

TP Sciences de la vie et de la terre

Réf :
106 239

Français – p 1

Kit antibiogramme de simulation

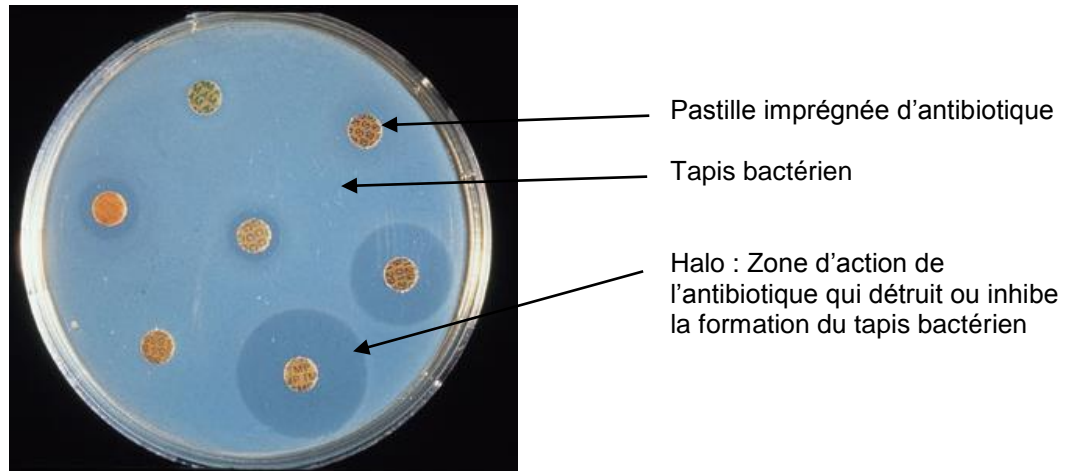
Version : 8110

1. Principe

Cette activité propose de découvrir le principe d'un antibiogramme, à l'aide de réactifs non dangereux et sans utilisation de microorganisme.

Les microorganismes sont simulés par des réactifs colorés qui reproduisent le tapis bactérien se développant à la surface d'une gélose. Les antibiotiques sont en réalité, des substances faiblement acides ou basiques imprégnées dans des disques pour antibiogramme. La diffusion des réactifs provoque ou pas une décoloration simulant le halo d'inhibition provoqué par l'action d'un antibiotique. Comme pour un véritable antibiogramme, la sensibilité de la bactérie à l'antibiotique est proportionnelle à la dimension du halo observé.

Exemple d'un antibiogramme



La réalisation de l'antibiogramme simulé va permettre de tester l'action de 3 antibiotiques sur 2 genres bactériens distincts, *Staphylococcus* et *Pseudomonas* :

- *Staphylococcus aureus* représenté par 2 sous-espèces *Staphylococcus aureus* spp et *Staphylococcus aureus* SARM
- *Pseudomonas aeruginosa*

Et 3 antibiotiques associés

- Vancomycine - VA 20µg
- Pénicilline G - P 15µg
- Pipéracilline - PIP 10 µg

Le scénario proposé a pour objectif de mettre en évidence le comportement radicalement opposé des 2 genres bactériens vis-à-vis des 3 antibiotiques fournis, on aborde ainsi la notion de spectre d'action des antibiotiques.

En parallèle, on se propose de tester 2 sous-espèces distinctes de *Staphylococcus aureus*, afin de mettre en évidence le phénomène de résistance aux antibiotiques très commun à cette famille bactérienne.

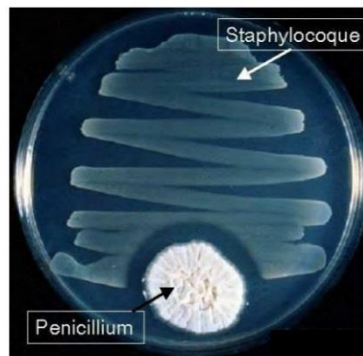
La réalisation et l'interprétation se déroulent de 45 minutes à 1h30.

