

# Kit antibiogramme

Réf. 01900040

## Présentation

### 1. Introduction

On cherche à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un antibiotique.

### 2. Composition

- 4 tubes épendorf renfermant chacun 10 disques imprégnés d'antibiotiques (AMP, B, P, S)
- 10 boîtes de Pétri stériles 90 mm
- 1 flacon de gélose nutritive (200 ml) prête à l'emploi
- 1 flacon de gélose Mueller-Hinton (200 ml) prête à l'emploi
- 10 écouvillons stériles
- 10 inoculateurs stériles
- 10 étaleurs stériles

Les milieux de culture et les disques d'antibiotiques doivent être conservés au réfrigérateur.

## Principe

L'ensemble "ANTIBIOGRAMME" permet l'isolement de germes présents dans la gorge, leur mise en culture sur milieu, la sélection d'un type bactérien (E.coli par exemple) et l'observation de l'effet d'antibiotiques sur son développement.

Les antibiotiques "déposés" (sous forme de disques imprégnés) sur la géloseensemencée diffusent selon un gradient de concentration. Une zone d'inhibition se crée alors autour du disque, plus ou moins grande selon la sensibilité de la souche à cet antibiotique. Il est donc possible de définir l'antibiotique le plus efficace contre une souche bactérienne donnée.

*Remarque:* le déroulement de ce TP est interrompu par deux périodes de mises en culture à l'étuve 37°C.

## Mise en œuvre

Les différentes manipulations doivent être effectuées dans les meilleures **conditions de stérilité** afin d'éviter une éventuelle contamination extérieure. Il est donc conseillé de travailler à proximité de la flamme d'un bec bunsen.

### 1. Préparation des boîtes de Petri

Quelques heures avant utilisation, placer le flacon au bain-marie bouillant jusqu'à liquéfaction de la gélose. Répartir ensuite dans les boîtes de Pétri stériles (environ 18 ml soit environ 4 mm d'épaisseur). Faire le transvasement le plus près possible de la flamme du bec bunsen. Laisser refroidir et solidifier la gélose avant mise en culture.

## 2. Prélèvement des germes

Le prélèvement s'effectue au moyen d'un écouvillon stérile au niveau du fond de la gorge par exemple. Le prélèvement est ensuite relâché dans une petite quantité d'eau distillée stérile et le tout, ensemencé sur gélose nutritive (utilisation d'une pipette Pasteur dont l'extrémité a été brûlée et arrondie sous forme de goutte dans la flamme).

## 3. Identification de colonies de même souche

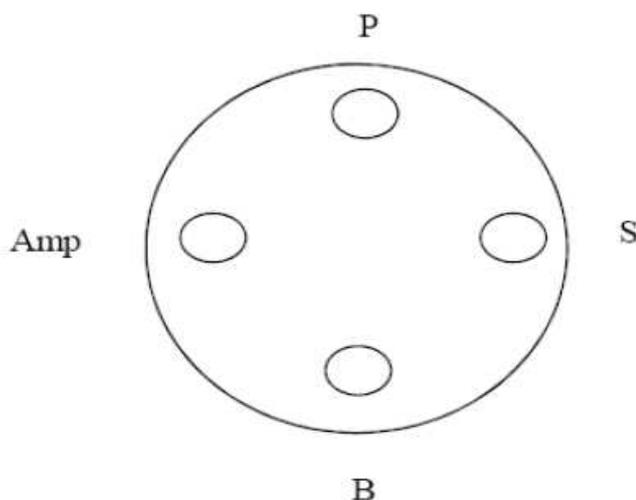
Après 18 à 24 heures passées à l'étuve à 37°C (boîtes fermées et disposées à l'envers), l'identification de colonies de même souche bactérienne, *Escherichia Coli* par exemple, se fait aisément à la loupe binoculaire. Aspect des colonies d'*Escherichia coli* après développement sur gélose : colonies de 2-3mm de diamètre violet très foncé avec souvent un reflet métallique; par transparence, elles présentent un centre opaque occupant les 3/4 de leur surface. Quelques colonies (1 à 10) sont récupérées à l'aide d'un ensemencneur et mises en suspension dans une petite quantité d'eau stérile.

## 4. Mise en culture de colonies en présence des disques antibiotiques

L'eau stérile renfermant les colonies de bactéries identifiées en c) est étalée sur boîtes de Pétri pré coulée en gélose de Mueller-Hinton. Ce milieu est tout particulièrement utilisé dans la recherche de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

4 disques imprégnés d'antibiotiques sont disposés (à l'aide d'une pince stérilisée par flambage à l'alcool) de façon circulaire sur la gélose, à environ 15 mm de la périphérie de la boîte, en veillant à les mettre en contact (attention cependant à ne pas abîmer la gélose!).

Sur chaque boîte sont disposés : 1 disque imprégné de Pénicilline, 1 disque imprégné de Streptomycine, 1 disque imprégné de Bacitracine, et 1 disque imprégné d'Ampicilline; le schéma suivant de disposition des disques est proposé :



Les boîtes sont ensuite refermées, et disposées à l'envers dans l'étuve à 37°C. L'incubation dure environ 18 heures.

