

---

# Norme internationale



# 7402

---

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

---

## ● Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement sans revivification des Enterobacteriaceae — Technique NPP et méthode par comptage des colonies

*Microbiology — General guidance for the enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation — MPN technique and colony count technique*

Première édition — 1985-10-15

---

CDU 579.67.087.23 : 579.842.1/.2

Réf. n° : ISO 7402-1985 (F)

**Descripteurs:** analyse microbiologique, détection, micro-organisme, enterobacteriaceae, résultats d'essai, matériel d'essai, comptage de bactéries.

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 créé à cet effet. 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. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 7402 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

# Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement sans revivification des Enterobacteriaceae — Technique NPP et méthode par comptage des colonies

## 0 Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen de produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement, et pour l'étude 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, ces directives, 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 internationales et/ou des normes nationales, qui ne concordent pas avec ces directives, existent peut-être déjà. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à essayer, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient alignées sur la présente Norme internationale, si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

Pour chaque produit particulier, la méthode à utiliser sera précisée dans la Norme internationale concernant ce produit.

## 1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement des Enterobacteriaceae dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale

- par calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 35 °C ou 37 °C en milieu liquide;
- par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation à 35 °C ou 37 °C.

Pour les petits nombres, la technique NPP est préférable, sinon on préférera la méthode par comptage des colonies.

La présente Norme internationale n'inclut pas de technique de revivification, et les résultats ne doivent pas être reliés aux critères ou spécifications basés sur la supposition qu'une revivification a été effectuée.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application de la présente Norme internationale, du fait que ces méthodes sont sujettes à de grandes variations. Il est recommandé d'employer ces méthodes et d'interpréter les résultats à la lumière des renseignements donnés en 10.3.

## 2 Référence

ISO 6887, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

## 3 Définitions

Dans le cadre de la présente Norme internationale, les définitions suivantes sont applicables.

**3.1 Enterobacteriaceae:** Micro-organismes fermentant le glucose et donnant une réaction oxydase négative lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée.

**3.2 dénombrement des Enterobacteriaceae:** Nombre d'Enterobacteriaceae trouvé par millilitre ou par gramme d'échantillon lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée.

## 4 Principe

### 4.1 Préparation des dilutions

À partir de l'échantillon pour essai, préparation des dilutions décimales.

### 4.2 Dénombrement des Enterobacteriaceae

#### 4.2.1 Technique du nombre le plus probable (NPP)

NOTE — Il est recommandé d'utiliser cette technique lorsque le nombre cherché est supposé se trouver dans l'intervalle de 1 à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

Ensemencement de trois tubes de milieu double concentration 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.

Ensemencement de trois tubes de milieu simple concentration 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 de trois tubes de milieu simple concentration avec la première dilution décimale obtenue à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation des tubes à 35 °C ou 37 °C<sup>1)</sup> pendant 24 h.

À partir du nombre de tubes confirmés positifs, calcul du nombre le plus probable d'Enterobacteriaceae par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai au moyen de la table NPP (voir annexe A).

#### 4.2.2 Comptage des colonies

NOTE — Il est recommandé d'utiliser cette technique lorsque le nombre cherché est supposé supérieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

Ensemencement en profondeur du milieu gélosé à la bile, au cristal violet et au glucose, coulé dans deux boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits. Recouvrement avec une couche du même milieu.

Dans les mêmes conditions, ensemencement d'autres paires de boîtes avec les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation des boîtes à 35 °C ou 37 °C<sup>1)</sup> pendant 24 h.

À partir du nombre de colonies caractéristiques confirmées par boîte de Petri, calcul du nombre d'Enterobacteriaceae par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

## 5 Diluant, milieux de culture et réactif

### 5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. De la même façon, des préparations commerciales de réactifs peuvent être utilisées. Les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des Enterobacteriaceae dans les conditions de l'essai.

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

### 5.2 Diluant

Voir ISO 6887 et la norme spécifique traitant du produit à analyser.

### 5.3 Milieux de culture

#### 5.3.1 Milieu tamponné, à la bile, au vert brillant et au glucose (milieu E.E.)

##### Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
Peptone	20,0 g	10,0 g
Glucose	10,0 g	5,0 g
Hydrogène-orthophosphate disodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	12,90 g	6,45 g
Dihydrogène-orthophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	4,0 g	2,0 g
Bile de bœuf déshydratée	40,0 g	20,0 g
Vert brillant	0,030 g	0,015 g
Eau	1 000 ml	1 000 ml

1) La température doit faire l'objet d'un accord entre les parties concernées et doit être notée dans le procès-verbal d'essai.

