

---

---

**Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes —**

Partie 1:

**Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses**

<https://standards.iteh.ai/en/standards/ISO/20776-1/2019>

*Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices —*

*Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases*



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

ISO 20776-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cfc459ae-0dee-4fb2-8ed7-e9458f6c7d6b/iso-20776-1-2019>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +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

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Modes opératoires d'essai</b> .....	<b>3</b>
4.1 Généralités.....	3
4.2 Milieu.....	3
4.3 Agents antimicrobiens.....	3
4.3.1 Généralités.....	3
4.3.2 Préparation des solutions mères.....	4
4.3.3 Préparation des solutions de travail.....	4
4.3.4 Préparation de plaques de microdilution.....	4
4.3.5 Stockage des plaques de microdilution.....	5
4.4 Préparation de l'inoculum.....	5
4.4.1 Généralités.....	5
4.4.2 Méthode de culture en bouillon.....	5
4.4.3 Méthode de mise en suspension directe des colonies.....	5
4.5 Ensemencement des plaques de microdilution.....	6
4.6 Incubation des plaques de microdilution.....	6
4.7 Résultats des lectures.....	6
4.8 Situations particulières pour lesquelles le résultat de la CMI peut donner des résultats peu fiables.....	7
<b>5 Contrôle de qualité</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe A (informative) Exigences relatives au bouillon Mueller-Hinton</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe B (informative) Solvants et diluants pour la réalisation des solutions mères des agents antimicrobiens sélectionnés</b> .....	<b>11</b>
<b>Annexe C (informative) Préparation de dilutions de travail des agents antimicrobiens à utiliser lors des essais de sensibilité de dilution en bouillon</b> .....	<b>17</b>
<b>Annexe D (informative) Cas d'essai particuliers</b> .....	<b>18</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>19</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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 212, *Laboratoires d'analyses de biologie médicale et systèmes de diagnostic in vitro*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 20776-1:2006), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- révision en un document concernant uniquement les performances de microdilution en bouillon;
- suppression des informations et définitions relatives à la concentration critique S, I, R;
- déplacement des tableaux intégrés vers les annexes;
- suppression du tableau des plages de contrôle de qualité;
- mise à jour du tableau (désormais [Annexe B](#)) relatif aux solvants et diluants généralement utilisés pour les agents antimicrobiens;
- mise à jour des informations sur les milieux de culture spécifiques et les performances de la méthode pour les agents antimicrobiens spécifiques actuellement utilisés.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 20776 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

La présente version corrigée de l'ISO 20776:2019 inclut la correction suivante:

- Correction de la valeur du pH du diluant pour l'ampicilline de 8,0 à 6,0 dans l'[Annexe B](#).

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

ISO 20776-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cfc459ae-0dee-4fb2-8ed7-e9458f6c7d6b/iso-20776-1-2019>

## Introduction

Les essais de sensibilité in vitro aux antimicrobiens sont réalisés sur des micro-organismes suspectés de provoquer une maladie, en particulier si le micro-organisme est connu pour appartenir à une espèce qui peut montrer une résistance aux agents antimicrobiens fréquemment employés. Les essais sont également importants pour la surveillance de la résistance, pour les études épidémiologiques de la sensibilité et pour comparer les nouveaux agents antimicrobiens à ceux déjà existants.

Les méthodes de dilution sont employées pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des agents antimicrobiens pour les essais de sensibilité antimicrobienne. Les méthodes de détermination des CMI sont employées dans la surveillance de la résistance, pour la définition et l'identification des phénotypes de type sauvage, pour comparer l'activité des nouveaux agents antimicrobiens, ainsi que pour établir la sensibilité des micro-organismes aux résultats équivoques avec les essais de routine, pour les micro-organismes dont les essais de routine peuvent ne pas être fiables et lorsqu'un résultat quantitatif est nécessaire à la décision clinique. Dans les essais de dilution, les micro-organismes sont soumis à essai afin de déterminer leur capacité à produire une croissance visible dans un bouillon (dilution en bouillon) ou sur des boîtes gélosées (dilution en gélose) contenant des dilutions en série de l'agent antimicrobien.

