

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

CONTRÔLE ET DEVELOPPEMENT
EN INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE**MICROBIOLOGIE-BCM**

(80 points)

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

1^{er} jourDurée : 4 H 30**Les candidats commencent par l'immunologie.****A - MICROBIOLOGIE**

(50 points)

Un probiotique peut être défini comme un supplément alimentaire contenant au moins un micro-organisme (levure, lactobacille...) et apportant un bénéfice pour la santé humaine en agissant sur la flore intestinale de l'hôte.

La mise au point d'une telle préparation impose un certain nombre de contrôles tels que :

- contrôle de la ou des souches composant le probiotique ;
- contrôle de survie des micro-organismes après ingestion du probiotique.

1 - Contrôle rapide de l'identité du micro-organisme présent dans le probiotique. (11 points)**1.1 - Matériel et réactifs.**

- Culture pure d'un lactobacille sur gélose MRS inclinée notée « P ».
- Colorants de Gram.
- Gélose MRS en boîte de Pétri.
- Peroxyde d'hydrogène, disque « oxydase ».

1.2 - Protocole opératoire.

Contrôler l'identité de la souche référencée « P » en réalisant une coloration de Gram et un test enzymatique.

Réaliser un isolement sur gélose MRS.

Présenter un champ microscopique à un examinateur.

Réaliser le test enzymatique en présence d'un examinateur.

1.3 - Compte rendu.

Présenter les résultats de l'observation microscopique.

Justifier le choix du test enzymatique et donner son résultat.

Conclure.

2 - Evaluation du taux de survie de *Lactobacillus casei* après leur passage dans l'estomac.
(12 points)

Pour que le probiotique puisse exercer un effet bénéfique, il faut que les cellules qui le composent parviennent en grande quantité et vivantes dans la lumière intestinale. Le principal obstacle rencontré est donc l'acidité gastrique.

Le probiotique est constitué par un lyophilisat de *Lactobacillus casei* (*L. casei*). Ce dernier a été revivifié en bouillon MRS pendant 30 minutes à 37°C. On obtient la suspension « S ».

Il s'agit donc d'évaluer *in vitro* la résistance des *L. casei* à l'acide chlorhydrique contenu dans le suc gastrique.

2.1 - Matériel et réactifs.

- Lyophilisat revivifié « S ».
- 1 tube contenant 10 mL d'eau physiologique stérile.
- 6 tubes à hémolyse stériles.
- Pipettes automatiques (P₁₀₀₀ et P₁₀₀) et cônes (bleus et jaunes).
- 8 géloses MRS sèches.
- Dispositif d'étalement.
- Solution d'acide chlorhydrique en solution aqueuse (pH 2).
- Chronomètre.

2.2 - Réalisation des « boîtes étalon ».

A partir de « S », réaliser en eau physiologique une gamme de dilutions respectant une progression géométrique de raison 1/10 et permettant de constater 5 réductions décimales de la population cellulaire initiale.

Déposer 0,1 mL de « S » et de chacune de ses dilutions à la surface d'une gélose MRS.

Réaliser l'étalement.

Incuber 48 heures à 37°C.

2.3 - Réalisation des « boîtes test ».

Ajouter 900 µL d'acide chlorhydrique (pH 2) à 100 µL de suspension « S ».

Laisser 45 minutes à 37°C.

Etaler 0,1 mL à la surface d'une gélose MRS.

Réaliser 2 essais.

Incuber 48 heures à 37°C.

3 - Evaluation du niveau de la contamination par les mycètes. (19 points)

La production de certains probiotiques impose une culture massive de *L casei* qui peut être sujette aux contaminations par les mycètes. Dans ce cadre, une double démarche d'identification et de quantification s'impose.

3.1 - Matériel et réactifs.

- 150 mL de gélose Sabouraud en surfusion.
- Solution de chloramphénicol à 5g /L.
- 1 pipette stérile de 10 mL.
- Echantillon de culture suspecte de *L casei* « M ».
- 2 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile.
- 3 pipettes stériles de 1mL.
- 6 boîtes de Pétri stériles.

