



Adaptation, maladie et résistance

Kit Antibiogramme 2 souches

Réf :
117 089

Français – p 1

Version : 2301

Kit Antibiogramme 2 souches

1. Objectifs

Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé.
Comparer le comportement de 2 bactéries différentes vis-à-vis d'une sélection de 4 antibiotiques différents.
Chaque binôme préparera 2 boîtes : une pour tester *Escherichia coli* et une *Staphylococcus epidermidis*.
Les manipulations doivent être réalisées en atmosphère stérile.

Principe de l'antibiogramme :

L'antibiotique migre à partir du disque créant ainsi une zone circulaire de gélose imbibée d'antibiotique. En fonction de la sensibilité du micro-organisme vis-à-vis de la substance biocide, apparaît autour du disque, une zone d'inhibition plus ou moins grande où la croissance bactérienne est stoppée. Chaque antibiotique possède un abaque qui présente le rapport entre le diamètre de la zone d'inhibition de culture autour du disque et la concentration de l'antibiotique. On peut ainsi déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique (CMI).

2. Composition

- * Composition pour 25 binômes
- Milieu de culture Mueller Hinton 5 x 200 mL prêt à couler (20 ml par boîte de Pétri)

- Disques antibiotiques en tube distributeur de 50 disques :

- Pénicilline 2 µg (x 50)
- Ampicilline 10 µg (x 50)
- Tétracycline 30 µg (x 50)
- Acide Nalixidique 30 µg (x 50)

Attention : une pastille de dessicant est présente dans chaque tube d'antibiotiques, ne pas confondre celle-ci avec l'antibiotique



- Inoculum bactérien *Escherichia coli*, culture dense lyophilisée. (Souche pasteur).
- Inoculum bactérien *Staphylococcus epidermidis*, culture dense lyophilisée
- Tubes d'eau physiologique stérile (2 x 50ml)

Précisions : la souche est considérée comme un inoculum. Cela permet de réaliser un test antibiogramme. Cela ne constitue pas une fourniture de souches pures.

3. Stockage et conservation



	Stockage	Conservation avant ouverture
Milieu de culture Mueller Hinton	+ 4 °C	Plusieurs mois - voir date de péremption sur emballage
Tubes disques antibiotiques	- 20 °C ou 4 °C	Plusieurs mois - voir date de péremption sur emballage
Inocula bactériens et tubes stériles d'eau physiologique	+ 4 °C	4 mois environ après réception

4. Matériel nécessaire (Non fourni)

- Boîte de Pétri 90 mm (x 50)
- Pipette pasteur stérile 1 mL (x 50)
- Pince stérile (x 50)
- Râteaux (x 40)
- Bec électrique (atmosphère stérile)
- Bain marie ou micro-onde
- Incubateur ou étuve
- Vortex (optionnel)

5. Préparation des boîtes de gélose

* Réchauffer le contenu des bouteilles de Mueller Hinton :

- Soit au bain marie, 90°C, remuez régulièrement pour homogénéiser
- Soit au micro-onde, remplacez le bouchon métallique par du coton cardé stérile par exemple, réchauffez par session de 1 à 2 minutes en remuant régulièrement pour homogénéiser

* Lorsque le milieu est liquide :

- Coulez chaque boîte et laissez refroidir.

Une fois solidifiées, les boîtes de gélose peuvent être stockées plusieurs heures au froid (couvercle vers le bas).

6. Préparation des inocula

- Reprendre le lyophilisat avec 3 ml d'eau physiologique fourni dans le kit.
- Bien agiter (bouchons fermés).
- Transférer les 1 mL de la solution d'inoculum dans les 47 mL d'eau physiologique stérile (dilution finale de 1/50^{ème}) qui correspond à un trouble de 1 sur échelle de McFarland.
- Suivre la même procédure pour le deuxième inoculum.

Précisions : chacune des souches fournies ici est considérée comme un inoculum destiné à la réalisation du test antibiogramme. Cela ne constitue pas une fourniture de souches pures. Les souches bactériennes mise en œuvre répondent aux exigences de sécurité pour des expériences en classe, elles sont déjà utilisées en laboratoire et en TP d'enseignement depuis plusieurs années. Pour plus de précision consulter le paragraphe info souches bactériennes ci-après en annexe.

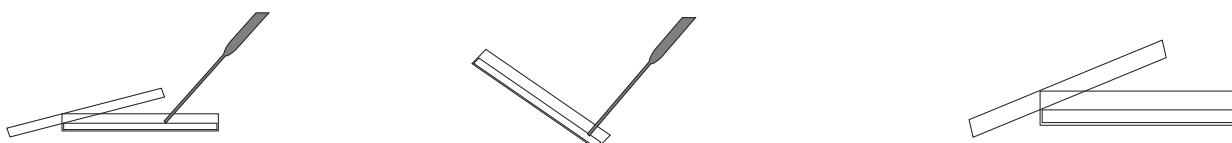
Il est à noter que la technique d'ensemencement qui associe une réhydratation d'un lyophilisat puis inondation de boîtes de Pétri par pipette pasteur simplifie la préparation et réduit les temps de manipulation. Toutefois ce type d'expérience doit être l'occasion de sensibiliser les élèves aux risques encourus lors de manipulations microbiennes, une initiation au respect des pratiques de sécurité en laboratoire est essentielle. C'est également l'opportunité de mettre en perspective ce risque face aux situations de la vie en collectivité que vivent quotidiennement les élèves (hygiène des mains, contaminations virales). **Le kit de sensibilisation à l'hygiène des mains 107854 peut être une bonne manière d'aborder le sujet.**

7. Inondation des boîtes de milieu Mueller Hinton

Prélever environ 1 mL de suspension bactérienne. Inonder la gélose.