La concentration la plus faible d'un agent antimicrobien (en mg/l) qui, dans des conditions in vitro définies, empêche l'apparition d'une croissance visible d'un micro-organisme au cours d'une période définie, est connue sous le nom de CMI. Pour le clinicien, la CMI constitue une indication sur la sensibilité de l'organisme à l'agent antimicrobien et facilite les décisions de traitement. Un contrôle strict de la méthode et une normalisation sont nécessaires à la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires des essais de CMI en bouillon. Les CMI s'étendent généralement sur deux ou trois dilutions avec une valeur centrale dominante.

La **dilution en bouillon** est une technique dans laquelle des contenants comportant des volumes identiques de bouillon avec des solutions d'agent antimicrobien à des concentrations augmentant de manière incrémentielle (généralement de manière géométrique) sontensemencés avec un nombre connu de micro-organismes.

La **microdilution en bouillon** indique un essai par dilution en bouillon sur des plaques de microdilution.

La méthode décrite dans le présent document est conçue pour soumettre à essai des cultures pures de bactéries aérobies qui sont facilement cultivables en les incubant pendant une nuit sur une gélose et qui se cultivent bien dans des plaques normalisées de microdilution contenant du bouillon Mueller-Hinton normalisé (volume  $\leq 200 \mu\text{l}$ ), ce qui peut nécessiter des modifications en fonction de l'agent antimicrobien soumis à essai.

La méthode de microdilution en bouillon décrite dans le présent document est essentiellement la même que celles utilisées dans de nombreux pays, ainsi que les méthodes publiées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>[1]</sup> et par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).<sup>[2]</sup> Ces méthodes s'appuient sur la méthode décrite par Ericsson et Sherris<sup>[3]</sup>.

# Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes —

## Partie 1:

# Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses

**AVERTISSEMENT** — L'utilisation du présent document peut impliquer des matériaux, des opérations et des équipements dangereux. Le présent document n'est pas destiné à traiter tous les problèmes de sécurité associés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur du présent document d'établir les pratiques de santé et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité de toute autre restriction avant utilisation.

## 1 Domaine d'application

Le présent document décrit une méthode de référence, la microdilution en bouillon, pour déterminer les CMI. La CMI peut constituer un guide pour le clinicien et reflète l'activité du médicament dans les conditions d'essai décrites, en tenant compte d'autres facteurs tels que la pharmacologie du médicament, la pharmacocinétique ou les mécanismes de résistance bactérienne. Cela permet de classer les bactéries comme étant «sensibles» (S), «intermédiaires» (I) ou «résistantes» (R). En outre, les distributions de CMI peuvent être utilisées pour définir les populations bactériennes de type sauvage ou non sauvage. Bien que l'interprétation clinique de la valeur de la CMI se trouve au-delà du domaine d'application du présent document, des modifications de la méthode de base sont nécessaires pour certaines combinaisons agent antimicrobien-bactérie afin de faciliter l'interprétation clinique. Ces modifications sont incluses dans une annexe séparée du présent document. Il est nécessaire de comparer les autres méthodes d'essai de sensibilité (par exemple, les méthodes de diffusion en gélose ou les dispositifs d'essai de diagnostic) à cette méthode de référence à des fins de validation et pour garantir des résultats comparables et fiables.

## 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

## 3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

**3.1**  
**agent antimicrobien**

substance d'origine biologique, semi-synthétique ou synthétique qui inhibe la croissance d'une bactérie ou l'élimine et qui est, par conséquent, potentiellement utilisée dans le traitement des infections

Note 1 à l'article: Les désinfectants, les antiseptiques et les conservateurs ne sont pas inclus dans cette définition.

**3.2**  
**titre**

mesure de l'activité d'un médicament, exprimée en termes de quantité requise pour produire un effet d'une intensité donnée

Note 1 à l'article: Le titre est exprimé sous forme de fraction massique en milligrammes par gramme (mg/g), sous forme d'activité en unités internationales (UI) par gramme ou sous forme de fraction volumique ou de fraction massique en pourcentage ou en concentration de quantité de substance (fraction molaire) en mole par litre d'ingrédients dans la substance d'essai.