3.2 - Supplémentation du milieu pour dénombrement.

A partir de la solution de chloramphénicol à 5g/L, compléter la gélose Sabouraud afin d'obtenir un milieu à environ 0,5 g/L.

3.3 - Protocole opératoire.

A partir de l'échantillon « M », réaliser, en eau physiologique stérile, une gamme de dilutions respectant une suite géométrique de raison 1/10 s'étalant de 10⁰ à 10⁻².

Réaliser en double un dénombrement de ces trois suspensions par inclusion dans la masse de la gélose Sabouraud supplémentée en chloramphénicol.

Incuber 48 heures à 30°C.

Effectuer les dilutions en présence d'un examinateur.

3.4 - Compte rendu.

Présenter le calcul du volume de chloramphénicol à ajouter à la base Sabouraud.

Justifier la nécessité de la supplémentation en chloramphénicol de la gélose Sabouraud.

Justifier le choix de la technique par inclusion dans la masse pour le dénombrement des mycètes.

B - IMMUNOLOGIE**(30 points)**

Les aflatoxines sont des mycotoxines produites par certaines souches d'*Aspergillus*. Le caractère hautement toxique des aflatoxines, associé au fait qu'elles peuvent contaminer de nombreuses denrées, pose un problème d'hygiène alimentaire.

L'aflatoxine B1 est dans la majorité des cas le composé le plus abondant, c'est par ailleurs celui qui est doué de la toxicité la plus grande et du pouvoir cancérogène le plus puissant.

On se propose de doser l'aflatoxine B1 de deux échantillons E1 et E2 par une méthode immunoenzymatique basée sur une réaction de compétition. La quantité maximale d'aflatoxine B1 autorisée est de 1 microgramme par kilogramme d'échantillon.

1 - Matériel et réactifs.

- solution étalon d'aflatoxine B1 à 5 µg /kg notée « étalon B1 » : 300 µL
- 2 échantillons à tester « E1 » et « E2 » dilués au 1/3 suite à l'extraction : 100 µL
- tampon de dilution = PBS /Tween/Méthanol : 1 mL
- « Témoin négatif » : 100 µL
- 1 barrette de 8 puits sensibilisés par l'aflatoxine B1
- « conjugué » (Anticorps anti-aflatoxine B1 conjugués à la peroxydase) : 460 µL
- « solution de lavage » = PBS/Tween20 : 12 mL
- « chromogène » : 500 µL
- « substrat » : 500 µL
- « H₂SO₄ » = solution d'arrêt: 500 µL
- cristalliseur pour rejet des liquides de lavage
- papier filtre

2 - Mode opératoire.

A partir de la solution étalon à 5 µg/kg, préparer une gamme de 4 étalons filles en tampon PBS-Tween-Méthanol.

N.B. : la méthode est fiable entre 0,3 et 5 µg/kg.

Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.

Déposer 50 µL de témoin négatif dans la cupule n°1 ; 50 µL des solutions étalons filles d'aflatoxine dans les cupules n°2 à n°5 (dans l'ordre croissant des concentrations) ; 50 µL de la solution d'aflatoxine à 5 µg/kg dans la cupule n°6 ; 50 µL des échantillons à tester « E1 » et « E2 » dans les cupules n°7 et n°8.

Distribuer 50 µL de solution de conjugué dans chaque puits.

Mélanger en appliquant un léger mouvement de rotation.

Incuber à température ambiante pendant 20 minutes.

Réaliser 5 lavages : tenir la barrette fermement et vider son contenu d'un geste vif. Rincer chaque puits avec 250 µL de solution de lavage, en maintenant pendant 10 secondes cette solution dans les puits.

Vider la barrette à nouveau. Répéter cette opération 4 fois. A la fin du lavage, égoutter la barrette sur du papier absorbant, en la tapant fermement.