**Préparation**

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant le tout à ébullition. Ne pas chauffer le milieu plus de 30 min. Refroidir le milieu rapidement.

Ajuster le pH de sorte qu'après ébullition, il soit de 7,2 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture par quantités de 10 ml dans des tubes stériles (6.5).

Ne pas stériliser le milieu.

Le milieu peut être conservé 1 semaine au maximum entre 0 et 5 °C.

**5.3.2 Gélose à la bile, au cristal violet et au glucose****Composition**

Peptone	7,0	g
Extrait de levure	3,0	g
Sels biliaires	1,5	g
Glucose	10,0	g
Chlorure de sodium	5,0	g
Rouge neutre	0,03	g
Cristal violet	0,002	g
Gélose	8 à 18	g <sup>1)</sup>
Eau	1 000	ml

**Préparation**

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

Ajuster le pH de sorte qu'après ébullition, il soit de 7,4 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture dans des tubes stériles ou dans des flacons stériles (6.5) de 500 ml de capacité maximale.

Ne pas stériliser le milieu.

Préparer ce milieu extemporanément (voir 9.2.2 et 9.3.1).

**Préparation des boîtes de gélose** (seulement pour la technique NPP — voir 9.2.2)

Transférer immédiatement environ 15 ml du milieu de culture, refroidi à environ 45 °C, dans des boîtes de Petri (6.7) et laisser se solidifier.

Juste avant l'emploi, sécher les boîtes de gélose, de préférence avec le couvercle enlevé et la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3) réglée à 50 °C, durant 30 min.

Si elles ont été préparées à l'avance, les boîtes de gélose non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température ambiante ou plus de 1 jour entre 0 et 5 °C.

**5.3.3 Gélose glucosée****Composition**

Tryptone	10,0	g
Extrait de levure	1,5	g
Glucose	10,0	g
Chlorure de sodium	5,0	g
Pourpre de bromocrésol	0,015	g
Gélose	8 à 18	g <sup>1)</sup>
Eau	1 000	ml

**Préparation**

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

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture par quantités de 15 ml dans des tubes (6.5).

Stériliser le milieu à 121 ± 1 °C durant 15 min.

Maintenir les tubes en position verticale.

Le milieu peut être conservé 1 semaine au maximum entre 0 et 5 °C.

Juste avant l'emploi, chauffer dans de l'eau bouillante ou sous courant de vapeur pendant 15 min, puis refroidir rapidement à la température d'incubation.

**5.3.4 Gélose nutritive****Composition**

Extrait de viande de bœuf	3,0	g
Peptone	5,0	g
Gélose	8 à 18	g <sup>1)</sup>
Eau	1 000	ml

**Préparation**

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

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des flacons (6.5) de 500 ml de capacité maximale.

Stériliser le milieu à 121 ± 1 °C durant 15 min.

**Préparation des boîtes de gélose** (voir 9.4.1)

Transférer des quantités d'environ 15 ml du milieu de culture, fondu puis refroidi à environ 45 °C, dans des boîtes de Petri (6.7) et laisser se solidifier.

1) Selon les instructions du fabricant.

Juste avant l'emploi, sécher les boîtes de gélose, de préférence avec le couvercle enlevé et la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3) réglée à 50 °C, durant 30 min.

Si elles ont été préparées à l'avance, les boîtes de gélose non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température ambiante ou plus de 1 jour entre 0 et 5 °C.

## 5.4 Réactif pour l'essai à l'oxydase

### Composition

Dichlorhydrate de N,N,N',N'-tétraméthyl- p-phénylène diamine	1,0 g
Eau	100 ml

### Préparation

Dissoudre le réactif dans l'eau froide.

Préparer le réactif immédiatement avant usage.

## 6 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont appropriées.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment:

### 6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, les milieux de culture ou l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement le matériel en plastique), doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes:

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

### 6.2 Étuve, réglable à $35 \pm 1$ °C ou à $37 \pm 1$ °C.

### 6.3 Enceinte de séchage, étuve ou incubateur, réglable à $50 \pm 5$ °C, pouvant sécher la surface des boîtes de gélose.

### 6.4 Bain d'eau, réglable à 45 °C, pour refroidir les milieux de culture fondus.

### 6.5 Tubes d'essai, de dimensions 16 mm × 160 mm et 20 mm × 200 mm environ, et flacons, pour la stérilisation et la conservation du diluant et des milieux de culture.

### 6.6 Boîtes de Petri, en verre ou en matière plastique, de diamètre 90 à 100 mm.

### 6.7 Anse bouclée, d'un diamètre d'environ 3 mm, et fil, en platine iridié ou en nickel-chrome, et/ou baguette de verre.

NOTE — L'attention est attirée en 9.4.2.1 sur le fait que le nickel-chrome ne convient pas pour l'essai à l'oxydase.

### 6.8 Pipettes graduées à écoulement total, de capacités nominales de 1 et 10 ml, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml, et dont l'orifice d'écoulement a un diamètre de 2 à 3 mm.

### 6.9 pH-mètre, avec une précision de lecture de $\pm 0,1$ unité pH à 25 °C.

## 7 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme du produit concerné. S'il n'y a pas de telle norme disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Voir la norme spécifique traitant du produit concerné. S'il n'y a pas de telle norme, il est recommandé aux parties concernées de se mettre d'accord à ce sujet.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir ISO 6887 et à la norme spécifique traitant du produit concerné.

Préparer une seule série de dilutions décimales à partir de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

### 9.2 Technique NPP

#### 9.2.1 Ensemencement et incubation

Prendre trois tubes de milieu double concentration [5.3.1 a)]. Transférer dans chacun de ces tubes, avec une pipette (6.8), 10 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 10 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre trois tubes de milieu simple concentration [5.3.1 b)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, avec une nouvelle pipette (6.8), 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 trois autres tubes de milieu simple concentration [5.3.1 b)]. Transférer dans chacun de ces tubes, avec une nouvelle pipette (6.8), 1 ml de la première dilution décimale ( $10^{-1}$ )

de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère ( $10^{-2}$ ) dans le cas d'autres produits.

Faire incuber ces neuf tubes durant 24 h à 35 °C ou 37 °C<sup>1)</sup>.

### 9.2.2 Isolement

Ensemencer en stries une anse (6.7) de chacune des neuf cultures incubées (voir 9.2.1), sur des boîtes de gélose à la bile, au cristal violet et au glucose (voir 5.3.2), et faire incuber les boîtes à 35 °C ou 37 °C<sup>1)</sup> durant 24 h.

### 9.2.3 Sélection des colonies pour confirmation

À partir des boîtes incubées en 9.2.2, présentant un développement de colonies caractéristiques roses à rouges (avec ou sans halo de précipité), ou incolores, muqueuses, prélever au hasard cinq de ces colonies en vue de la confirmation biochimique (voir 9.4.2) à effectuer après une sub-culture (voir 9.4.1).

## 9.3 Technique par comptage des colonies

### 9.3.1 Ensemencement et incubation

**9.3.1.1** Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.6). À l'aide d'une pipette stérile (6.8), transférer dans chacune de ces 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. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer 1 ml de la première dilution décimale ( $10^{-1}$ ) de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère ( $10^{-2}$ ) dans le cas d'autres produits.

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

**9.3.1.2** Couler, dans chaque boîte de Petri, 15 ml du milieu gélosé à la bile, au cristal violet et au glucose (5.3.2), fondu puis refroidi à environ 45 °C au bain d'eau (6.4). Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution au  $10^{-1}$  dans le cas d'un produit liquide) et le moment où les dilutions entrent en contact avec le milieu (5.3.2) ne doit pas dépasser 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu par des déplacements horizontaux des boîtes et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

**9.3.1.3** Après solidification du mélange, ajouter une couche superficielle composée d'environ 10 à 15 ml du milieu gélosé à la bile, au cristal violet et au glucose (5.3.2), fondu puis refroidi comme décrit en 9.3.1.2, afin d'empêcher l'étalement des colonies et d'obtenir des conditions de semi-anaérobiose.

**9.3.1.4** Laisser la seconde couche se solidifier. Faire incuber les boîtes préparées, sens dessus-dessous, à 35 °C ou 37 °C<sup>1)</sup> durant 24 h.

### 9.3.2 Comptage et sélection des colonies

Choisir, si possible, deux boîtes (9.3.1.4) contenant de 15 à 150 colonies caractéristiques (voir 9.2.3) ayant un diamètre de 0,5 mm ou plus. Compter ces colonies suspectes. Prélever au hasard cinq de ces colonies sur chacune des boîtes de Petri de la confirmation biochimique (voir 9.4.2) à effectuer après une sub-culture (voir 9.4.1).

Si deux dilutions successives donnent des boîtes contenant de 15 à 150 colonies caractéristiques, retenir les deux boîtes ensemençées avec la plus grande quantité de l'échantillon pour essai.