Quelques données sur la résistance des staphylococcus aux antibiotiques :

Les staphylocoques sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et sont souvent responsables d'infections contractées dans les hôpitaux. Leur habitat naturel est constitué par les flores cutanées et les muqueuses humaines et animales. Ils sont également retrouvés dans l'environnement (eau, sol, air, aliments, objets). Le traitement est difficile car de nombreuses souches sont multirésistantes aux antibiotiques. Selon les services hospitaliers, ces dernières représentent entre 20 et 50% des souches.

Source <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/staphylocoque>

En 1928, lors de la découverte de pénicilline par A. Fleming (1881-1955) les staphylocoques étaient sensibles à la pénicilline.



3 Septembre 1928

Rapidement des souches résistantes à la pénicilline (G) sont apparues, résistances induites par des mutations du génome bactérien. Ces résistances sont dues à la production d'enzymes pénicillinases, capables d'inactiver la pénicilline G.

Aujourd'hui, on retrouve des pénicillinases (ou plus précisément bêta-lactamases) dans 75 % des isolats de *S. aureus* et même dans plus de 90% en milieu hospitalier.

Les pénicillinases, relarguées dans le milieu extérieur, inactivent la pénicilline G, les aminopénicillines (amoxicilline), les uréidopénicillines (pipéracilline).

Les pénicillines M (oxacilline ..) introduit en 1961 ne sont pas hydrolysées. Pour contrer ces résistances, les antibiotiques sont complétés d'inhibiteurs de bêta-lactamases (acide clavulanique par exemple), qui restaurent l'activité des pénicillines.

La souche *Staphylococcus aureus* SARM possède un gène, le gène *mecA*, qui induit une résistance à la méticilline et plus généralement à toutes les molécules antibiotiques β -lactames. Cette bactérie est la responsable de nombreuses épidémies au niveau mondial dans le milieu hospitalier.

2. Composition



3 solutions colorées en ampoules sécables – simulations solutions bactériennes
 3 solutions translucides en ampoules sécables – simulation solutions antibiotiques
 1 tube d'Agar Agar
 1 sachet de pastilles à imprégner (environ 100)
 2x15 boîtes de Pétri diamètre 55 mm

Matériel complémentaire

Plaque chauffante	Bécher 500mL ou 1000mL
Gants anti-chaaleur	Bécher 50mL
Pincettes fines	Gants, lunettes (option)
Pipettes graduées 1ml à usage unique	

3. Protocole

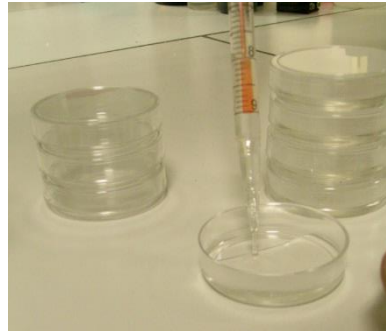
3.1 Séquençage de l'activité

Ce tableau regroupe les différentes phases de préparation du TP. Certaines opérations peuvent être réalisées à l'avance et d'autres sont à réaliser spécifiquement lors du TP.

	Avant le TP	Pendant le TP
Coulage des boîtes de gélose	Oui 1 heure minimum. Une boîte fermée se conserve 72 h à 4°C	non
« Ensemencement » par inondation	Oui Une boîte fermée se conserve 72 h à 4°C	Oui Prévoir temps séchage 15-20 min à l'air libre (+20°C) 5-10 minutes à l'étuve 45°C
Imprégnation des disques antibiotiques	non	Oui Imprégnation se fait au moment du dépôt sur la boîte
Lecture des boîtes	-	Oui Staphylocoques après 20 minutes minimum de diffusion Pseudomonas 30 minutes minimum de diffusion

3.2 Coulage de la gélose

Préparer l'agar-agar par le professeur : 15 minutes.
Ajouter en pluie le tube d'agar (2 gr env), dans 500 mL d'eau distillée.
Porter à ébullition 1 à 2 minutes, agiter le liquide lorsque la solution devient translucide l'agar-agar est alors dissout.
Laisser refroidir quelques instants, puis tapisser le fond de la boîte en versant 8 mL d'agar environ dans les 30 boîtes.
Laisser refroidir jusqu'à solidification complète du gel. A utiliser de suite ou placer au réfrigérateur (72 heures maximum)



3.3 Enseignement par la technique d'inondation

Elève ou professeur : 5 minutes + 15 minutes de séchage
La technique originale de microbiologie consiste à ensemencer une boîte de Pétri à l'aide d'une solution bactérienne dont on connaît le titre, c'est-à-dire la concentration en nombre de cellules. Après incubation, on obtient un tapis bactérien, les colonies sont isolées mais confluentes.

