

Kit antibiogramme

Réf. ANTI.

A RECEPTION DU COLIS :

Vérifier la composition du colis indiquée ci-dessous

Stocker les articles du colis dans les bonnes conditions :

Ouvrir le sachet principal

- ⚠ Placer le sachet noté « antibiotiques » et les deux boîtes de pétriensemencées à **+ 4°C** ⚠
- ⚠ Placer les bouteilles notées « Columbia » ainsi que le sachet noté « Q » et les sachets de boîtes de pétri à **température ambiante** ⚠

Attention : Ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une bonne conservation des produits du kit.

Prévoir de repiquer les deux souches 4 jours avant le TP afin de s'assurer que les cultures sont toujours actives suite au transport (page 3).

Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité

COMPOSITION DU COLIS :

- **1 sachet noté « antibiotiques »** à stocker à **+ 4°C** contenant :
 - 50 disques d'Ampicilline
 - 50 disques de Pénicilline
 - 50 disques de Tétracycline
 - 50 disques d'Acide Nalidixique
- **2 boîtes de pétriensemencées** à stocker à **+4°C** contenant :
 - 1 boîte de pétri d'E coli
 - 1 boîte de pétri de Bacillus megaterium
- **3 bouteilles notées « Columbia »** contenant environ 1 L de milieu Columbia gélifié à stocker à **température ambiante**
- **2 sachets de 33 boîtes de pétri** chacun à stocker à **température ambiante**
- **1 sachet noté Q** à stocker à **température ambiante** contenant :
 - 1 tube stérile contenant 50 mL d'eau stérile
 - 2 tubes stérile de 50 mL
 - 40 poires compte-gouttes
 - 2 sachets de 20 ensemenceurs
 - 1 tube noté « étalon Mac Farland »

MATERIEL NECESSAIRE :

- Micro-onde ou éventuellement bain marie
- Gant anti-chaaleur ou manique de préhension
- Pince
- Bec électrique ou bunsen
- Feutre
- Bécher

OBJECTIFS COGNITIFS

Durant cette séance de TP, les élèves (20 binômes) vont intégrer des connaissances pratiques quant à la bonne manipulation des bactéries et des antibiotiques. La séance suivante sera consacrée à l'exploitation des résultats des antibiogrammes (voir la partie interprétations et conclusions)

FICHE PREPARATEUR

1) PREPARATION DES BOITES DE PETRI (LA VEILLE OU QUELQUES JOURS AVANT LE TP)

Avec un bain-marie :

Placer les bouteilles de milieu gélosé notée « Columbia » dans un bain marie de manière à faire fondre le milieu (en veillant à dévisser le bouchon)

Utiliser des gants anti-chaleur pour manipuler la bouteille et l'agiter pour homogénéiser le milieu

Laisser au bain-marie jusqu'à ce que le milieu soit bien liquide

Répartir le contenu fondu dans les 50 boîtes de pétri à reboucher tout de suite après remplissage

Attendre que le milieu se solidifie pour retourner les boîtes et les stocker à +4°C

Avec un micro-onde :

Placer la bouteille de milieu gélosé notée « Columbia » dans le micro-onde en veillant à dévisser le bouchon

Utiliser des gants anti-chaleur pour surveiller la fonte et homogénéiser le milieu

Laisser fondre jusqu'à ce que le milieu soit bien liquide

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : Manipuler en condition stérile

Répartir le contenu fondu dans les boîtes de pétri à reboucher tout de suite après remplissage

Attendre que le milieu se solidifie pour retourner les boîtes et les stocker à +4°C

☐ **NB** ☐ : vous pouvez garder les boîtes de milieu à l'envers au réfrigérateur à +4°C pendant deux semaines maximum

2) REPIQUAGE (QUELQUES JOURS AVANT LE TP)

Prévoir de repiquer les deux souches 4 jours avant le TP afin de s'assurer que les cultures sont toujours actives suite au transport. Cette étape est nécessaire pour la préparation de la suspension utilisée au cours du TP.

***Bacillus megaterium* nécessite d'être repiqué 1 fois par semaine tandis que *E. coli* peut être repiqué seulement toutes les 3 semaines.**

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : Manipuler en condition stérile et bien se laver les mains avant et après manipulation. Décontaminer les ustensiles utilisés après usage (javel, eau oxygénée, UV, autoclave...)