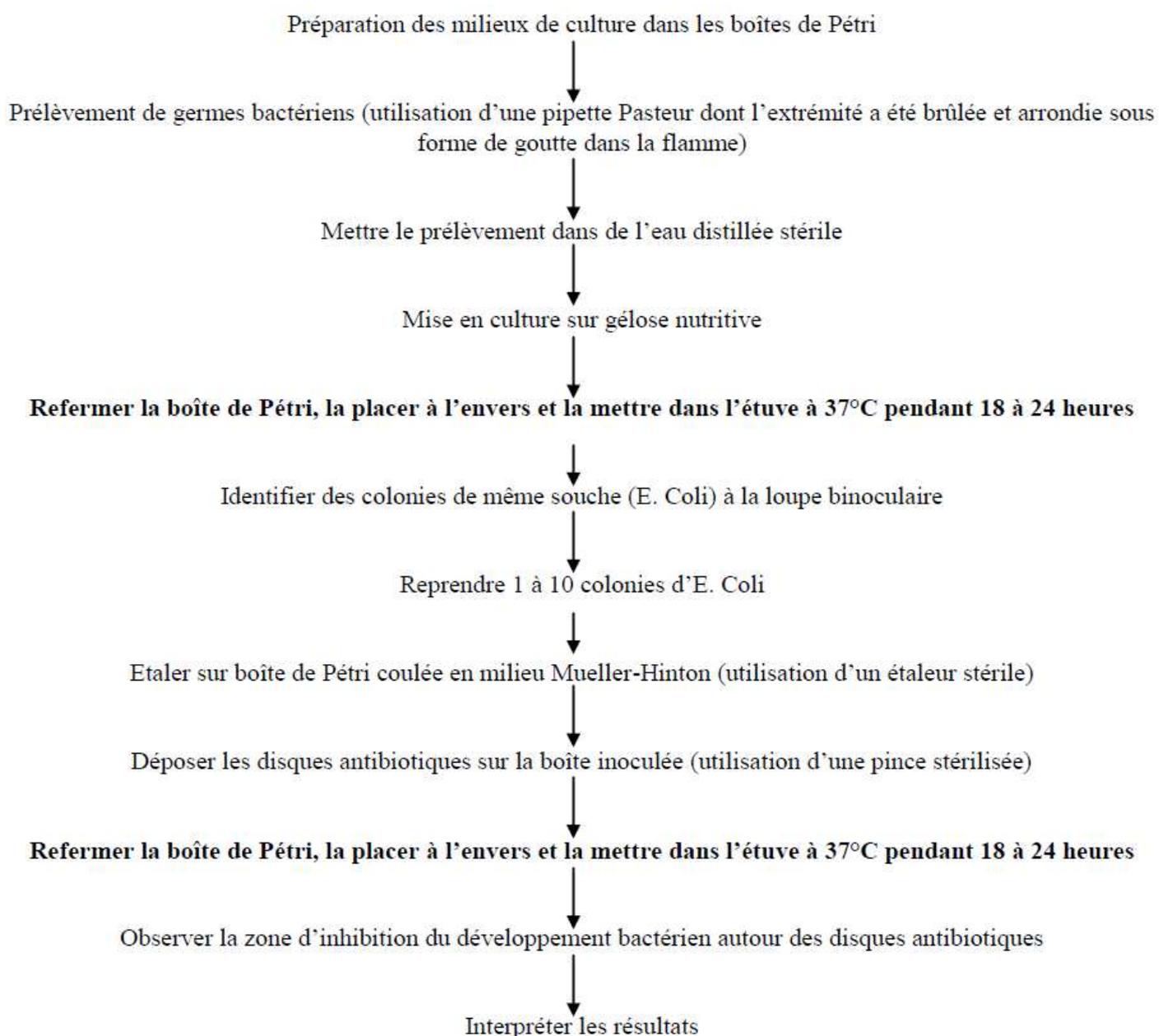
## 5. Résultats expérimentaux

Durant le temps d'incubation à l'étuve, les bactéries se développent ; ce développement va être perturbé par la présence des antibiotiques : destruction des microbes ou inhibition de leur multiplication.

Dans le cas d'E.coli, les 4 antibiotiques proposés vont avoir des effets plus ou moins importants sur son développement. Plus l'antibiotique est efficace contre la souche bactérienne, plus la zone claire autour du disque est importante (la concentration en antibiotique étant décroissante).

Ordre d'efficacité des antibiotiques sur une souche d'E.coli (ordre décroissant) :  
Ampicilline > Streptomycine > Pénicilline > Bacitracine

## 6. Rappels des opérations



## **Matériel nécessaire**

- Eau distillée stérile
- Bain-marie bouillant
- Étuve bactériologique et de culture
- Loupe binoculaire
- Bec bunsen (conditions de stérilité)
- Pipettes Pasteur en verre et pince