Ajouter 50 µL de substrat puis 50 µL de chromogène dans chaque puits.

Mélanger en appliquant un léger mouvement de rotation.

Laisser incuber à température ambiante pendant 15 minutes.

Ajouter 50 µL de solution d'H₂SO₄ dans chaque puits.

Mélanger en appliquant un léger mouvement de rotation.

Lire les absorbances à 450 nm contre l'air à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Eviter la lumière directe pendant les étapes d'incubation. Couvrir la plaque de microtitration.

3 - Compte rendu.

Présenter le schéma de principe de la technique mise en œuvre.

Présenter un tableau de préparation de la gamme d'étalonnage.

Calculer pour chaque cupule le pourcentage d'activité :

$$\text{Pourcentage d'activité} = (A / A_{\text{max}}) \times 100 ;$$

N.B. : l'absorbance maximale est celle obtenue avec le témoin négatif.

Présenter un tableau de résultats des absorbances et pourcentages d'activité.

Tracer le graphe : pourcentage d'activité = f(log concentration aflatoxine).

Calculer la teneur en aflatoxine de chacun des échantillons.

Commenter la validité des résultats obtenus.

Conclure sur la qualité des échantillons.

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

ÉTUDE D'UNE EAU DESTINÉE A LA CONSOMMATION HUMAINE**BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE - MICROBIOLOGIE****(85 points)**

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

1^{er} jour**Durée : 5 H****A - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE 1^{er} jour (35 points)**

L'eau des rivières et des nappes phréatiques peut être contaminée par des résidus pharmaceutiques et des pesticides.

On se propose d'étudier la toxicité d'un pesticide sur des cellules animales en culture. On détermine la D.S.E. (dose sans effet) : dose maximale acceptable n'entraînant aucune cytotoxicité sur des cellules adhérentes en culture.

On dispose pour cela d'un échantillon de pesticide de concentration connue.

1 - Principe.

Des dilutions de pesticide sont incubées dans des puits de culture contenant une quantité définie de cellules animales vivantes.

Après incubation à 37°C en atmosphère saturée en H₂O et 5 % de CO₂, on détermine, au microscope inversé, la plus grande quantité de pesticide ne provoquant pas d'effet cytotoxique, c'est-à-dire n'entraînant pas le décollement des cellules.

2 - Matériel et réactifs.

Sous la hotte à flux laminaire :

- pipettes graduées stériles de 10 mL ;
- pipettes graduées stériles de 2 mL ;
- tubes à hémolyse stériles ;
- 1 flacon de PBS stérile (30 mL) ;
- 1 flacon de trypsine (2,5 mL) ;
- 1 flacon de DMEM enrichi de 10 % de SVF (15 mL) ;
- 1 fiole d'Erlenmeyer stérile.

Sur la paillasse dans le laboratoire de biologie :

- 1 hématimètre de Malassez + 1 lamelle ;
- bleu de Funk à 0,2 % en tampon pH 7 (500 µL) ;
- 1 P1000 + cônes stériles ;
- 1 P100 + cônes stériles ;
- 1 flacon de 75 cm² de culture de fibroblastes en mono-couche dans du DMEM additionné de 10 % de sérum de veau fœtal ;
- solution de pesticide à la concentration de 100 ng/mL et marqué « P » (1 mL) ;
- une boîte de culture stérile présentant 24 puits de 2 cm² ;
- un tube à hémolyse non stérile avec bouchon ;
- 10 tubes à hémolyse stériles ;
- diluant stérile, marqué « D », contenant du milieu DMEM sans SVF mais supplémenté en antibiotiques (10 mL).

3 - Mode opératoire.**3.1 - Examen du flacon de culture.**

Réaliser :

- un examen macroscopique ;
- un examen microscopique au microscope inversé.

3.2 - Préparation de la suspension cellulaire, sous hotte à flux laminaire.

L'ordre de passage sera indiqué (temps limité à 20 minutes).

3.2.1 - Trypsination :

Éliminer le surnageant.