Prélever avec un ensemencateur une colonie de la boîte de pétri ensemencée de *E. coli*

Strier avec cet ensemencateur une boîte de milieu Columbia

Répéter cette opération sur 2 autres boîtes de milieu Columbia

Noter ces boîtes « *E. coli* » avec la date du jour

Mettre à pousser entre 25 et 35°C jusqu'au lendemain

Prélever avec un ensemenceur une colonie de la boîte de pétri ensemencée de *B. megatherius*.
Strier avec cet ensemenceur une boîte de milieu Columbia
Rétérer cette opération sur 2 autres boîtes de milieu Columbia
Noter ces boîtes « *B. megatherius* » avec la date du jour
Mettre à pousser entre 25 et 35°C jusqu'au lendemain.

☐NB☐ : Vous obtenez 3 boîtes repiquées pour chacune des deux souches.

3) PREPARATION DE LA SALLE POUR LES 20 BINOMES

Préparer des zones de manipulation stériles pour les élèves avec des pinces, des poires et des ensemenceurs stériles.
Prévoir des bécards poubelles.

4) PREPARATION DES SUSPENSIONS DE BACTERIES (QUELQUES MINUTES AVANT LE DEBUT DU TP)

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : Manipuler en conditions stériles et bien se laver les mains avant et après manipulation.
Décontaminer les ustensiles utilisés après usage (javel, eau oxygénée, UV, autoclave...)

Verser 20 mL d'eau stérile dans un tube stérile
Prélever avec un cure-dents stérile des colonies isolées sur les boîtes de pétri repiquées d'*E. coli*
Plonger et agiter l'ensemenceur dans l'eau stérile de manière à mettre les cellules en suspension dans l'eau
Prélever de nouveau des colonies jusqu'à ce que la suspension se trouble et s'opacifie.
Homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé : inoculum et étalon doivent avoir la même turbidité lorsqu'ils sont examinés sur un fond rayé.
Noter ce tube « *E. coli* »

Verser 20 mL d'eau stérile dans un tube stérile
Prélever avec un ensemenceur stérile des colonies isolées sur les boîtes de pétri repiquées de *B. megatherius*
Plonger et agiter le cure-dents dans l'eau stérile de manière à mettre les cellules en suspension dans l'eau
Prélever de nouveau des colonies jusqu'à ce que la suspension se trouble et s'opacifie.
Homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé : inoculum et étalon doivent avoir la même turbidité lorsqu'ils sont examinés sur un fond rayé ou une feuille imprimée de texte : l'observation des écritures ou des rayures doit avoir le même grossissement à travers les 2 solutions.

Noter ce tube « *B. megatherius* »

Sortir les antibiotiques du réfrigérateur pour que les élèves puissent réaliser les antibiogrammes

5) APRES LE TRAVAIL DES ELEVES

Décontaminer les instruments (sauf les boîtes de pétri) utilisés par les élèves (javel, eau oxygénée, UV, autoclave...)

Mettre les boîtes des élèves entre 25 et 35°C
Laisser pousser 24 à 48 heures
Mettre les boîtes à +4°C pour les conserver jusqu'à la date d'observation
Une fois observées par les élèves, décontaminer les boîtes

FICHE DE MANIPULATION PAR LES BINOMES :

1) ENSEMENCEMENT DES BOITES DE PETRI AVEC LES SOUCHES BACTERIENNES

👁️👁️ **ATTENTION** 👁️👁️ : Manipuler en conditions stériles (près d'un bec bunsen ou d'un bec électrique) et bien se laver les mains avant et après manipulation : vous manipulez des bactéries.

☐**NB**☐ : les deux membres de chaque binôme peuvent manipuler en même temps car 2 boîtes sont prévues par binôme correspondant à *E.coli* et à *B.megatherium*.

Pour *E.coli* :

Déposer avec une poire, 1 mL (à l'aide de la poire dédiée à *E.coli*) de la suspension notée « *E.coli* » sur la boîte de pétri notée « *E.coli* »

Tourner immédiatement la boîte de manière à répartir le liquide uniformément à la surface

Verser l'excédent dans un bécher poubelle

Refermer le couvercle de la boîte et annoter la boîte « *E.coli* »

Laisser sécher 25 minutes (pendant ce temps, réaliser l'ensemencement de la souche *B.megatherium*)

Pour *B.megatherium* :

Déposer avec une poire, 1 mL (à l'aide de la poire dédiée à *B.megatherium*) de la suspension notée « *B.megatherium* » sur la boîte de pétri notée « *B.megatherium* »

Tourner immédiatement la boîte de manière à répartir le liquide uniformément à la surface

Verser l'excédent dans un bécher poubelle

Refermer le couvercle de la boîte et annoter la boîte « *B.megatherium* »

Laisser sécher 25 minutes

2) REALISATION DES ANTIBIOGRAMMES :

Déposer à la pince stérile un disque de chaque antibiotique sur la boîte de façon régulière (espacer au maximum les disques les uns des autres et du bord)

Repérer les endroits où sont posés les antibiotiques

3) MISE EN CULTURE

Mettre à pousser 24 ou 48h entre 25 et 35°C.