Dans ce TP, on s'inspire de cette technique pour répartir les solutions colorées.

Les 3 souches « bactériennes » sont prêtes à l'emploi.

Il est possible de se servir directement des ampoules (a), ou de répartir dans de petits béchers, à distribuer à plusieurs groupes d'élèves.

Identifier le couvercle de chaque boîte. Par exemple comme suivant :

Staphylococcus aureus spp (sauvage) = S1

Staphylococcus SARM (*Staphylococcus aureus* méticilline résistants) = S1 R

pseudomonas aeruginosa = S2

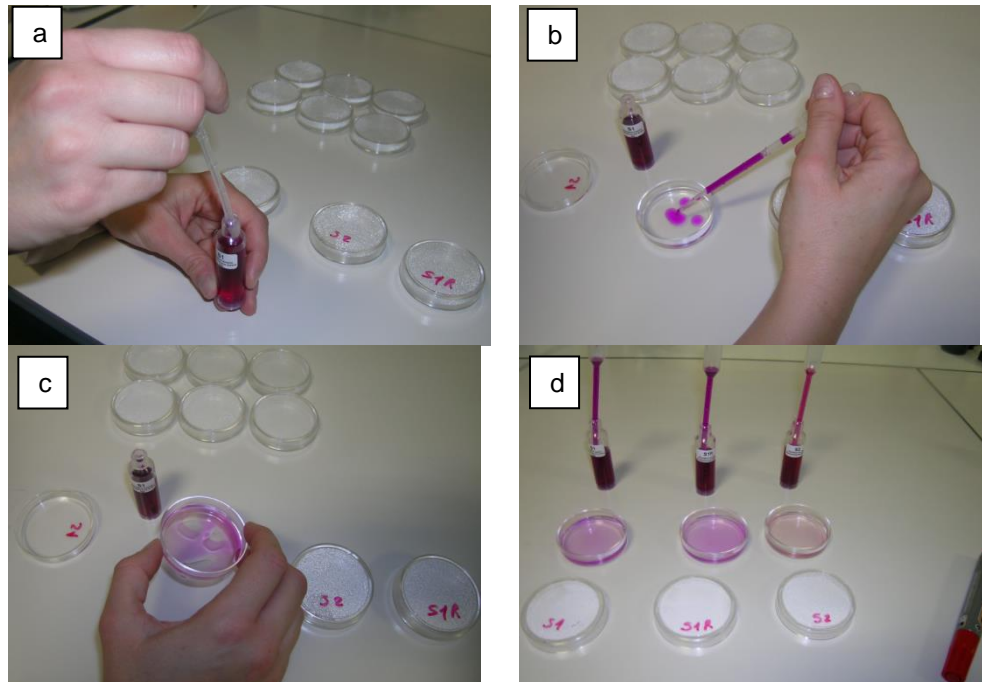
On déverse une dose de liquide à l'aide d'une pipette de 0,5 ml (b).

On répartit le liquide sur la surface gélosée en faisant tourner la boîte (c), ou en la faisant glisser sur la paillasse, laisser en contact 20-30 secondes avant d'enlever l'exédent.

On aspire l'exédent à l'aide de la pipette tout en inclinant la boîte, en prenant soin de ne pas toucher la gélose, le bout de la pipette est en contact uniquement avec le rebord plastique de la boîte.

Pour la réussite de la manipulation, **le séchage complet du film est très important.** Il ne faut pas de liquide « coulant » lorsque l'on incline la boîte. En aspirant un maximum de liquide on peut espérer un séchage en 10-15 minutes, le temps de préparer les antibiotiques. Par sécurité, on peut accélérer le séchage à l'aide d'une étuve : 5 à 10 min (maxi) à 45 °C boîte ouverte.