**3.3**  
**concentration**

quantité d'un agent antimicrobien dans un volume défini de liquide

Note 1 à l'article: La concentration est exprimée en mg/l.

Note 2 à l'article: Le mg/l est l'unité utilisée par le système ISO.

**3.4**  
**solution mère**

solution initiale utilisée pour des dilutions ultérieures

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

**3.5**  
**concentration minimale inhibitrice**

**CMI**

concentration la plus faible qui, dans des conditions in vitro définies, empêche la croissance visible de bactéries en une période de temps définie

ISO 20776-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cf459ae-0dee-4fb2-8ed7-c94581bc7d6b/iso-20776-1-2019>

Note 1 à l'article: La CMI est exprimée en mg/l.

**3.6**  
**concentration critique**

**CC**

valeurs spécifiques de paramètres, tels que les CMI, sur la base desquelles une bactérie peut être affectée aux catégories cliniques «sensible», «intermédiaire» et «résistante»

Note 1 à l'article: Pour les concentrations critiques interprétatives actuelles, se référer aux dernières publications des organisations employant cette méthode de référence (par exemple, le CLSI et l'EUCAST).

**3.7**  
**souche sauvage**

absence de mécanisme de résistance connu vis-à-vis de l'agent antimicrobien pour une souche donnée

**3.8**  
**souche de référence**

bactérie répertoriée, caractérisée avec des phénotypes et/ou des génotypes de sensibilité antimicrobienne stables et définis

Note 1 à l'article: Les souches de référence sont conservées comme des cultures mères dont les cultures de travail sont issues. Elles peuvent être obtenues à partir de collections de culture et utilisées pour le contrôle de la qualité.



**3.9****dilution en bouillon**

technique dans laquelle les contenants sont remplis avec des volumes appropriés d'une solution d'agent antimicrobien, dont la concentration augmente de façon incrémentielle (en général de raison 2), et des volumes appropriés de bouillon avec un inoculum bien défini

Note 1 à l'article: L'objectif de cette méthode est de déterminer la CMI.

**3.10****microdilution**

réalisation de la dilution en bouillon dans des plaques de microdilution ayant un volume d'essai final  $\leq 200 \mu\text{l}$  par cupule

**3.11****bouillon**

milieu liquide utilisé pour la croissance in vitro de bactéries

Note 1 à l'article: Pour la méthode de référence en bouillon, le milieu est un bouillon Mueller-Hinton normalisé (voir l'[Annexe A](#)).

**3.12****inoculum**

nombre de bactéries dans une suspension, calculé par rapport au volume final

Note 1 à l'article: L'inoculum est exprimé en unités formant colonie par millilitre (UFC/ml).

**3.13****effet de l'inoculum**

modification de la CMI liée à une modification de l'inoculum en UFC/ml

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

**4 Modes opératoires d'essai**

[ISO 20776-1:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cfc459ae-0dec-4fb2-8ed7-e9458f6c7d6b/iso-20776-1-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cfc459ae-0dec-4fb2-8ed7-e9458f6c7d6b/iso-20776-1-2019>

**4.1 Généralités**

Les essais sont réalisés dans des plaques de microdilution en polystyrène. La méthode est basée sur la préparation de solutions de travail d'agent antimicrobien dans des volumes de  $50 \mu\text{l}$  (avec l'ajout d'un inoculum également dans un volume de  $50 \mu\text{l}$ ) ou dans un volume de  $100 \mu\text{l}$  (avec l'ajout d'un maximum de  $10 \mu\text{l}$  de volume d'inoculum) par cupule.

**4.2 Milieu**

Le bouillon Mueller-Hinton doit être utilisé (voir l'[Annexe A](#) pour plus de détails et l'[Annexe D](#) pour les cas d'essai particuliers).