Réaliser un lavage du tapis cellulaire avec 10 mL de PBS stérile.

Introduire 2 mL de trypsine. Laisser agir à température ambiante, surveiller le décollement.

Ajouter 10 mL de DMEM supplémenté avec 10 % de SVF.

Transférer 2 mL de la suspension dans un tube à hémolyse stérile, le reste dans la fiole d'Erlenmeyer stérile.

La suite de la manipulation se fera à la paillasse, dans le laboratoire de biologie.

3.2.2 - Numération de la suspension cellulaire et calcul de la prise d'essai nécessaire :

A partir de la suspension prélevée dans le tube à hémolyse, réaliser la numération des cellules viables après dilution au $\frac{1}{2}$ dans du bleu de Funk.

Calculer le volume de suspension cellulaire apportant x cellules viables.

(la valeur x sera donnée en début d'épreuve)

3.3 - Étude de la cytotoxicité du pesticide.

Toutes les manipulations se feront en conditions aseptiques.

A partir de la fiole d'Erlenmeyer stérile, distribuer le volume de suspension cellulaire apportant x cellules viables dans chacun des 9 puits de la boîte de culture (7 puits essais et 2 puits témoins).

Placer la boîte 30 min à 37°C (étuve ordinaire).

A partir de la solution de pesticide de 100 ng/mL et du diluant D, réaliser une série de dilutions dans 7 tubes à hémolyse stériles suivant une progression géométrique de raison 1/3 sous un volume total de 1,5 mL.

Distribuer 0,5 mL de chaque dilution dans les 7 puits essais de la boîte de culture. Ajouter 0,5 mL de diluant dans les 2 puits restant.

Incuber 48 heures à 37°C en atmosphère saturée en H₂O + 5 % de CO₂.

3.4 - Compte rendu.

3.4.1 - Rendre compte des observations macroscopique et microscopique de la culture.

3.4.2 - Donner le résultat de la numération en présence de bleu de Funk, ainsi que le pourcentage de mortalité.

3.4.3 - Calculer la prise d'essai nécessaire pour apporter x cellules par puits.

3.4.4 - Présenter le tableau de dilutions du pesticide.

B - MICROBIOLOGIE 1^{er} jour (50 points)**1 - Recherche et dénombrement des *E.coli*.**

La norme ISO 9308-1 décrit une méthode rapide de recherche des *E.coli*.
Une adaptation de cette méthode est proposée.

1.1 - Matériel.

- 1 flacon contenant 100 mL de l'échantillon d'eau noté « E » ;
- 1 membrane stérile (porosité 0,45 µm) ;
- 1 flacon d'eau distillée stérile ;
- un tube de milieu TSA en surfusion à 55°C (2,5 mL) ;
- une gélose TBA en petite boîte de Pétri de 55 mm de diamètre.

1.2 - Protocole opératoire.

Filtrer 100 mL de l'échantillon d'eau « E ».

Placer la membrane sur une boîte de Pétri préparée extemporanément avec une double couche de TSA et TBA (compositions données en annexe). Incuber à 36 (±2)°C pendant 4 à 5 h puis à 44 (±0,5)°C pendant 19 à 20 h.

Effectuer la filtration en présence d'un examinateur.

Remarque : la boîte à double couche doit être préparée 30 à 60 minutes avant d'y déposer la membrane.

2 - Étude des bactéries dénitrifiantes d'un biofilm.

Les bactéries dénitrifiantes sont des bactéries hétérotrophes qui, grâce à une nitrate réductase, utilisent les nitrates comme accepteurs terminaux d'une chaîne respiratoire en anaérobiose.

Certaines usines de traitements des eaux utilisent ces bactéries fixées sur des billes alvéolées pour former un filtre biologique de dépollution.

2.1 - Recherche des capacités de dénitrification d'une souche bactérienne.

2.1.1 - Recherche de la nitrate réductase (NR) et détermination du type de NR.

2.1.1.1 - Matériel.

