
NORME INTERNATIONALE



4831

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable après incubation à 30 °C

Microbiology — General guidance for the enumeration of coliforms — Most probable number technique at 30 °C

Première édition — 1978-08-15

CDU 663.1

Réf. n° : ISO 4831-1978 (F)

Descripteurs : produit alimentaire, produit animal, analyse microbiologique, comptage, bactérie coliforme.

Prix basé sur 8 pages

AVANT-PROPOS

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 4831 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en juillet 1976.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

Afrique du Sud, Rép. d'	Ghana	Pologne
Allemagne	Hongrie	Portugal
Australie	Inde	Roumanie
Autriche	Iran	Royaume-Uni
Bulgarie	Irlande	Tchécoslovaquie
Canada	Israël	Turquie
Espagne	Mexique	U.S.A.
France	Pays-Bas	Yougoslavie

Les comités membres des pays suivants l'ont désapprouvée pour des raisons techniques :

Chili
Nouvelle-Zélande
Thaïlande

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable après incubation à 30 °C

0 INTRODUCTION

0.1 La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen de produits non traités dans les Normes internationales existant actuellement, et pour être étudiées par les organismes élaborant des méthodes d'essais microbiologiques destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes. Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, les directives données, et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des normes nationales et/ou des Normes internationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale, si bien que finalement les seules divergences restantes seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

0.2 La technique décrite dans la présente Norme internationale est moins précise que celle décrite dans l'ISO 4832, mais elle permet d'effectuer un examen microbiologique sur une prise d'essai plus importante et, par conséquent, de détecter un plus petit nombre de coliformes par gramme ou par millilitre de produit. D'autre part, la définition des «coliformes» adoptée dans les deux documents étant différente, on ne dénombre pas nécessairement les mêmes micro-organismes.

Pour chaque produit particulier, le choix de la technique sera précisé dans la Norme internationale concernant ce produit.

0.3 Pour les besoins d'une méthode d'essai efficace, la définition des «coliformes», donnée dans le chapitre 3 et servant de base à la technique, n'est pas nécessairement identique aux définitions correspondantes données dans d'autres textes publiés. Une certaine proportion de souches des micro-organismes désignés sous le nom de «coliformes» (y compris les *Escherichia coli*) dans d'autres textes publiés, ne produisent pas suffisamment de gaz pour pouvoir être décelées au moyen des cloches de Durham (ce sont des souches anaérogènes). C'est pourquoi la technique décrite dans la présente Norme internationale ne détectera pas la totalité des souches des micro-organismes désignés, dans d'autres publications, sous le nom de «coliformes (présu-més)» (par exemple *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*)¹⁾.

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement des coliformes dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, au moyen de la technique de culture en milieu liquide avec calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 30 °C.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application de la présente Norme internationale, du fait que cette méthode est sujette à de grandes variations. Il est recommandé d'appliquer cette méthode et d'interpréter les résultats à la lumière des renseignements donnés en 10.4.

2 RÉFÉRENCES

ISO 2293, *Viandes et produits à base de viande — Dénombrement des germes aérobies à 30 °C (Méthode de référence)*.

ISO 3565, *Viandes et produits à base de viande — Recherche des salmonellae (Méthode de référence)*.

1) Voir Edwards, P. R., et Ewing, W. H. (1972) : «*Identification of Enterobacteriaceae*», 3^e édition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.

ISO 4832, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C.*

ISO . . . , *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions.*¹⁾

3 DÉFINITION

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique :

«**coliformes**» : Bactéries qui, à 30 °C, provoquent la fermentation du lactose avec production de gaz, dans les conditions opératoires décrites.

4 PRINCIPE

4.1 Ensemencement de trois tubes de milieu sélectif liquide double concentration (a)²⁾ avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

4.2 Ensemencement de trois tubes de milieu sélectif simple concentration (b)²⁾ avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits; puis, dans les mêmes conditions, ensemencement du milieu (b) avec les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.3 Incubation à 30 °C durant 24 h pour les tubes de milieu (a).

