

**TP5 Détermination de l'activité bactéricide
d'un antiseptique ou désinfectant :
méthode par dilution - neutralisation (NF EN 1276 octobre 1997)**

1. Principe

La méthode consiste à mettre en contact pendant un temps défini (5 min +/-10 sec) et à une température donnée (20°C +/- 1°C) une suspension bactérienne d'essai avec une solution de substances interférentes (mélange de levure/albumine) et le désinfectant.

A la fin de ce temps de contact, on neutralise les propriétés antimicrobiennes du désinfectant avec un neutralisant.

Le dénombrement des bactéries survivantes dans le mélange neutralisé est alors comparé au dénombrement des bactéries initialement présentes.

La norme définit un produit à activité bactéricide si, soumis aux conditions fixées par la norme, il entraîne un facteur de réduction au moins égal à 10^5 du nombre de cellules viables.

Les souches tests recommandées sont

- *E. coli* ATCC 10536
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541

2. Mode opératoire

Toutes les opérations seront effectuées à 20°C. Vortexer à chaque étape. La souche test utilisée est *S.aureus*.

Les désinfectants testés sont utilisés à la concentration x1,25 la concentration normale d'utilisation.

2.1. Dénombrement de la suspension bactérienne d'essai S

La souche est fournie isolée sur gélose TSA. Réaliser une suspension dans le diluant et ajuster l'absorbance de façon à obtenir au moins 4 ml de suspension entre $1,5$ et $3 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ (pour *S.aureus* on considère que 0,1 UA --> 10^8 UFC.mL⁻¹).

Réaliser les dilutions décimales en diluant tryptone-sel jusqu'à la dilution 10^{-7} , dénombrer les dilutions 10^{-6} et 10^{-7} en gélose TSA : double essai dans la masse ; 15 mL de gélose par boîte.

2.2. Validations (témoins)

Les témoins permettant de valider l'essai. Ils sont réalisés en utilisant une suspension bactérienne comprise entre $6 \cdot 10^2$ et $3 \cdot 10^3$ UFC.mL⁻¹. On choisira d'utiliser la dilution 10^{-5} de la suspension initiale = S5.

Les résultats précédents permettent de déterminer le nombre N de cellules bactériennes viables dans 1 mL de la suspension S5.

2.2.1. Validation de la non toxicité de la substance interférente

Introduire dans un tube 1 mL de substance interférente, 1 mL de suspension S5. Mélanger, laisser en contact 2 minutes puis ajouter 8 mL d'eau distillée. Mélanger, attendre 5 minutes puis dénombrer en double sur TSA. Le résultat A est valide s'il est supérieur ou égal à 0.05N.

2.2.2. Validation de la non toxicité du neutralisant

Introduire dans un tube 1 mL d'eau, 8 mL de neutralisant puis 1 mL de suspension bactérienne S5. Mélanger; après 5 min de contact, mélanger dénombrer en double essai sur TSA. Le résultat B est valide s'il est supérieur ou égal à 0,05N.

2.2.3. Validation de la méthode de dilution neutralisation

Introduire dans un tube 1 mL de substance interférente, 1 mL de diluant et 8 mL de désinfectant à tester. Laisser en contact 5 min. Vortexer.

Prélever 1 mL de ce tube et ajouter 8 mL de diluant-neutralisant. Attendre 5 min. Ajouter 1 mL de suspension bactérienne S5.

Attendre 30 min, vortexer, dénombrer dans la masse en double essai.

Le résultat C est valide s'il est supérieur ou égal à 0,5 fois B.

2.3. Essais

Pour chaque essai :

Introduire dans un tube 1 mL de substance interférente, 1 mL de suspension bactérienne S (et non pas S5) et 8 mL de désinfectant à tester (ou de sa dilution).

Laisser en contact 5 min. Vortexer.

Transvaser 1 mL dans un autre tube ; introduire 1 mL d'eau et 6 mL de diluant-neutralisant. Laisser en contact 5 min. Vortexer et dénombrer dans la masse en double essai. Soit R le résultat obtenu.

Compte Rendu

- 1) Dénombrement de la suspension bactérienne d'essai S.
Indiquer la préparation de la suspension S ; Donner le résultat N du dénombrement. Comparer au résultat attendu.
- 2) Quel est exactement l'intérêt d'une solution interférente et du diluant-neutralisant dans ce protocole ?
- 3) Pourquoi le désinfectant doit-il être testé à la concentration 1,25x sa concentration normale d'utilisation ?
- 4) Validation de la non toxicité du neutralisant et de la substance interférente: justifier le protocole proposé. Expliquer la signification de la phrase « Le résultat A (ou B) est valide s'il est supérieur ou égal à 0,05N ». donner les résultats ; conclure.
- 5) Validation de la méthode de dilution neutralisation : justifier le protocole proposé. Expliquer la signification de la phrase « Le résultat C est valide s'il est supérieur ou égal à 0,5 B ». Donner le résultat C. Conclure.
- 6) Justifier le protocole proposé pour les essais. Donner les résultats ; déterminer le nombre de survivants et la réduction décimale obtenue pour le désinfectant testé. Conclure quand à l'activité bactéricide.