**4.3 Agents antimicrobiens****4.3.1 Généralités**

Les agents antimicrobiens doivent être obtenus directement du fabricant ou de sources commerciales fiables; les préparations pharmaceutiques à usage clinique ne sont pas acceptables. Les agents antimicrobiens doivent être fournis sous forme de poudres avec un numéro de lot, un titre, une date de péremption et des détails concernant les conditions de stockage recommandées. Les substances doivent être conservées dans des contenants hermétiquement fermés, dans l'obscurité, à la température recommandée par le fournisseur avec un dessiccant. Il convient de répartir les agents hygroscopiques en aliquots, dont un est utilisé pour chaque essai.

Pour éviter toute condensation, il convient de réchauffer les contenants à température ambiante avant de les ouvrir.

### 4.3.2 Préparation des solutions mères

L'utilisation d'une balance analytique étalonnée est nécessaire pour peser les agents antimicrobiens. Il doit être tenu compte du titre de la poudre en utilisant la formule suivante pour obtenir la quantité de substance d'agent antimicrobien ou le volume de diluant nécessaire pour une solution normalisée:

$$m = \frac{V \times \rho}{P} \quad (1)$$

$$V = \frac{m \times P}{\rho} \quad (2)$$

où

$\rho$  est la concentration de la solution mère, en mg/l;

$m$  est la masse de l'agent antimicrobien (poudre), en g;

$P$  est le titre de l'agent antimicrobien (poudre), en mg/g;

$V$  est le volume de diluant, en l.

Il convient que les concentrations de solutions mères soient de 1 000 mg/l ou plus, même si la solubilité de certains agents est limitée. Les concentrations réelles de solutions mères dépendront de la méthode de préparation des solutions de travail (dilution en série). Il convient de dissoudre et de diluer les agents dans de l'eau distillée stérile, sauf indication contraire du fabricant. Certains agents nécessitent d'autres solvants (voir l'[Annexe B](#)).

NOTE Pour les nouveaux agents antimicrobiens non identifiés dans l'[Annexe B](#) du présent document, consulter les informations du fabricant concernant le solvant et le diluant les plus appropriés pour cet agent spécifique. La stérilisation des solutions n'est généralement pas nécessaire. Si nécessaire, il convient d'effectuer la stérilisation par filtration membranaire et de comparer les échantillons avant et après la stérilisation par une analyse afin de s'assurer qu'aucune adsorption ne s'est produite.

À moins que des informations sur la stabilité des solutions mères dans des conditions de stockage spécifiées ne soient disponibles, il convient de les préparer au dernier moment pour chaque lot d'essai.

### 4.3.3 Préparation des solutions de travail

La plage de concentrations sélectionnée pour les essais dépend des micro-organismes et de l'agent antimicrobien. La plage choisie doit permettre de déterminer l'ensemble des CMI possibles des souches de référence appropriées. Une série de dilutions de raison 2 basée sur 1 mg/l est préparée en bouillon Mueller-Hinton. Il convient de ne pas préparer les dilutions par étapes de dilutions en série, mais de les préparer conformément au mode opératoire indiqué dans l'[Annexe C](#). Les solutions de travail doivent être utilisées le même jour, à moins que des informations sur la stabilité des solutions dans des conditions de stockage spécifiées soient disponibles.

### 4.3.4 Préparation de plaques de microdilution

Les solutions de travail sont distribuées dans des plaques de microdilution à 50 µl/cupule avec le double des concentrations finales souhaitées de l'agent antimicrobien ou à 100 µl par cupule aux concentrations finales souhaitées.

Il convient d'inclure au moins une cupule, contenant 50 µl ou 100 µl de milieu dépourvu d'agent antimicrobien pour servir de témoin de croissance pour chaque souche soumise à essai. De la même manière, il convient d'inclure une cupule contenant 100 µl de milieu dépourvu d'agent antimicrobien comme cupule témoin négative non ensemencée pour chaque type de micro-organisme soumis à essai.