4.4 Incubation à 30 °C durant 24 ou 48 h pour les tubes de milieu (b) et examen de ces tubes.

4.5 Repiquage à partir des tubes de milieu (a) et des tubes de milieu (b) opaques ou ayant donné lieu à un dégagement gazeux, dans une nouvelle série de tubes de milieu (b).

4.6 Incubation à 30 °C durant 24 ou 48 h et examen de cette nouvelle série de tubes.

4.7 Calcul du nombre de coliformes par millilitre ou par gramme d'échantillon (c'est-à-dire le NPP), au moyen d'une table pour la détermination du nombre le plus probable, à partir du nombre de tubes de cette nouvelle série dans lesquels on note une production de gaz.

5 ÉCHANTILLONNAGE

Effectuer l'échantillonnage conformément à la Norme internationale traitant du produit concerné.

6 APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

Le matériel en contact avec les milieux de culture, le diluant et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement celui en plastique), doit être stérilisé :

- soit au four, en le maintenant à une température de 170 à 175 °C durant au moins 1 h;
- soit à l'autoclave, en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C durant au moins 20 min.

6.2 Étuve, réglable à 30 ± 1 °C.

6.3 **Anse bouclée**, en platine iridié ou en nickel-chrome, de diamètre environ 3 mm.

6.4 **Tubes à essais**, de 16 mm × 160 mm et 20 mm × 200 mm environ, ou **fioles de capacité analogue.**

6.5 **Cloches de Durham**, de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans des tubes de 16 mm × 160 mm.

6.6 **Pipettes à écoulement total**, de capacité nominale 1 ml et 10 ml.

6.7 **pH-mètre.**

7 MILIEU DE CULTURE ET DILUANT

7.1 Composants de base

Pour améliorer la fidélité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du milieu de culture, des composants de base déshydratés ou un milieu complet déshydraté. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances pouvant inhiber la croissance des coliformes dans les conditions de l'essai.

Si le milieu et le diluant ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent être conservés à l'obscurité entre 0 et + 5 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

1) En préparation.

2) S'il y a lieu, un milieu liquide d'enrichissement peut être utilisé avant l'ensemencement du milieu sélectif.

7.2 Diluant

Utiliser un diluant tamponné ou non à base de peptone et contenant du chlorure de sodium, par exemple diluant peptone-sel (voir 5.3 de l'ISO 2293) ou eau peptonée tamponnée (voir 6.2.1 de l'ISO 3565).

7.3 Bouillon lactosé bilié au vert brillant (milieu sélectif)

Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
peptone	20 g	10 g
lactose	20 g	10 g
bile de bœuf déshydratée	40 g	20 g
vert brillant répon- dant aux spécifi- cations de l'annexe de l'ISO 3565	0,026 6 g	0,013 3 g
eau	1 000 ml	1 000 ml

Préparation

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté, en portant à l'ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH (en contrôlant au pH-mètre) de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,2 \pm 0,1$ à 25°C .

Répartir le milieu, par quantités de 10 ml, dans des tubes à essais de 16 mm \times 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.5) dans le cas du milieu simple concentration, et dans des tubes de 20 mm \times 200 mm (6.4) (sans cloches) dans le cas du milieu double concentration.

Stériliser à l'autoclave à $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 15 ± 1 min.

Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

NOTE — Étant donné que le milieu complet ne donne pas toujours les résultats attendus, il est nécessaire de contrôler ses propriétés avant utilisation. (Une technique sera mise au point à cet effet et une norme publiée.)

8 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR ESSAI

Se reporter à la Norme internationale concernant le produit à examiner. S'il n'y a pas de Norme internationale disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 MODE OPÉRATOIRE (voir schéma en annexe A)

Dans le cas de plusieurs échantillons examinés provenant d'une même lot, effectuer les opérations décrites ci-après, pour chaque échantillon.

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Se reporter à l'ISO... (voir chapitre 2) et à la Norme internationale concernant le produit à examiner.

Préparer la suspension mère et les dilutions au moyen d'un diluant répondant aux conditions décrites en 7.2.

