

---

---

**Microbiologie des aliments — Méthodes  
horizontales pour la recherche et le  
dénombrement des  
Enterobacteriaceae —**

Partie 1:

**Recherche et dénombrement à l'aide de  
la technique NPP avec préenrichissement**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods  
for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae —  
Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-  
enrichment*



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 21528-1:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-970987355d9a/iso-21528-1-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-970987355d9a/iso-21528-1-2004>

© ISO 2004

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax. + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction .....	v
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>4.1</b> <b>Recherche des Enterobacteriaceae</b> (voir l'Annexe B).....	<b>2</b>
<b>4.2</b> <b>Dénombrement par la technique NPP</b> (voir l'Annexe B) .....	<b>3</b>
<b>5</b> <b>Diluants, milieux de culture et réactifs</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b> <b>Appareillage et verrerie</b> .....	<b>7</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>7</b>
<b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon soumis à l'essai</b> .....	<b>7</b>
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>8</b>
<b>9.1</b> <b>Généralités</b> .....	<b>8</b>
<b>9.2</b> <b>Méthode de détection</b> .....	<b>8</b>
<b>9.3</b> <b>Méthode de dénombrement (méthode NPP)</b> .....	<b>8</b>
<b>9.4</b> <b>Isolement et identification pour confirmation</b> .....	<b>9</b>
<b>9.5</b> <b>Repiquage des colonies sélectionnées</b> .....	<b>9</b>
<b>9.6</b> <b>Essais de confirmation biochimique</b> .....	<b>9</b>
<b>10</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>10</b>
<b>10.1</b> <b>Tubes confirmés comme positifs</b> .....	<b>10</b>
<b>10.2</b> <b>Méthode de recherche</b> .....	<b>10</b>
<b>10.3</b> <b>Méthode de dénombrement: calcul du nombre le plus probable (NPP)</b> .....	<b>10</b>
<b>11</b> <b>Précision</b> .....	<b>10</b>
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>10</b>
<b>Annexe A</b> (normative) <b>Diagramme pour la mise en œuvre de la méthode de recherche</b> .....	<b>11</b>
<b>Annexe B</b> (normative) <b>Diagramme pour la mise en œuvre de la technique NPP</b> .....	<b>12</b>

## 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 en général 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. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

Cette première édition de la présente partie de l'ISO 21528, ensemble avec l'ISO 21528-2, annulent et remplacent les normes suivantes:

- ISO 5552:1997, *Viande et produits à base de viande — Recherche et dénombrement des Enterobacteriaceae sans ressuscitation — Technique de NPP et technique de comptage de colonies*;  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-970987355d0a/iso-21528-1-2004>
- ISO 7402:1993, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement sans revivification des Enterobacteriaceae — Technique NPP et méthode par comptage des colonies*;
- ISO 8523:1991, *Microbiologie — Directives générales pour la recherche des Enterobacteriaceae avec pré-enrichissement*.

L'ISO 21528-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

L'ISO 21528 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des Enterobacteriaceae*:

- *Partie 1: Recherche et dénombrement à l'aide de la technique NPP avec préenrichissement*
- *Partie 2: Méthode par comptage des colonies*

## Introduction

La présente partie de l'ISO 21528 se propose de fournir des directives générales pour l'examen des produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement et devant être prises en compte en considération par les organismes élaborant des méthodes d'essai microbiologiques destinées à être appliquées à des aliments. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tout leur détail, ne conviennent pas à certains produits et que, pour certains autres produits, il soit 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 partie de l'ISO 21528 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 existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec la méthode horizontale décrite dans le présent document. Il serait souhaitable que lorsque ces normes viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente partie de l'ISO 21528 si bien que, finalement, les seules divergences restant seront celles nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

ITEH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 21528-1:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-970987355d9a/iso-21528-1-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-970987355d9a/iso-21528-1-2004>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 21528-1:2004

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-970987355d9a/iso-21528-1-2004>

# Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des Enterobacteriaceae —

## Partie 1:

## Recherche et dénombrement à l'aide de la technique NPP avec préenrichissement

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 21528 décrit une méthode pour la recherche des Enterobacteriaceae avec préenrichissement. Elle est applicable

- aux produits pour l'alimentation humaine et animale, et
- aux échantillons d'environnement pour la production et la distribution des aliments.

Le dénombrement est effectué par calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 37 °C (ou 30 °C)<sup>1)</sup> en milieu liquide.