Observer les boîtes et les conserver au froid (si l'observation a lieu plus tard)

RESULTATS ATTENDUS

La souche *E. coli* est sensible à l'ampicilline, la tétracycline, l'acide nalidixique et résistante à la pénicilline.

La souche *Bacillus megatherium* est sensible aux quatre antibiotiques fournis dans ce kit et hypersensible à la tétracycline.

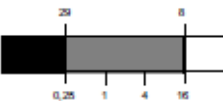
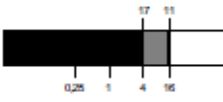
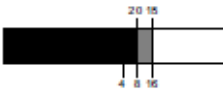
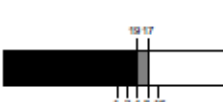
Le diamètre d'exclusion peut varier selon la concentration d'ensemencement.

INTERPRETATIONS ET CONCLUSIONS

L'antibiotique contenu dans chaque pastille diffuse dans le milieu en créant un gradient exponentiel de concentration, celle-ci étant d'autant plus grande que l'on est proche de la pastille. Chaque espèce bactérienne est caractérisée par une concentration d'antibiotique au delà de laquelle elle est tuée : c'est la « C.M.I. » (concentration minimale inhibitrice).

Observez et mesurez les différents diamètres d'inhibition autour de chaque pastille et calculez la C.M.I. La table de la C.M.I. spécifique à *E coli* est uniquement fournie à titre indicatif.

CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (C.M.I)

DÉNOMINATIONS COMMUNES	NOMS DE SPÉCIALITÉS	CHARGE DU DISQUE (1)	SIGLE DU DISQUE	Diamètre en mm		
				SENSIBLE	INTERMÉDIAIRE	RÉSISTANT
Pénicillines G				CMI en µg/ml		
	Bellocilline, Bidinocilline, Binépicilline, Extencilline, Oracilline, Ospen, Pénexilline, Pénicilline, Pénorline, Rixapen, Spécilline	6 µg	Pen			
Pénicillines A						
Ampicilline (antéro bactéries) (antérocoques)	Ampicil, Magnipen, Penbritine, Pénicline, Totapen, Ukapen, Versapen	10 µg	Amp			
Acide nalidixique	Négram	30 µg	Nal			
Tétracycline	Abiosan, Hexacycline, Rondomycine, Sifacycline, Tétracycline, Transcyciline,	30 U.I	Tét			
Chlortétracycline	Auréomycine		Clt			
Oxytétracycline D.M.C.T	Terramycine Lédermycine		Oxt Dmt			

FICHE SECURITE (guide non exhaustif)

Les bactéries doivent être manipulées avec précaution : bien décontaminer le matériel, se laver les mains après manipulation. Elles sont garanties non pathogènes mais peuvent accroître la fragilité de certaines personnes déjà affaiblies.

Les antibiotiques sont des substances dangereuses qu'il ne faut pas ingérer ni sucer.

La gélose chaude du milieu de culture peut provoquer des brûlures : la manipuler avec précaution en utilisant des gants ou des maniques anti-chaueur.

FICHE CONSERVATION

Les antibiotiques sous forme de disques de papier se conservent environ 6 mois à 4°C
Le milieu de culture se conserve pendant 1 an environ.

Les bactéries peuvent se conserver sur boîte en les repiquant régulièrement (mais une mutation peut apparaître provoquant une résistance ou une sensibilité à un antibiotique et des contaminations peuvent être cultivées)

Bacillus megaterium nécessite d'être repiqué 1 fois par semaine tandis que *E. coli* peut être repiqué seulement toutes les 3 semaines.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les antibiotiques sont à détruire avant d'être jetés : il ne faut jamais rejeter des antibiotiques dans la nature car des résistances pourraient se créer chez des bactéries pathogènes.

Les bactéries doivent être tuées avant d'être jetées. Les boîtes et ustensiles ayant été en contact avec les bactéries doivent être décontaminées.

Moyens de décontamination : javel, eau oxygénée, exposition UV prolongée, désinfectant, autoclave...