Réactifs et souches

Par binôme

- 2 tubes de 10 mL de diluant pour préparer la suspension S
- 7 tubes de 9 mL de diluant tryptone sel ; tubes d'eau physiologique
- 1 tube de substances interférentes (5 mL)
- 1 isolement de *S.aureus* sur gélose TSA
- gélose TSA : 15 mL x 12 boites soit environ 200 mL
- solution neutralisante : environ 30mL
- désinfectant à tester : doit être utilisé à la concentration prévue pour l'usage du produit mais x 1,25

Milieux utilisés

Diluant : tryptone sel : tryptone 1g.L⁻¹; NaCl 8,5 1g.L⁻¹; pH = 7 ± 0,2

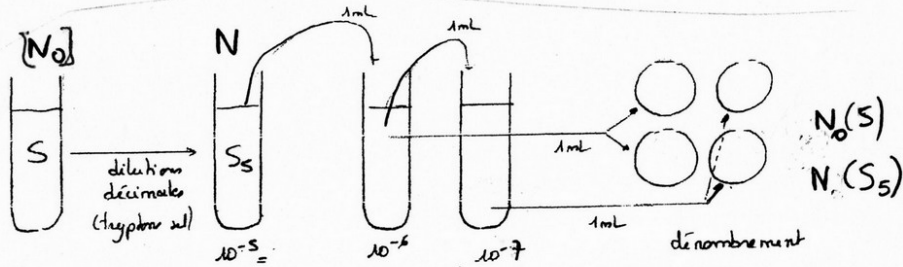
Neutralisant polyvalent : lécithine d'œuf ou de soja : 3g; tween 80 : 30 mL; L-Histidine : 1g; thiosulfate de sodium : 5g; qsp tryptone sel 1L

Substances interférentes : lait UHT écrémé stérile dilué au 1/10

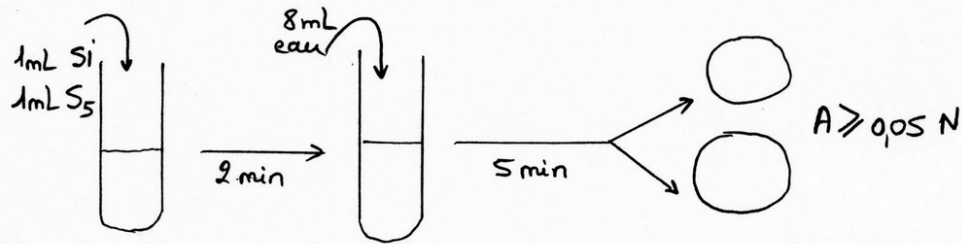
Gélose TSA : tryptone, digestion pancréatique de caséine : 15g; peptone de soja, digestion papainique de farine de soja : 5g; NaCl : 5g; agar : 15g

Schéma du protocole de détermination de l'activité bactéricide d'un antiseptique ou désinfectant : méthode par diluant-neutralisant (NF EN 1276 octobre 1997)

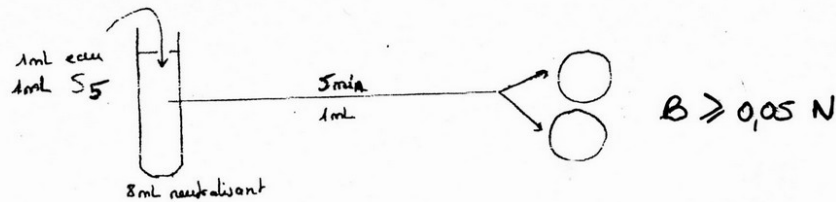
2.1 Dénombrement de la suspension bactérienne d'essai S



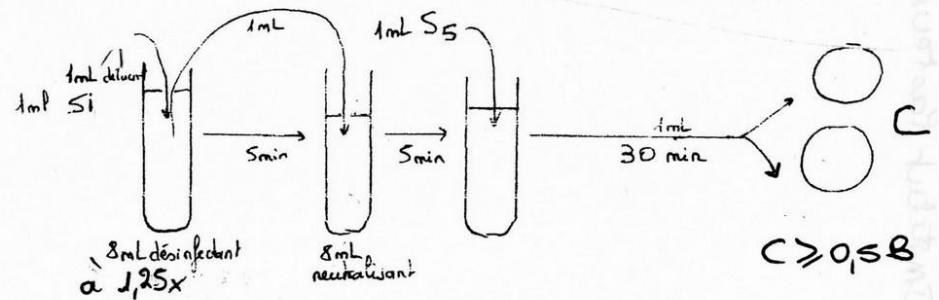
2.2 Validité de la non-toxicité de la substance interférente



Validité de la non toxicité du neutralisant



Validation de la méthode de dilution - neutralisation



2.3 Essai