Effectuer un nombre de dilutions suffisant afin d'être sûr que tous les tubes de la dernière dilution soient négatifs.

9.2 Technique du NPP

9.2.1 Ensemencement

9.2.1.1 Prendre trois tubes de milieu sélectif double concentration [7.3 a)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, avec une pipette (6.6), 10 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 10 ml de la suspension mère.

9.2.1.2 Prendre ensuite trois tubes de milieu sélectif simple concentration [7.3 b)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, avec une pipette (6.6), 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère.

9.2.1.3 Pour chacune des dilutions suivantes (à partir de 1/10 ou 1/100, selon le cas), prendre trois tubes de milieu sélectif simple concentration [7.3 b)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, 1 ml de dilution. Changer de pipette à chaque dilution. Bien mélanger l'inoculum et le milieu.

9.2.2 Incubation

9.2.2.1 Faire incuber les tubes de milieu double concentration (9.2.1.1) à l'étuve (6.2) à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 24 ± 2 h.

9.2.2.2 Faire incuber les tubes de milieu simple concentration (9.2.1.2 et 9.2.1.3) à l'étuve (6.2) à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 24 ± 2 h ou, si, à ce stade, on n'observe pas de formation de gaz ni d'opacité empêchant d'apprécier un dégagement gazeux, durant 48 ± 2 h.

9.2.3 Repiquage

9.2.3.1 À partir de chaque tube incubé selon 9.2.2.1, ensemer avec une anse bouclée (6.3) un tube de milieu sélectif simple concentration [7.3 b)]. Incuber à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 24 ± 2 h ou, si, à ce stade, on n'observe pas de dégagement de gaz, durant 48 ± 2 h.

9.2.3.2 Opérer de même pour les tubes incubés selon 9.2.2.2 présentant un dégagement gazeux ou une opacité, dès que l'un de ces phénomènes est observé (c'est-à-dire après 24 ± 2 h ou après 48 ± 2 h).

9.2.4 Interprétation

Pour chaque dilution, compter le nombre total de tubes où l'on note en 9.2.3 un dégagement gazeux (tubes positifs), après 24 ± 2 h et, éventuellement, après 48 ± 2 h.

10 EXPRESSION DES RÉSULTATS

10.1 Choix des dilutions¹⁾

Pour chaque échantillon examiné, retenir trois dilutions consécutives en se conformant à l'une des règles suivantes, selon le cas :

a) *Il existe au moins une dilution révélant trois tubes positifs*

Choisir la dilution la plus élevée (c'est-à-dire celle ayant la plus faible concentration en échantillon) révélant trois tubes positifs, ainsi que les deux dilutions plus élevées suivant immédiatement (c'est-à-dire celles dont les concentrations en échantillon sont égales au 1/10 et au 1/100 de celle de la première dilution choisie) (voir exemple 1).

Voir également la règle c).

S'il a été préparé un nombre insuffisant de dilutions au-delà de la dilution la plus élevée révélant trois tubes positifs, choisir à la place les trois dilutions les plus élevées de la série (c'est-à-dire celles ayant la plus faible concentration en échantillon) (voir exemple 2).

b) *Il n'existe pas de dilutions révélant trois tubes positifs*

La règle a) ne pouvant être appliquée, choisir les trois dilutions les plus élevées de la série (c'est-à-dire celles ayant la plus faible concentration en échantillon) (voir exemple 3).

Voir également la règle c).

c) *Cas particuliers*

Dans tous les cas où plus d'une des trois dilutions retenues par la sélection des règles a) et b) ne révèle pas de tubes positifs, retenir, parmi ces dilutions, la dilution la moins élevée ne contenant pas de tubes positifs (c'est-à-dire celle ayant la plus forte concentration en échantillon) et les deux plus faibles dilutions précédentes (c'est-à-dire celles dont les concentrations en échantillon sont égales à 10 et à 100 fois celle de la première solution choisie) (voir exemples 4 et 5), sauf lorsqu'on ne trouve des tubes positifs qu'au niveau de la première dilution préparée à partir de l'échantillon. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de retenir les trois premières dilutions pour le calcul du NPP, même si cette série renferme deux dilutions ne révélant aucun tube positif.