#### 4.3.5 Stockage des plaques de microdilution

Les plaques remplies peuvent être utilisées immédiatement ou être stockées jusqu'à une durée maximale de trois mois, ou jusqu'à ce que le contrôle de qualité documenté ou toute autre preuve indique la dégradation de l'agent antimicrobien. Pour le stockage, il convient que les plaques remplies soient enfermées dans des sacs en plastique et immédiatement placées dans un congélateur à  $\leq -60$  °C, sauf si les agents antimicrobiens sont reconnus comme stables à des températures plus élevées.

Les plaques ne doivent pas être stockées dans un congélateur autodégivrant et les solutions antimicrobiennes décongelées ne doivent pas être recongelées, car des cycles de congélation-décongélation répétés accélèrent la dégradation de certains agents antimicrobiens, en particulier les  $\beta$ -lactamines.

Laisser les plaques congelées décongeler pendant 2 h au maximum et les inoculer au plus tard 4 h après leur retrait du congélateur.

### 4.4 Préparation de l'inoculum

#### 4.4.1 Généralités

La normalisation de l'inoculum est essentielle pour garantir la reproductibilité et l'exactitude des essais de sensibilité par la méthode de microdilution en bouillon. En conséquence, des vérifications de pureté et des dénombrements de colonies viables doivent être effectués sur chaque isolat soumis à essai avec ce mode opératoire de référence.

#### 4.4.2 Méthode de culture en bouillon

L'inoculum peut être préparé en diluant une culture en bouillon ou en mettant en suspension en bouillon plusieurs colonies à la morphologie similaire (si possible) issues d'une culture après une nuit sur un milieu gélosé non sélectif à l'aide d'une anse stérile ou d'un écouvillon. Lors de la mise en suspension de colonies, il convient de choisir des colonies à la morphologie similaire pour éviter toute contamination d'autres espèces ou l'apparition de variants atypiques de la même espèce.

Le bouillon utilisé ne doit pas être antagoniste vis-à-vis de l'agent antimicrobien soumis à essai. Le bouillon est incubé à  $(35 \pm 1)$  °C jusqu'à ce que la croissance atteigne une turbidité supérieure ou égale à celle de l'étalon McFarland 0,5.<sup>[4]</sup> Si nécessaire, la culture est ajustée avec une solution saline ou un bouillon afin d'obtenir une turbidité équivalente à l'étalon McFarland 0,5. Cela peut être effectué en utilisant un dispositif photométrique (en utilisant une longueur d'onde de 625 nm et une trajectoire de cuvette de 1 cm, l'absorbance sera comprise entre 0,08 et 0,13) ou en employant un néphélomètre étalonné de manière adéquate. En variante, cela peut être atteint visuellement en comparant l'aspect de lignes noires à travers l'inoculum et à travers une suspension à l'étalon McFarland 0,5 (l'inoculum et l'étalon McFarland doivent se trouver dans des tubes de la même taille) ou avec toute autre méthode qui donne des UFC/ml reproductibles. L'inoculum final doit être de  $5 \times 10^5$  UFC/ml (plage cible de  $2 \times 10^5$  UFC/ml à  $8 \times 10^5$  UFC/ml).

NOTE Un étalon McFarland 0,5 peut être produit en ajoutant une partie aliquote de 0,5 ml de chlorure de baryum ( $\text{BaCl}_2$ ) à 0 048 mol/l (11,72 g/l de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) à 99,5 ml d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) à 0,18 mol/l avec une agitation constante pour maintenir une suspension.

#### 4.4.3 Méthode de mise en suspension directe des colonies

Plusieurs colonies à la morphologie similaire sont prélevées à l'aide d'une anse stérile d'un milieu nutritif gélosé non sélectif incubé à  $(35 \pm 1)$  °C pendant 18 h à 24 h, sauf si une incubation plus longue est nécessaire, et transférées dans le bouillon stérile ou dans une solution saline. La suspension est ajustée pour donner une turbidité équivalente à celle d'un étalon McFarland 0,5, tel que décrit en 4.4.2 pour la méthode de culture en bouillon.

Pour tous les micro-organismes, le nombre de cellules viables (en UFC/ml) dans l'inoculum final dépend de la phase de croissance de la culture. Cet effet est plus prononcé pour les micro-organismes exigeants,