

Technique des dilutions

La technique des dilutions figure dans la norme AFNOR NF V 08 010 de mars 1996 (remplace la norme AFNOR NF V 08 010 de juin 1982) ; il existe parallèlement une norme ISO 6887 de 1983.

Les dilutions sont presque toujours des dilutions successives décimales de raison 10: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ...

Si les dilutions sont réalisées dans un volume de 9 mL de diluant en tube à essais, les prélèvements sont faits soit à la pipette stérile à usage unique de 1 mL, soit à l'aide d'une pipette automatique prélevant et délivrant 1 000 μ L ; le volume final est de 10 mL. Si elles sont réalisées dans un volume plus faible, par exemple 0,9 mL ou 900 μ L en tube à hémolyse, le prélèvement se fait alors à la pipette automatique prélevant et délivrant un volume de 100 μ L ; le volume final est de 1 mL.

L'incertitude des mesures des volumes ne doit pas excéder 2 %.

Entre la préparation de la suspension, ses dilutions et la mise en culture, il ne doit pas s'écouler plus de 45 minutes.

Technique de dilution

- Marquer les tubes de diluant (Exemple : 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}).
- Prélever aseptiquement 1 mL de la suspension mère à l'aide d'une pipette graduée stérile de 1 mL munie d'une poire à aspiration ; l'homogénéisation du prélèvement se fait par aspiration et refoulement trois fois, ou par l'utilisation d'un homogénéisateur (norme NF ISO 7218).
- Transférer aseptiquement le mL prélevé dans le premier tube 10^{-1} . la pipette ne devant pas pénétrer dans les 9 mL de diluant.
- Jeter la pipette utilisée dans un conteneur approprié. À l'aide d'une deuxième pipette stérile de 1 mL, procéder de même du tube 10^{-2} au tube 10^{-2} .
- Faire de même pour les deux derniers tubes, en utilisant à chaque prélèvement une pipette nouvelle.

Technique d'ensemencement dans la masse

- Marquer les boîtes de Pétri vides (exemple : 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}).
- Homogénéiser les tubes de dilution.
- À l'aide d'une pipette stérile de 1 mL, transférer aseptiquement, en double, 1 mL de la dilution 10^{-4} sous forme de gouttes dans le fond de chacune des deux boîtes de Petri.
- Avec cette même pipette, procéder identiquement pour les dilutions 10^{-3} puis 10^{-2} .
- Couler dans la zone d'aseptie 15 mL de milieu gélose maintenu à 47°C dans chaque boîte de Petri ; cette addition doit avoir lieu au plus tard 15 minutes après le dépôt des gouttes.
- Mélanger l'inoculum au milieu, par rotation délicate dans les deux sens.
- Laisser le milieu prendre en masse : les boîtes sont sur une surface plane, non chaude, dans la zone de stérilité, le couvercle légèrement déplacé (ne pas excéder 10 mm).
- Une fois le milieu solidifié, retourner les boîtes et les incuber dans l'étuve à la température convenable pendant le temps indiqué.

Technique d'ensemencement en surface

- Marquer les boîtes de milieu gélose (exemple : 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}).
- Homogénéiser les tubes de suspension mère et de dilution.
- À l'aide d'une pipette stérile de 1 mL, transférer aseptiquement, en double, 0,1 mL de la dilution 10^{-2} à la surface de chacune des deux boîtes de milieu gélose séchées.
- Avec cette même pipette, procéder de manière identique pour la dilution 10^{-1} puis 10^0 .
- Étaler l'inoculum, avec soin et rapidement, à la surface du milieu gélose, à l'aide d'un étaleur stérile en évitant de toucher les parois de la boîte, ou à l'aide de billes de verre agitées énergiquement et ensuite éliminées.
- Laisser sécher 15 minutes à température du laboratoire.
- Incuber les boîtes retournées à l'étuve, à la température convenable, pendant le temps indiqué.