10.2 Détermination du coefficient NPP

10.2.1 Selon le nombre d'échantillons examinés par lot, vérifier, dans la table de l'annexe B ou C, si les séquences de nombres de tubes positifs, correspondant aux dilutions sélectionnées selon 10.1, sont acceptables du point de vue statistique. Cette acceptabilité dépend à la fois du nombre d'échantillons analysés et de la décision d'accepter ou de refuser les résultats de la catégorie 2.

Ainsi, par exemple, lorsque seulement les résultats de la catégorie 1 sont acceptés, la séquence 221 ne peut être retenue que si 10 échantillons (du lot considéré) ont été examinés. Par contre, lorsque les résultats moins probables de la catégorie 2 sont acceptés également, la séquence 221 sera retenue aussi dans le cas où seulement 2, 3 ou 5 échantillons ont été examinés. Si la séquence 221 est le résultat d'un essai unique, elle ne sera acceptable en aucune manière.

10.2.2 Pour chaque séquence jugée acceptable selon 10.2.1, le coefficient NPP est obtenu au moyen de la table de l'annexe B ou C.

10.3 Calcul du nombre le plus probable (NPP)

Le nombre de coliformes par millilitre ou par gramme est obtenu en multipliant le coefficient NPP (voir 10.2) par l'inverse du taux de la dilution retenue la moins élevée (c'est-à-dire celle ayant la plus forte concentration en échantillon).

Dans le cas où la dilution retenue la moins élevée correspond aux tubes préparés à partir du milieu double concentration (ensemencement de 10 ml), diviser préalablement le coefficient NPP par 10.

Exprimer le résultat par un chiffre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^n , n étant la puissance appropriée de 10.

Exemple 1 : Cas d'un échantillon solide

Suspension mère au 1/10 (10 ml) :	3 tubes +
Suspension mère au 1/10 (1 ml) :	3 tubes +
Dilution au 1/100 (1 ml) :	2 tubes +
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	1 tube +
Dilution au 1/10 000 (1 ml) :	0 tube +

Retenir 321.

La table de l'annexe B ou C donne un coefficient NPP de 15, et le calcul donne un NPP de 15×10 , soit :

$1,5 \times 10^2$ coliformes par gramme

Exemple 2 : Cas d'un échantillon solide

Suspension mère au 1/10 (10 ml) :	3 tubes +
Suspension mère au 1/10 (1 ml) :	3 tubes +
Dilution au 1/100 (1 ml) :	3 tubes +
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	0 tube +

Retenir 330.

La table de l'annexe B ou C donne un coefficient NPP de 20, et le calcul donne un NPP de 20×10 , soit :

2×10^2 coliformes par gramme

1) Dans ce paragraphe, la suspension mère et, éventuellement, l'échantillon pour essai sont considérés comme étant des «dilutions».

Exemple 3 : Cas d'un échantillon liquide

Échantillon pour essai (dilution 1/1) (10 ml) :	2 tubes +
Échantillon pour essai (dilution 1/1) (1 ml) :	2 tubes +
Dilution au 1/10 (1 ml) :	1 tube +
Dilution au 1/100 (1 ml) :	1 tube +
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	0 tube +

Retenir 110.

La table de l'annexe B ou C donne un coefficient NPP de 0,7, et le calcul donne un NPP de $0,7 \times 10$, soit :

7×10^0 coliformes par millilitre

Exemple 4 : Cas d'un échantillon solide

Suspension mère au 1/10 (10 ml) :	3 tubes +
Suspension mère au 1/10 (1 ml) :	3 tubes +
Dilution au 1/100 (1 ml) :	0 tube +
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	0 tube +

Retenir 330.

La table de l'annexe B ou C donne un coefficient NPP de 20, et le calcul donne un NPP de $\frac{20}{10} \times 10$, soit :

$2,0 \times 10^1$ coliformes par gramme

Exemple 5 : Cas d'un échantillon solide

Suspension mère au 1/10 (10 ml) :	2 tubes +
Suspension mère au 1/10 (1 ml) :	2 tubes +
Dilution au 1/100 (1 ml) :	1 tube +
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	0 tube +
Dilution au 1/10 000 (1 ml) :	0 tube +

Retenir 210.

La table de l'annexe B ou C donne un coefficient NPP de 1,5, et le calcul donne un NPP de $1,5 \times 10$, soit :

$1,5 \times 10^1$ coliformes par gramme

10.4 Fidélité de la méthode

Il est bien connu que des variations importantes peuvent être observées avec la technique du NPP. De ce fait, les résultats obtenus selon cette méthode doivent être utilisés avec prudence.

Les limites de confiance sont données dans les tables des annexes B et C.

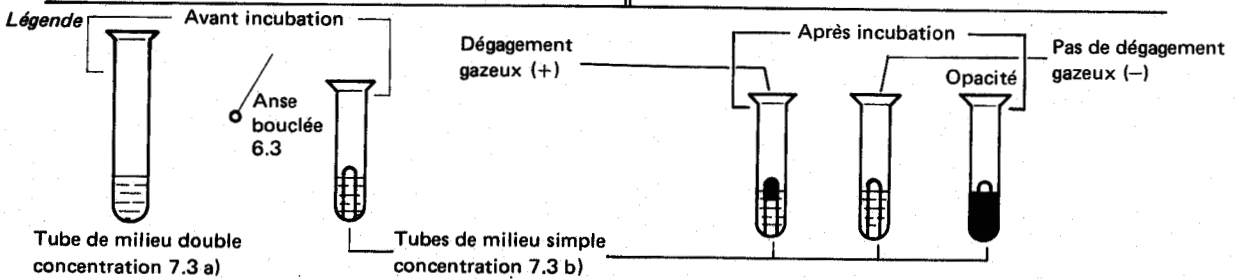
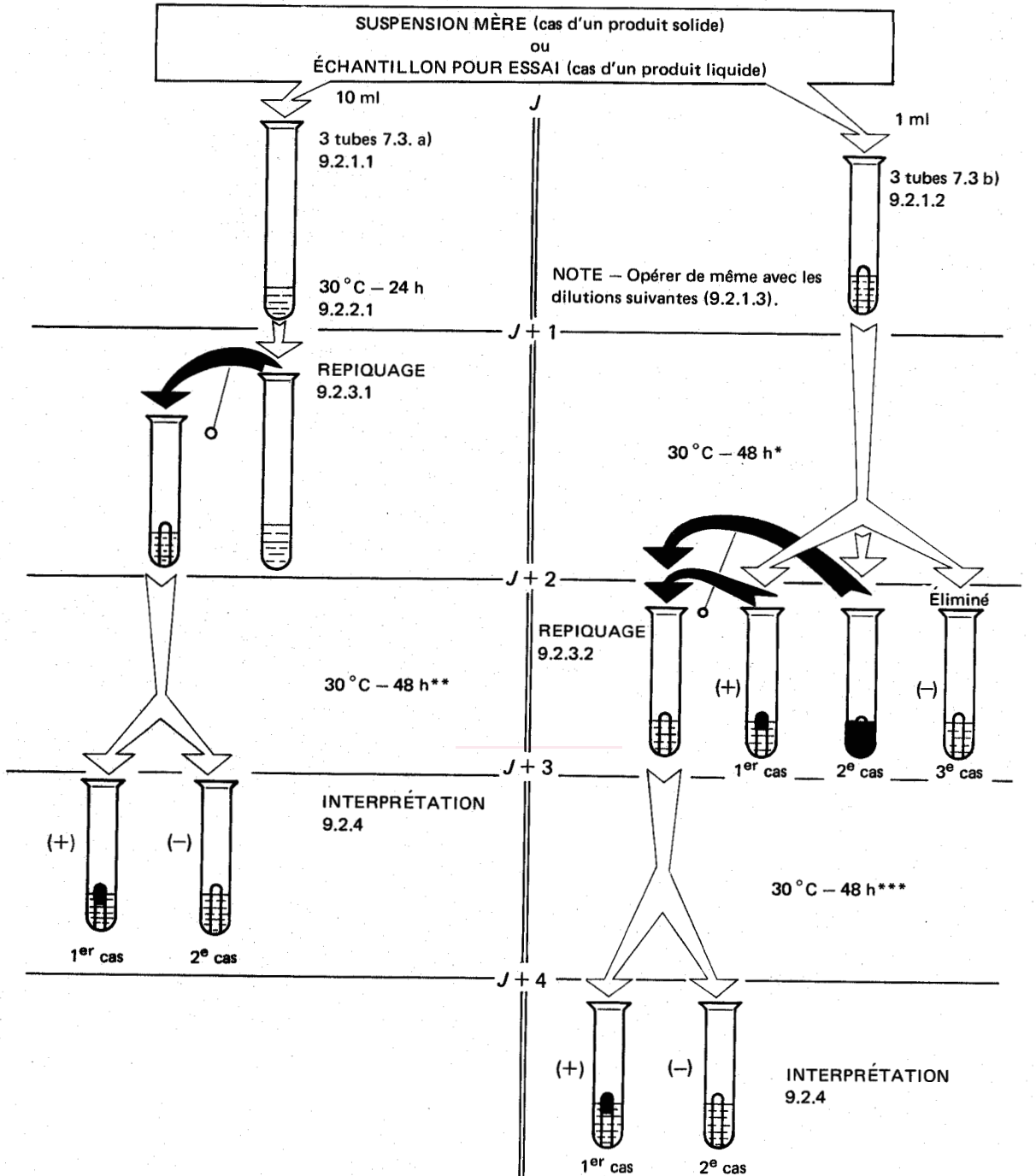
11 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

ANNEXE A

REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU MODE OPÉRATOIRE (voir chapitre 9)



* Ou éventuellement 24 h (voir 9.2.2.2).
 ** Ou éventuellement 24 h (voir 9.2.3.1).
 *** Ou éventuellement 24 h (voir 9.2.3.2).

ANNEXE B

TABLE POUR LA DÉTERMINATION DU COEFFICIENT NPP LORSQUE L'ESSAI EST EFFECTUÉ SUR UN ÉCHANTILLON PAR LOT

Nombre de tubes positifs au niveau des trois dilutions successives retenues			Coefficient NPP	Catégorie*	Limites de confiance			
1 ^{re}	2 ^e	3 ^e			95 %		99 %	
0	0	0	<0,3	0				
0	0	1		2	<0,1	1,7	<0,1	2,3
0	1	0	0,3	0				
0	2	0		1	0,1	2,1	<0,1	2,8
1	0	0	0,4	2	0,2	2,7	0,1	3,5
1	0	1	0,7	1	0,2	2,8	<0,1	3,6
1	1	0	0,7	0				
1	1	1		2	0,4	3,5	0,2	4,4
1	2	0	1,1	0				
1	2	1		0				
1	3	0		0				
2	0	0	0,9	1	0,2	3,8	<0,1	5,0
2	0	1	1,4	2	0,5	4,8	0,2	6,2
2	1	0	1,5	1	0,5	5,0	0,2	6,4
2	1	1	2,0	2	0,7	6,0	0,4	7,6
2	2	0	2,1	1	0,8	6,2	0,5	7,9
2	2	1		0				
2	3	0		0				
3	0	0	2	1	<1	13	<1	18
3	0	1	4	1	1	18	<1	23
3	0	2		0				
3	1	0	4	1	1	21	<1	28
3	1	1	7	1	2	28	2	36
3	1	2		0				
3	2	0	9	1	3	38	1	51
3	2	1	15	1	5	50	3	66
3	2	2	21	2	8	64	5	82
3	2	3		0				
3	3	0	20	1	<10	140	<10	190
3	3	1	50	1	10	240	<10	320
3	3	2	110	1	30	480	20	640
3	3	3	>110					

* **Catégorie 0** : Combinaisons de tubes inacceptables, ayant, dans des conditions normales, le moins de chance d'être obtenues. Les combinaisons non mentionnées dans la table ci-dessus appartiennent également à cette catégorie.

