

DS n°5 Désinfectant – Cinétique de Bactéricide – Dosage antibiotique

1. Détermination de l'activité bactéricide d'un désinfectant par méthode de filtration

La norme NF-T-72-171 de novembre 88 indique le protocole de détermination de l'activité bactéricide d'un désinfectant en présence de substances interférentes par méthode de filtration sur membrane.

Voici un « résumé » de ce protocole ; le document 1 montre ce protocole sous forme de diagramme.

Une suspension S de la souche sensible est réalisée et calibrée à une concentration comprise entre 0,5 et $1,5 \cdot 10^8$ cellules /ml. Les dilutions décimales de la suspension S sont effectuées jusqu'à la dilution 10^{-6} : suspension S6.

Le dénombrement de S6 est effectué

-en milieu gélose (1mL par milieu, double essai) ; soit N le résultat moyen.

-par filtration de 1mL sur membrane suivi d'un double rinçage (double essai) ; soit N' le résultat moyen.

La méthode est ensuite validée par un dénombrement des bactéries sur une membrane ayant été au préalable en contact avec le mélange produit à tester-substance interférente.

Un mélange de 4mL de substance interférente, de 1mL d'eau et de 5mL de produit à tester double concentration est incubé 5 minutes. Puis, 1mL du mélange est prélevé et filtré, la membrane est rincée. Puis, 1mL de la suspension S6 est filtré et dénombré. Soit n le résultat.

L'essai est effectué de la manière suivante :

Introduire dans un tube 4 mL de substance interférente, 1 mL de suspension bactérienne. Après 5 minutes de contact, ajouter 5mL du produit à tester double concentration.

Puis, au bout de 5 minutes, dénombrer par filtration de 1mL du mélange. Rincer. Soit X le résultat obtenu.

1. Dégager du protocole fourni le principe de la détermination de l'activité bactéricide d'un désinfectant par méthode de filtration. Préciser bien l'intérêt de l'étape de filtration. Par quoi pourrait-on remplacer l'étape de filtration ?
2. Quel sera théoriquement l'encadrement de N pour que les conditions définies concernant la suspension S soient respectées ?
3. Justifier l'emploi du désinfectant double concentration.
4. La norme impose $N' > 0,5 N$; Que peut-on supposer si $N' < 0,5 N$?
5. Quel est l'intérêt de réaliser le dénombrement n des bactéries sur membrane ayant été au préalable en contact avec le mélange produit-substance interférente ?
6. La norme impose $n > 0,5 N'$. Que peut signifier un résultat $n < 0,5 N'$?
7. Justifier le protocole proposé pour les essais. Quelle est la valeur maximale du résultat X pour que l'activité bactéricide soit validée ? Justifier.

2. Exercice

On dispose d'un erlen contenant $V = 100$ mL de milieu stérile. Une préculture de la souche est effectuée et l'absorbance de cette préculture diluée au 1/10 est de 0.38 UA ($0,1\text{UA} \rightarrow 210^8$ cellules/mL). L'erlen de milieu stérile doit êtreensemencé de façon à obtenir une concentration de environ 10^6 cellules/mL.

1. Quel volume v de la préculture faut-il ajouter au 100 mL de milieu ?
2. Même question si l'absorbance mesurée de la préculture non diluée est de $1,4 \cdot 10^7$ cell/mL.
(on considère que le volume v est négligeable devant $V = 100\text{mL}$ si V est inférieur à 5mL)

3. Cinétique de bactéricidie de l'eau de Javel à 0,1%

1. La cinétique de bactéricidie est une cinétique d'ordre 1.

Définir la vitesse d'inactivation et la constante k d'inactivation ; Exprimer $\ln N/N_0$ en fonction de k et de t (temps)

N = concentration en bactéries survivantes.

No = concentration initiale en bactéries

Montrer graphiquement la signification de k.

Définir D temps de réduction décimal ; établir l'expression de D en fonction de k.

2. Le protocole de la manipulation est le suivant :

Effectuer les dilutions décimales nécessaires de la culture de la souche test en eau physiologique stérile. Pour chaque dilution testée et à partir de la dilution 10^{-2} , étaler 10mL sous forme de strie en surface d'un milieu gélosé. L'essai est réalisé comme suit : introduire 9 mL de solution d'eau de Javel à% dans un tube à essai stérile. Ajouter 1 mL de suspension bactérienne non diluée temps t_0 .

Aux intervalles de temps imposés, prélever 1mL du mélange, le transférer immédiatement dans un tube de 9 mL de diluant-neutralisant (eau stérile). Homogénéiser.

Ensemencer 10mL sous forme d'une strie. Incuber à 37°C . Tester $\Delta t = 30\text{sec}$; 1 min ; 2 min ; 4 min ; 6 min ; 10 min. Les résultats sont présentés dans le document 2.

2.1. Si l'eau de Javel à 0,1% n'avait aucun effet sur les bactéries, quel serait l'aspect des stries observées pour les essais ?

2.2. En déduire (sans effectuer aucun calcul) la réduction décimale obtenue à $t = 2$ minutes, puis une estimation de D.

2.3. Quelle doit être la concentration de l'eau de Javel utilisée pour le test ?

Etalonnage

dilution	aspect de la strie
10^{-2}	
10^{-3}	
10^{-4}	
10^{-5}	
10^{-6}	
10^{-7}	

Cinétique de bactéricidie

temps (min)	aspect
0,5	
1	
2	
4	
6	
10	