Cette méthode est pertinente

[ISO 21528-1:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-17098735530/iso-21528-1-2004)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-17098735530/iso-21528-1-2004)

- lorsque les microorganismes recherchés nécessitent une revivification avant enrichissement, et
- lorsque le nombre cherché est supposé être compris entre 1 et 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à essai.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application de la présente partie de l'ISO 21528 du fait que ces méthodes sont sujettes à de grandes variations (voir l'Article 11).

### 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 6887-1:1999, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

ISO 6887-2, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 2: Règles spécifiques pour la préparation des viandes et produits à base de viande*

1) En général, on choisit l'incubation à 37°C lorsque les entérobactéries sont recherchées en tant qu'indicateur d'hygiène. Alternativement, la température de 30°C peut être choisie lorsque le dénombrement des entérobactéries est entreprise dans le cadre d'un procédé technologique et comprend les entérobactéries psychrotrophe.

ISO 6887-3, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 3: Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche*

ISO 6887-4, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 4: Règles spécifiques pour la préparation de produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche*

ISO 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

ISO/TS 11133-2:2003, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

**3.1 Enterobacteriaceae**  
microorganismes formant des colonies caractéristiques sur gélose au cristal violet, à la bile et au glucose, fermentant le glucose et donnant une réaction oxydase négative lorsque les essais sont effectués selon les méthodes spécifiées dans la présente partie de l'ISO 21528

**3.2 recherche des Enterobacteriaceae**  
détermination de la présence ou de l'absence de ces bactéries, dans une masse déterminée de produit, lorsque les essais sont effectués conformément à la présente partie de l'ISO 21528

**3.3 dénombrement des Enterobacteriaceae**  
nombre le plus probable d'Enterobacteriaceae par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à essai lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la partie de l'ISO 21528

### 4 Principe

#### 4.1 Recherche des Enterobacteriaceae (voir l'Annexe A)

##### 4.1.1 Préenrichissement en milieu non sélectif liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans l'eau peptonée tamponnée (EPT), puis incubation à 37 °C (ou 30 °C)<sup>1)</sup> pendant 18 h ± 2 h.

##### 4.1.2 Enrichissement en milieu sélectif liquide

Ensemencement d'un bouillon d'enrichissement [bouillon tamponné à la bile, au vert brillant et au glucose (milieu EE)] à partir de la culture obtenue après préenrichissement. Incubation à 37 °C (ou 30 °C)<sup>1)</sup> pendant 24 h ± 2 h.



#### 4.1.3 Isolement et sélection pour confirmation

Ensemencement d'un milieu sélectif solide (gélose à la bile, au cristal violet et au glucose) à partir d'une culture obtenue après enrichissement dans un milieu EE. Incubation à 37 °C (ou 30 °C)<sup>1)</sup>, puis examen après 24 h ± 2 h pour contrôler s'il y a présence de colonies présumées être des colonies d'Enterobacteriaceae en raison de leurs caractéristiques.

#### 4.1.4 Confirmation

Repiquage des colonies d'Enterobacteriaceae présumées sur milieu non sélectif et confirmation au moyen d'essais de fermentation de glucose et de recherche d'oxydase.

### 4.2 Dénombrement par la technique NPP (voir l'Annexe B)

#### 4.2.1 Préenrichissement en milieu non sélectif

Préparation d'une suspension d'échantillon par ajout d'une part de  $x$  ml d'échantillon 9  $x$  ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) et homogénéisation. Préparation d'une ou plusieurs dilutions décimales (en fonction du niveau de contamination supposé) dans l'EPT. Placer dans des tubes 3 × 10 ml de suspension mère, puis préparer 3 × 1 ml de suspension mère dans 9 ml d'ETP et 3 × 1 ml de chaque dilution suivante dans 9 ml d'ETP. Incuber les tubes à 37 °C (ou 30 °C)<sup>1)</sup> pendant 18 h ± 2 h

#### 4.2.2 Enrichissement en milieu sélectif liquide

Ensemencement de tubes séparés d'un bouillon d'enrichissement (milieu EE) à partir de chaque tube de cultures obtenues après préenrichissement (au moins 3 × 3). Ensuite incuber à 37 °C (ou 30 °C)<sup>1)</sup> pendant 24 h ± 2 h.

#### 4.2.3 Isolement et sélection pour confirmation

Ensemencement d'un milieu sélectif solide (gélose à la bile, au cristal violet et au glucose) au moyen d'une anse sur chacune des cultures incubées obtenues après enrichissement en milieu EE et ensuite incuber à 37 °C (ou 30 °C)<sup>1)</sup>. Examiner après 24 h ± 2 h pour contrôler s'il y a présence de colonies présumées être des colonies d'Enterobacteriaceae en raison de leurs caractéristiques.