Conservation : à utiliser de suite ou placer au réfrigérateur 72 h boîte fermée.



Astuce : gain de temps en faisant réaliser l'ensemencement des boîtes en série par les élèves.

Constituer 3 groupes correspond à une souche bactérienne par groupe.

Identifier 10 boîtes par groupe,

- ouvrir l'ampoule,
- remplir la première boîte avec quelques gouttes,
- verser l'exédent dans la suivante, rajouter du liquide au fur et à mesure, veiller à bien égoutter la gélose.

La technique est plus rapide mais moins réaliste.

A utiliser après séchage ou placer au réfrigérateur (72 heures maximum)

3.4 Dépôt des antibiotiques

Durée : 5 minutes

Distribuer 9 disques par groupes. A l'aide d'un stylo bille marquer :

- Antibio 1 : disques Vancomycine (V)
- Antibio 2 : disques Pénicilline G (G)
- Antibio 3 : disques Pipéracilline (P)

Attention : il s'agit d'une opération délicate.

Le dépôt des disques imprégnés représente l'opération la plus délicate du TP .

2 aspects à surveiller : la quantité de liquide imprégné et le dépôt sur la gélose.

A l'aide d'une pince fine, chaque disque est trempé dans sa solution « antibiotique ».

Trempage : le disque est maintenu dans la solution 3 secondes puis tamponnée sur le rebord du bécher pour éliminer le surplus (le disque doit être parfaitement humide mais ne doit pas goutter).

Dépôser les 3 pastilles de manière équidistante (1 pastille de chaque antibiotique). Un gabarit est joint à la fin de la notice, pour faciliter le dépôt.



Déroulement de la migration

La migration des antibiotiques Vancomycine (V) et Pénicilline G (G) est rapide pour la souche *Staphylococcus*. Une interprétation est possible après 20 minutes.

Pour la souche *pseudomonas*, l'apparition d'une activité est un peu plus longue : 30 minutes.

Ces délais peuvent varier en fonction de la quantité de produit antibiotique et du niveau de séchage du film coloré. (Lorsqu'il y a trop de liquide, la décoloration est rapide et ne formera pas obligatoirement un halo circulaire).

Interprétation

On exprime la sensibilité des bactéries aux antibiotiques en fonction du diamètre de décoloration observé. Plus le diamètre de l'auréole (faisant apparaître la gélose jaune) est important, plus la bactérie est sensible à l'antibiotique.

Tableau avec les diamètres :

T 35 min	S1	S1R	S2
V	22 mm	18 mm	0
G	16 mm	9 mm	0
P	0	0	11 mm

De la lecture, on doit répondre à ces 2 informations :

- 1 le produit a-t-il un effet bactéricide ?
- 2 si oui la concentration est-elle suffisante la lecture ?

Dans notre cas de figure,

Staphylococcus aureus spp (sauvage) = S1 est sensible à la vancomycine ainsi qu'à la Pénicilline G inaction de la Pipéracilline.

Staphylococcus SARM (Staphylococcus aureus méticilline résistants) = S1 R / est sensible à la vancomycine mais la Pénicilline G est beaucoup moins efficace, cette souche développe une résistance à l'antibiotique : inaction de la Pipéracilline.

pseudomonas aeruginosa = S2 – la lecture est plus difficile.

2 antibiotiques se révèlent totalement inefficace sur *pseudomonas* : vancomycine et Pénicilline G.

La Pipéracilline montre une activité mais la dimension de l'auréole indique qu'il faudra probablement augmentée la concentration de l'antibiotique pour améliorer son efficacité.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie gram -, et les streptococcus sont gram + ce qui signifie qu'elle possède des caractéristiques de parois particulièrement très différentes.

On observe un comportement opposé vis-à-vis des antibiotiques proposés. Les pseudomonas sont des bactéries particulièrement robuste difficile à traiter.