Le fait que l'on obtienne une combinaison hors catégorie est probablement attribuable soit à une erreur, soit à une imperfection dans la technique, ou bien encore à la présence d'une substance bactériostatique dans le produit.

Catégorie 1 : Combinaisons de tubes les plus probables. Chacune d'entre elles devrait être obtenue dans 95 % des cas.

Catégorie 2 : Combinaisons de tubes moins probables que celles de la catégorie 1. Chacune d'entre elles devrait être obtenue dans seulement 4 % des cas.

ANNEXE C

TABLE POUR LA DÉTERMINATION DU COEFFICIENT NPP LORSQUE L'ESSAI EST EFFECTUÉ SUR PLUSIEURS ÉCHANTILLONS PAR LOT

Nombre de tubes positifs au niveau des trois dilutions successives retenues			Coefficient NPP	Catégories* lorsque le nombre d'échantillons par lot examinés en parallèle est de :				Limites de confiance			
1 ^{re}	2 ^e	3 ^e		2	3	5	10	95 %		99 %	
0	0	0	<0,3								
0	0	1	0,3	2	2	2	1	<0,1	1,7	<0,1	2,2
0	1	0	0,3	1	1	1	1	<0,1	1,7	<0,1	2,3
0	2	0	0,6	2	2	2	1	0,2	2,2	<0,1	2,9
1	0	0	0,4	1	1	1	1	<0,1	2,1	<0,1	2,8
1	0	1	0,7	2	1	1	1	0,2	2,7	<0,1	3,5
1	1	0	0,7	1	1	1	1	0,2	2,8	<0,1	3,6
1	1	1	1,1	0	2	2	2	0,4	3,4	0,2	4,3
1	2	0	1,1	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,4
1	2	1	1,5	0	0	0	2	0,6	4,1	0,4	5,1
1	3	0	1,6	0	0	0	2	0,6	4,2	0,4	5,2
2	0	0	0,9	1	1	1	1	0,2	3,8	<0,1	5,0
2	0	1	1,4	1	1	1	1	0,5	4,8	0,2	6,2
2	1	0	1,5	1	1	1	1	0,5	5,0	0,2	6,4
2	1	1	2,0	2	1	1	1	0,7	6,0	0,4	7,6
2	2	0	2,1	1	1	1	1	0,8	6,2	0,5	7,9
2	2	1	2,8	2	2	2	1	1,1	7,4	0,7	9,2
2	3	0	2,9	2	2	2	1	1,1	7,7	0,7	9,7
3	0	0	2	1	1	1	1	<1	13	<1	18
3	0	1	4	1	1	1	1	1	18	<1	23
3	0	2	6	0	2	2	2	2	23	1	29
3	1	0	4	1	1	1	1	1	21	<1	28
3	1	1	7	1	1	1	1	2	28	2	36
3	1	2	12	2	2	2	2	4	35	2	45
3	2	0	9	1	1	1	1	3	38	1	51
3	2	1	15	1	1	1	1	5	50	3	66
3	2	2	21	1	1	1	1	8	64	5	82
3	2	3	29	0	0	2	2	11	79	8	98
3	3	0	20	1	1	1	1	<10	140	<10	190
3	3	1	50	1	1	1	1	10	240	<10	320
3	3	2	110	1	1	1	1	30	480	20	640
3	3	3	>110								

* **Catégorie 0** : Combinaisons de tubes inacceptables, ayant, dans des conditions normales, le moins de chance d'être obtenues. Les combinaisons non mentionnées dans la table ci-dessus appartiennent également à cette catégorie.

Le fait que l'on obtienne une combinaison hors catégorie est probablement attribuable soit à une erreur, soit à une imperfection dans la technique, ou bien encore à la présence d'une substance bactériostatique dans le produit.

Catégorie 1 : Combinaisons de tubes les plus probables. Chacune d'entre elles devrait être obtenue dans 95 % des cas.

Catégorie 2 : Combinaisons de tubes moins probables que celles de la catégorie 1. Chacune d'entre elles devrait être obtenue dans seulement 4 % des cas.