Considérer la détermination sans valeur si la moitié ou plus de la surface d'une boîte est envahie. Si moins de la moitié de la surface d'une boîte est envahie, effectuer le décompte des colonies sur la partie claire et extrapoler pour que le nombre corresponde à la surface totale de la boîte.

## 9.4 Confirmation

### 9.4.1 Sub-culture

Ensemencer en stries sur des boîtes de gélose nutritive (5.3.4) chacune des colonies sélectionnées en vue de la confirmation (voir 9.2.3 et 9.3.2).

Faire incuber ces boîtes durant 24 h à 35 °C ou 37 °C<sup>1)</sup>. Sélectionner une colonie bien isolée à partir de chacune des boîtes incubées en vue de confirmation biochimique (voir 9.4.2).

### 9.4.2 Confirmation biochimique

#### 9.4.2.1 Essai à l'oxydase

À l'aide d'une anse bouclée ou d'un fil en platine iridié ou d'une baguette de verre (6.7), prendre une fraction de chacune des colonies bien isolées (9.4.1) et ensemençer par stries sur papier filtre humecté de réactif (5.4) ou sur un disque disponible dans le commerce. Il ne faut pas utiliser d'anse en nickel-chrome ni de fil métallique.

Considérer l'essai comme négatif si la couleur n'a pas viré au violet foncé dans les 10 s.

#### 9.4.2.2 Essai de fermentation

Repiquer les mêmes colonies sélectionnées en 9.4.2.1, avec un fil à ensemençer (6.7), dans des tubes contenant du milieu glucosé (5.3.3). Faire incuber durant 24 h à 35 °C ou 37 °C<sup>1)</sup>.

Si une couleur jaune se développe dans la totalité du contenu du tube, la réaction est considérée comme positive. La plupart des souches produisent du gaz.

1) La température doit faire l'objet d'un accord entre les parties concernées et doit être notée dans le procès-verbal d'essai.

## 10 Expression des résultats

### 10.1 Calcul du nombre le plus probable (NPP)

10.1.1 Compter le nombre de tubes positifs pour chaque dilution.

10.1.2 Si l'une des colonies caractéristiques (9.2.3) sélectionnées à partir d'une sub-culture (voir 9.4.1) est oxydase négative et glucose positif, le tube qui est à l'origine de cette sub-culture doit être considéré comme positif.

10.1.3 Au moyen de la table de NPP (voir annexe A), déterminer, à partir du nombre de tubes positifs dans les différentes dilutions, le coefficient du nombre le plus probable (NPP).

10.1.4 Dans le cas de produits liquides, le nombre d'Enterobacteriaceae par millilitre est égal au coefficient NPP divisé par 10. Dans le cas d'autres produits pour lesquels des suspensions mères sont préparées, le nombre par gramme est égal au coefficient NPP.

### 10.2 Calcul à partir du nombre de colonies

10.2.1 Si au moins 80 % des colonies caractéristiques sélectionnées (voir 9.3.2) sont oxydase négative et glucose positif, et donc confirmées comme étant des Enterobacteriaceae, le nombre de micro-organismes présents sera le même que celui trouvé au comptage effectué en 9.3.2.

10.2.2 Dans tous les autres cas, le nombre doit être calculé à partir du pourcentage de colonies oxydase négative et glucose positif par rapport au nombre total de colonies sélectionnées (voir 9.3.2).

10.2.3 Calculer la moyenne arithmétique du nombre de colonies d'Enterobacteriaceae comptées sur les deux boîtes en 9.3.2.

10.2.4 Retenir seulement deux chiffres significatifs, en arrondissant de la façon suivante :

a) si le nombre est inférieur à 100, arrondir au plus proche multiple de 5;

b) si le nombre est supérieur à 100 et ne se termine pas par 5, arrondir au plus proche multiple de 10;

c) si le nombre est supérieur à 100 et se termine par 5, arrondir au plus proche multiple de 20.

10.2.5 Calculer le nombre d'Enterobacteriaceae par millilitre d'échantillon (dans le cas de produits liquides) ou par gramme d'échantillon (dans le cas d'autres produits), en multipliant le nombre obtenu selon 10.2.4 par le taux de dilution.

10.2.6 Exprimer le résultat par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Dans le cas où l'on trouverait moins de 15 colonies caractéristiques d'Enterobacteriaceae par boîte, exprimer le résultat tel qu'il a été calculé (en 10.2.3 et 10.2.4) en remarquant que les limites de confiance à 95 % (annexe B) s'étendent à des nombres plus petits de colonies, mais qu'elles sont toujours meilleures que celles correspondant au dénombrement NPP (voir annexe A).