4. Service après-vente

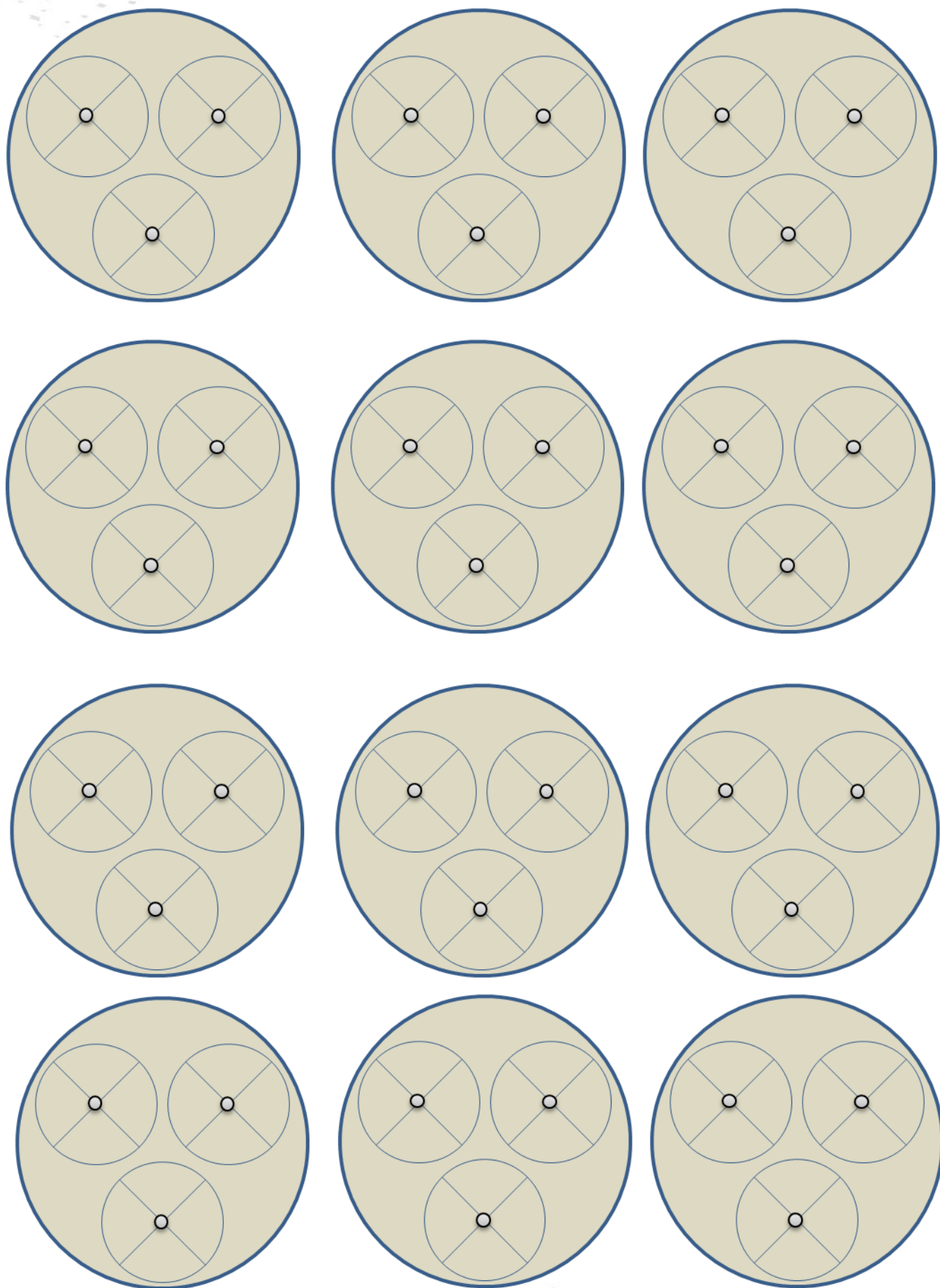
Pour toute question, veuillez contacter :

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

0 825 563 563*

** 0,15 € TTC/min. à partir un téléphone fixe*

GABARITS



Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE, composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr

Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediately to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France

Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux