté, ajouter stérilement 10 mL de supplément Plasma de Lapin Fibrinogène reconstitué (BS034, BS045 ou BS038).
- Pour 190 mL de base spécifique inclus dans le kit BT010 (BM158), ajouter stérilement 10 mL de supplément Plasma de Lapin Fibrinogène spécifique au kit (BS075).
- Homogénéiser parfaitement.
- Utiliser aussitôt, pour l'ensemencement de boîtes en profondeur ou pour couler des boîtes de Petri vides destinées à la confirmation.

✓ **Kit BT005**
Ajouter 10 mL de BS045 à 90 mL de BM040

✓ **Kit BT010**
Ajouter 10 mL de BS075 à 190 mL de BM158

NOTE :

Le milieu complet en surfusion (44-47 °C) ne se conserve pas.

6 MODE D'EMPLOI

Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, Microbiologie des aliments (NF EN ISO 6888-2)

- Transférer 1 mL de l'inoculum et de ses dilutions décimales dans des boîtes de Petri 90 mm stériles.
- Couler environ 18 à 20 mL de milieu complet préalablement reconstitué.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber entre 34 et 38°C pendant 24 ±2 heures et, en l'absence de colonies, réincuber pendant 24 ±2 heures supplémentaires.

✓ **Ensemencement :**
1 mL en profondeur

✓ **Incubation :**
24 ±2 h à 34-38 °C

Confirmation des staphylocoques pathogènes, Microbiologie des aliments

NF EN ISO 6888-3

- Couler le milieu préparé complet en boîtes de Petri stériles ou utiliser le milieu prêt-à-l'emploi (BM067).
- Repiquer une ôse de chaque tube de bouillon d'enrichissement obtenu (Giolitti et Cantoni).
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant (24 ± 2) heures et prolonger si nécessaire de 24 heures supplémentaires.

NF EN ISO 6888-1

- Repiquer les colonies caractéristiques observées sur la gélose Baird Parker au jaune d'oeuf par piqure sur la gélose PLF.
- Incuber les boîtes entre 34 et 38°C pendant 24 h à 48 h.

Dénombrement des staphylocoques pathogènes, Microbiologie des eaux et des eaux de piscine (NF T 90-412)

- Couler le milieu préparé complet en boîtes de Petri Ø 55 mm stériles ou utiliser le milieu prêt-à-l'emploi (BM159).
- Filtrer sur membrane le volume d'eau à analyser.
- Déposer la membrane sur la boîte, en veillant à ce qu'aucune bulle d'air ne s'interpose entre la membrane et la gélose.
- Retourner la boîte et incuber à 36 ± 2°C.
- Effectuer une première lecture après 21 ± 3 heures. Soulever délicatement le filtre, de façon à observer la présence d'une zone de coagulation sur la gélose.
- Réaliser le dénombrement après (44 ± 4) heures.

✓ **Ensemencement :**
filtration sur membrane

✓ **Incubation :**
44 ± 4 h à 36 ± 2°C

NOTE :

Une réversion des zones opaques peut très occasionnellement se produire à 48 heures.

7 LECTURE

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

Il n'est pas nécessaire de procéder à la confirmation des résultats par le test de la coagulase en tube.

D'autres microorganismes peuvent se développer en formant des colonies gris-noir, mais ils ne présentent pas de réaction positive de coagulase (absence de halo opaque autour des colonies).

NOTE : Pour plus de détails sur l'aspect des colonies se référer à la NF EN ISO 6888-2

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu de base déshydraté : poudre blanc crème, fluide et homogène.

Supplément PLF : lyophilisat blanc à rosâtre, donnant après reconstitution une solution ambrée, limpide à très légèrement opalescente.

Milieu préparé complet : gélose ambrée.

Réponse culturale sur milieu complet après 48 h d'incubation à 37°C (NF ISO 6888-2, NF T90-412, NF EN ISO 11133):

Microorganismes	Croissance (Rapport de productivité : P_R)	Caractéristiques
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034	$P_R \geq 0,5$	Colonies noires, avec halo opaque
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> WDCM 00159	Ralentie, score 0-1	Colonies noires ou grises, sans halo opaque
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	Inhibée, score 0	-

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

Suppléments Plasma de Lapin Fibrinogène lyophilisés : 2-8 °C.