### 10.3 Précision de la méthode

Il est connu que des variations importantes peuvent être observées avec la technique du NPP. Les résultats obtenus selon cette méthode doivent être utilisés avec prudence. Les limites de confiance sont données dans l'annexe A.

Pour des raisons d'ordre uniquement statistique, dans 95 % des cas, les limites de confiance de la méthode par comptage des colonies varient de  $\pm 16$  à  $\pm 52$  % <sup>1)</sup>; pour des dénombrements inférieurs à 15 colonies par boîte, les limites de confiance sont données dans l'annexe B. En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées et, en particulier, entre les résultats obtenus par différents opérateurs.

## 11 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée, la température d'incubation 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.

1) Voir COWELL and MORISETTI, *J. Sci. Fd. Agric.* 20, p. 573.



## Annexe A

## Détermination du nombre le plus probable

Table 1 — Coefficients NPP et limites de confiance<sup>1)</sup>

Nombre de résultats positifs	Coefficient NPP	Catégorie <sup>2)</sup> lorsque le nombre d'essais est					Limites de confiance <sup>3)</sup>			
		1	2	3	5	10	> 95 %		> 99 %	
0 0 0	< 0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0 0 1	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0 1 0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0 1 1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0 2 0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0 3 0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	3,50	0,18	4,60
1 0 0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1 0 1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1 0 2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1 1 0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1 1 1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1 2 0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1 2 1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1 3 0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2 0 0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2 0 1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2 0 2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2 1 0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2 1 1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2 1 2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2 2 0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2 2 1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2 2 2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2 3 0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2 3 1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
3 0 0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3 0 1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3 0 2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3 1 0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3 1 1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3 1 2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3 1 3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3 2 0	9,3	1	1	1	1	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3 2 1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3 2 2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3 2 3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3 3 0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3 3 1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3 3 2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3 3 3	> 110									

1) D'après DE MAN, J.C. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1983 : 301-305.

2) Voir table 2.

3) Les limites de confiance données dans la table 1 ne sont destinées qu'à fournir quelques notions de l'influence des variations statistiques sur les résultats. Il y aura toujours d'autres sources de variations qui peuvent même, quelquefois, être plus importantes.

Table 2 — Catégories<sup>1)</sup>

Catégorie	Définition
1	Lorsque le nombre de bactéries dans le produit est égal au NPP trouvé, le résultat est un de ceux qui ont le plus de chances d'être obtenus. Il existe tout au plus 5 % de chances d'obtenir un résultat qui est le moins probable que le moins probable dans cette catégorie.
2	Lorsque le nombre de bactéries dans le produit est égal au NPP trouvé, le résultat est un de ceux qui ont le moins de chances d'être obtenus, que même le moins probable dans la catégorie 1, mais il existe tout au plus 1 % de chances d'obtenir un résultat qui est le moins probable que le moins probable dans cette catégorie.
3	Lorsque le nombre de bactéries dans le produit est égal au NPP trouvé, le résultat est un de ceux qui ont le moins de chances d'être obtenus, que même le moins probable dans la catégorie 2, mais il existe tout au plus 0,1 % de chances d'obtenir un résultat qui est le moins probable que le moins probable dans cette catégorie.
0	Lorsque le nombre de bactéries dans le produit est égal au NPP trouvé, le résultat est un de ceux qui ont le moins de chances d'être obtenus, que même le moins probable dans la catégorie 3. Il n'existe qu'une chance de 0,1 % d'obtenir un résultat dans cette catégorie, sans que rien ne soit faux.

1) Avant de commencer les essais, il faut décider quelle catégorie sera acceptable, c'est-à-dire seulement la catégorie 1, 1 et 2, ou même 1, 2 et 3. Si la décision est très importante, pour être prise sur la base des résultats, on acceptera seulement les résultats de la catégorie 1 ou tout au plus ceux des catégories 1 et 2. Les résultats de la catégorie 0 devront être considérés avec la plus grande prudence.

## Annexe B

### Limites de confiance pour des comptages de moins de 15 colonies

La table 3 donne les limites de confiance à 95 %, quand la moyenne arithmétique des comptages sur doubles boîtesensemencées avec l'échantillon pour essai si le produit est liquide ou avec la suspension mère dans le cas d'autres produits, est inférieure à 15.

Table 3 — Limites de confiance pour des comptages inférieurs à 15

Moyenne arithmétique des comptages sur doubles boîtes	Limites de confiance à 95 %	
	inférieures	supérieures
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23