Répartir la suspension sur toute la surface de la boîte de Pétri.

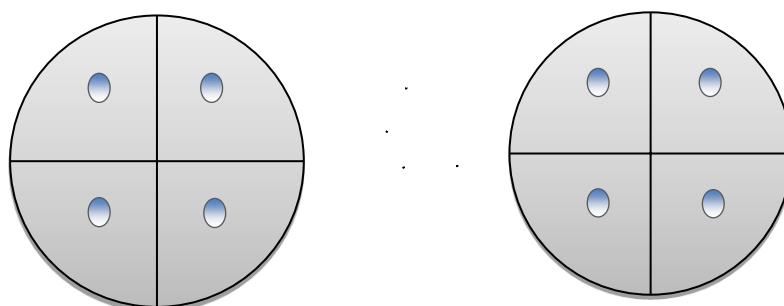
Laisser la boîte de Pétri légèrement entre-ouverte. Laissez sécher 5 min



Identifier chaque boîte *E. coli* et *S. epidermidis*

8. Dépôt des disques antibiotiques

À l'aide d'une pince stérile (ou pince inox flambée à l'alcool), déposer les 4 disques d'antibiotiques différents selon schéma ci-contre.



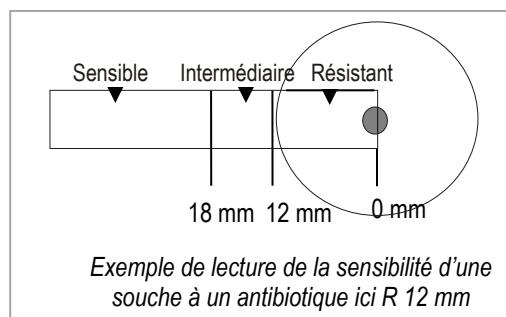
9. Incubation



Incubez les boîtes de Pétri entre 24h et 48h à 37°C, couvercles vers le haut pour voir apparaître les cercles d'inhibition.

10. Lecture des résultats

Le diamètre d'inhibition indique le phénotype de relation à l'antibiotique. Exemple :



Observez et mesurez les différents diamètres d'inhibition autour de chaque pastille et calculez la CMI.

Résultats observés pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis*.

	<i>E. coli</i>	<i>S.epidermidis</i>
Pénicilline 2 µg	R 0 mm	R 8 mm
Ampicilline 10 µg	I 13 mm	S 18 mm
Tétracycline 30 µg	S 18 mm	S 35 mm
Acide Nalixidique 30 µg	S 26 mm	I 12 mm

11. Élimination

Éliminer les boîtes, tubes de dilutions et flacons de lyophilisats avec une méthode normalisée de traitements des déchets biologiques pour souches bactériennes de laboratoire P1.

L'étape importante en sécurité microbiologique est la destruction des boîtes ensemencées après le TP. Le passage à l'autoclave ou la désinfection du matériel est obligatoire.

12. Service après-vente

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique au 09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé)**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

09 69 32 02 10*

* prix d'un appel local, non surtaxé

ANNEXE

Information sur les souches bactériennes

Les souches proposées dans le kit antibiogramme (Réf. 117 089) sont livrées sous forme d'inocula lyophilisés. Il s'agit de souche d'*E coli* et *S epidermidis* autorisées sur la liste des souches conseillées pour l'enseignement et dont la délivrance aux établissements d'enseignements techniques est autorisée par la circulaire du 8 août 1973 parue au Journal Officiel du 6 novembre 1973 et actualisée par l'Institut Pasteur en 1994. Ces souches sont sensibles à la plupart des antibiotiques existants. Ce ne sont pas, par origine et par définition, des bactéries pathogènes.

Escherichia coli est une espèce bactérienne commensale de la flore intestinale des humains et des animaux à sang chaud. Il existe une très grande diversité de souches (plus de 200). Certaines sont pathogènes par acquisition de gènes spécifiques codant des entérotoxines pouvant entraîner des phénomènes de diarrhées. Ces souches pathogènes sont clairement identifiées par leur sérotype et leur serovar. Leur utilisation est strictement encadrée.

L'espèce *E. coli* est l'organisme vivant le mieux connu, le plus étudié et le plus utilisé. On peut assurer son innocuité.

Staphylococcus epidermidis est une espèce bactérienne commensale de la peau humaine. Elle ne présente aucun caractère de pathogénicité. Certaines souches rencontrées en milieu hospitalier présentent des résistances aux antibiotiques et peuvent être retrouvées dans des cas d'infections nosocomiales probablement comme souches concomitantes.

Pour plus d'information :
Professeur Christiane Forestier
Laboratoire de Bactériologie
Faculté de Pharmacie
CLERMONT FERRAND