Kits : 2-8 °C.

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri : 2-8 °C

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu de base préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Supplément lyophilisé réhydraté (*) : 8 jours à 2-8 °C. Réchauffer avant utilisation à 37 °C.

Milieu complet préparé en boîtes : 30 jours à 2-8 °C.

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

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

10 PRESENTATION

Milieu de base déshydraté

Flacon de 500 g BK055HA

Seau de 5 kg BK055GC

Supplément Plasma de Lapin Fibrinogène

Coffret de 8 flacons qsp 100 mL BS03408

Coffret de 1 flacon qsp 500 mL BS03808

Kit (6 * 100 mL)

6 flacons de 90 mL de milieu de base et 6 suppléments RPF lyophilisés BT00508

Kit (6 * 200 mL)

6 flacons de 190 mL de milieu de base et 6 suppléments RPF lyophilisés (BS075) BT01008

Milieu complet pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm)

Coffret de 20 boîtes BM06708

Milieu complet pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 55 mm)

Coffret de 20 boîtes BM15908

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Loeb, L.. 1903. The influence of certain bacteria on the coagulation of blood. *Journal of Medical Research*, **10** : 407-419.
- Duthie, E.S.. 1954. Evidence of two forms of staphylococcal coagulase. *Journal of General Microbiology*, **10** : 427-436.
- Baird-Parker, A.C.. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, **25** : 12-19.
- Devoyod, J.J., Millet, L. et Mocquot G.. 1976. Un milieu gélosé pour le dénombrement direct de *Staphylococcus aureus* : milieu au plasma de porc pour *S. aureus* (PPSA). *Canadian Journal of Microbiology*, **22 (11)** : 1603-1611.
- Stadhouders, J., Hassing, F. and van Aalst-van Maren, N.O.. 1976. A pour-plate method for the detection and enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in the Baird-Parker medium without egg yolk. *Netherland Milk Dairy Journal*, **30** : 222-229.
- 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.
- SAWHNEY, D., 1986. The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar. *Journal of Applied Bacteriology*, **149** : 149-155.
- De Buyser, M.L., Audinet, N., Delbart, M.O., Maire, M. and Francoise, F.. 1998. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food microbiology*, **15** : 339-346.
- NF EN ISO 6888-2. Septembre 2021. Microbiologie de la chaîne alimentaire. 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.
- 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 T 90-412. Juin 2016. Qualité de l'eau. Dénombrement des staphylocoques pathogènes (à coagulase positifs)-Méthode par filtration sur membrane.
- NF EN ISO 6888-1. Septembre 2021. Microbiologie de la chaîne alimentaire. Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 1 : Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

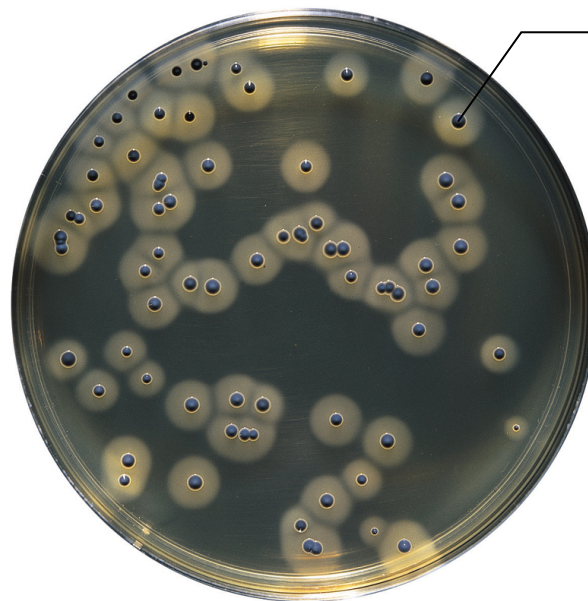
Code document : BAIRD PARKER PLF_FR_V20
Date création : 06-2003
Date de révision : 12-2021
Motif de révision : Mise à jour selon évolution de la norme ISO 6888-2 et 6888-1

Gélose BAIRD-PARKER RPF

Dénombrement et confirmation des *Staphylococcus* à coagulase positive.

Lecture :

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



Staphylococcus aureus

Colonie caractéristique :
De couleur gris à noir
entourée d'un halo de fibrine