- Culture bactérienne de 24 heures sur gélose nutritive inclinée notée « D » ;
- culture bactérienne de 24 heures en bouillon nitraté notée « Dbn » ;
- un tube d'eau physiologique stérile ;
- une pipette Pasteur longue ;
- une pipette Pasteur stérile ;
- un tube VF régénéré en surfusion à 55°C ;
- deux tubes VF nitraté régénérés en surfusion à 55°C ;
- un tube contenant 0,5 mL de chlorate de potassium à 10 % ;
- réactifs de recherche de la nitrate réductase.

2.1.1.2 - Protocole opératoire.

Vérifier que la bactérie étudiée possède une nitrate réductase.

Ajouter stérilement une goutte de solution de chlorate de potassium dans un des tubes de VF nitraté en surfusion.ensemencer les trois milieux VF. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

Appeler un examinateur pour l'ensemencement des 3 milieux.

2.1.2 - Identification de la souche bactérienne.

2.1.2.1 - Matériel.

- Un tube d'eau distillée stérile ;
- pipettes Pasteur ;
- peroxyde d'hydrogène ;
- réactif oxydase.

2.1.2.2 - Protocole opératoire.

Réaliser les tests d'orientation.

Présenter l'examen microscopique et la réalisation du(des) test(s) enzymatique(s) à un examinateur.

2.1.2.3 - Compte rendu.

Noter les résultats et proposer une orientation de diagnostic.

Faire viser sur le compte rendu les milieux et la microgalerie demandés pour poursuivre l'identification.

Ensemencer les milieux fournis pour l'identification.

2.2 - Dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans une eau de lavage des biofilms.

Les filtres font plusieurs mètres d'épaisseur et sont source potentielle de contamination.

Ils doivent être lavés à l'eau toutes les 24 heures afin d'éliminer les impuretés (biomasse bactérienne). Les eaux de lavages sont traitées en station d'épuration.

On se propose d'évaluer la contamination par *P. aeruginosa*.

2.2.1 - Matériel.

- un tube contenant 10 mL d'eau de lavage noté « L » ;
- 4 tubes à hémolyse stériles ;
- pipettes automatiques P 100, P 1 000 + cônes stériles ;
- un flacon d'eau physiologique stérile ;
- 6 géloses à l'acide nalidixique et au cétrimide.

2.2.2 - Protocole opératoire.

Réaliser le dénombrement par étalement sur gélose des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} (en double). Incuber 48 heures à 37°C.

ANNEXE

TSA : Gélose tryptonée au soja, composition pour 1 litre

Digestat trypsique de caséine	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar-agar (en poudre ou en flocons)	15 g

pH : 7,2 ± 0,1

TBA : Gélose tryptonée contenant des sels biliaires, composition pour 1 litre

Tryptone	20 g
Sels biliaires	1,5 g
Agar-agar (en poudre ou en flocons)	15 g

pH : 7,2 ± 0,1

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

CONTRÔLES ET ESSAIS REALISES DANS UNE INDUSTRIE**PHARMACEUTIQUE****MICROBIOLOGIE-BCM****(90 points)**

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

1^{er} jour**Durée : 5 H****A - MICROBIOLOGIE****(60 points)**

Des contrôles bactériologiques sont systématiquement réalisés sur les matières premières et les produits finis des industries pharmaceutiques.

1 - Essai en vue de la validation des Pétrifilms pour le dénombrement des levures dans une matière première : le gluconate de calcium. (23 points)

Le protocole retenu est le suivant: 10 g de produit sont dissous dans 90 mL d'eau peptonée pH 7,2.

Cette solution de gluconate de calcium est contaminée avec une quantité connue de levures du genre *Candida*.

1.1 - Matériel.