#### 4.2.4 Confirmation

Repiquage des colonies d'Enterobacteriaceae présumées sur milieu non sélectif et confirmation au moyen d'essais de fermentation de glucose et de recherche d'oxydase.

#### 4.2.5 Calcul

À partir du nombre de tubes confirmés positifs, calcul du nombre le plus probable d'Enterobacteriaceae par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à essai au moyen de la table NPP (voir l'ISO 7218).

## 5 Diluants, milieux de culture et réactifs

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218, l'ISO/TS 11133-1 et l'ISO/TS 11133-2.

### 5.1 Diluant: Eau peptonée tamponnée (EPT)

Voir l'ISO 6887-1:1999, 5.2.2.

L'eau peptonée tamponnée est utilisée comme milieu de préenrichissement non sélectif pour la méthode de dénombrement.

**5.2 Milieux de culture**

**5.2.1 Milieu d'enrichissement: Bouillon tamponné à la bile, au vert brillant et au glucose (milieu EE)**

**5.2.1.1 Composition**

Digestat enzymatique de tissus animaux	10,0 g
Glucose	5,0 g
Hydrogénophosphate de sodium (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	6,45 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,0 g
Bile de bœuf pour usage bactériologique	20,0 g
Vert brillant de qualité bactériologique	0,013 5 g
Eau	1 000 ml

**5.2.1.2 Préparation**

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après ébullition, il soit de  $7,2 \pm 0,2$  à 25 °C.

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

Ne pas stériliser le milieu.

Le milieu peut être conservé jusqu'à 1 mois à 5 °C ± 3 °C.

**5.2.1.3 Essai de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture**

Se reporter à l'ISO/TS 11133-1 pour les définitions des termes sélectivité et productivité. Se reporter à l'ISO/TS 11133-2:2003, Tableau B.3, afin de conduire les essais de performance.

**5.2.2 Géllose à la bile, au cristal violet et au glucose**

**5.2.2.1 Composition**

Digestat enzymatique de tissus animaux	7,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Sels biliaires N° 3	1,5 g
Glucose	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,002 g
Agar	9 g à 18 g <sup>a</sup>
Eau	1 000 ml

<sup>a</sup> Selon le pouvoir gélifiant de l'agar.

**5.2.2.2 Préparation**

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après ébullition, il soit de  $7,4 \pm 0,2$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des fioles stériles (6.5) de capacité appropriée.

Ne pas stériliser le milieu.

Utiliser le milieu fondu dans les 4 h suivant sa préparation.

**5.2.2.3 Préparation des boîtes gélosées**

Transférer immédiatement environ 15 ml du milieu de culture, refroidi entre  $44 \text{ }^\circ\text{C}$  et  $47 \text{ }^\circ\text{C}$  (6.4), dans des boîtes de Petri (6.7) et laisser se solidifier.

Juste avant l'emploi, sécher les boîtes, de préférence sans couvercles et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3) jusqu'à ce que la gélose soit sèche.

Si elles sont préparées à l'avance, les boîtes gélosées non séchées peuvent être conservées, dans des conditions n'affectant pas leur composition, jusqu'à 2 semaines à  $5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**5.2.2.4 Essai de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture**

Se reporter à l'ISO/TS 11133-1 pour les définitions des termes sélectivité et productivité. Se reporter à l'ISO/TS 11133-2:2003, Tableau B.1, afin de conduire les essais de performance.

**5.2.3 Gélose nutritive****5.2.3.1 Composition**

ISO 21528-1:2004

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f5ef1a0-d39a-489b-ac2d-970987355d9a/iso-21528-1-2004>

Extrait de viande	3,0 g
Digestat enzymatique de tissus animaux	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	9 g à 18 g <sup>a</sup>
Eau	1 000 ml
<sup>a</sup> Selon le pouvoir gélifiant de l'agar.	

**5.2.3.2 Préparation**

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,3 \pm 0,2$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des fioles stériles (6.5) de capacité appropriée.

Stériliser dans un autoclave (6.1) réglé à  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 15 min.

**5.2.3.3 Préparation des boîtes de gélose**

Transférer des prises d'essai d'environ 15 ml du milieu de culture, fondu et refroidi à environ  $47 \text{ }^\circ\text{C}$ , dans des boîtes de Petri (6.7) et laisser se solidifier.