- 1 culture jeune de levures du genre *Candida* en bouillon Sabouraud notée: **Sab**.
- 5 tubes contenant 9 mL d'eau peptonée tamponnée pH 7,2 notés: **diluant**.
- 1 cellule de Malassez et sa lamelle.
- 6 Pétrifilms "levures et moisissures".
- 1 flacon contenant 120 mL de gélose Sabouraud à 4% de glucose placé en surfusion à 50°C.
- 6 boîtes de Pétri stériles de diamètre 90 mm.
- 1 diffuseur pour Pétrifilms.
- 9 pipettes de 1 mL stériles.
- 1 fiole d'Erlenmeyer contenant 100 mL de la solution de gluconate de sodium et notée: **produit à analyser**.
- 1 notice technique concernant les Pétrifilms "levures-moisissures".

1.2 - Protocole expérimental.

1.2.1 - Réalisation d'une gamme de dilutions à partir de la culture notée: **Sab**.

Préparer dans le diluant fourni les dilutions suivantes: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .
Une de ces dilutions sera réalisée devant un examinateur.

1.2.2 - Numérer en cellule de Malassez la dilution 10^{-1} préparée ci-dessus.

Montrer un champ microscopique à un examinateur.

1.2.3 - Contaminer le produit à analyser de telle sorte que la concentration finale en levures soit environ de : 10^2 levures . mL⁻¹.

1.2.4 - Préparer, dans le diluant, les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} du produit contaminé.

1.2.5 - Ensemencer des milieux pour dénombrement et des Pétrifilms.

Géloses Sabouraud: ensemencement dans la masse et en double couche avec les dilutions 10^0 , 10^{-1} et 10^{-2} du produit à analyser contaminé.

Pétrifilms : ensemencer chacun d'eux avec 1 mL des mêmes dilutions.

Tester 2 boîtes et 2 Pétrifilms par dilution.

Incuber 48 h à 30°C.

1.3 - Compte rendu.

1.3.1 - Calculer, à partir de la numération en cellule de Malassez, la concentration en levures dans la dilution 10^{-1} de la culture **Sab**. Expliciter le calcul.

1.3.2 - Expliquer la réalisation de la contamination du produit à analyser afin d'obtenir environ 10^2 levures . mL⁻¹.

2 - Contrôle de matière première: gluconate de calcium pour solution injectable. (16 points)

Le protocole retenu est conforme à la pharmacopée Européenne, monographie n° 0979 corrigée 1998.

2.1 - Matériel.

Echantillon à analyser noté **solution A**, en fiole d'Erlenmeyer.

4 fois 100 mL de diluant pharmacopée noté **Dil**.

1 GTS en boîte de Pétri notée « GTS ».

1 Gélose Sabouraud + chloramphénicol en boîte de Pétri notée « Sabouraud ».

1 unité de filtration.

2 membranes filtrantes 0,45 µm.

2.2 - Protocole opératoire.**2.2.1 - Préparation des échantillons à analyser (déjà effectuée).**

Il a été pesé 20 g de gluconate de calcium en poudre qu'on a introduit dans 80 mL de diluant de pharmacopée. On a obtenu la **solution "A" fournie**.

2.2.2 - Dénombrement des germes aérobies viables totaux.**Bactéries.**

Filtrer 10 mL de solution "A".

Rincer avec 2 x 100 mL de diluant pharmacopée (Dil).

Transférer la membrane sur la gélose trypticase soja.

Incuber 48 h à 30°C.

Levures.

Filtrer 10 mL de solution "A".

Rincer avec 2 x 100 mL de diluant pharmacopée (Dil).

Transférer la membrane sur gélose Sabouraud.

Incuber 48 h à 30°C.

Une filtration sera réalisée devant un examinateur.

3 - Contrôle de la concentration d'une solution de gentamicine sulfate destinée à la commercialisation. (21 points)

La concentration de la solution de gentamicine sulfate commercialisée par le laboratoire est théoriquement de 80 mg/mL. Un contrôle est nécessaire avant la mise sur le marché de cette solution.

3.1 - Réactifs et matériel.

Souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P en bouillon nutritif.

Un tube contenant du bouillon nutritif non ensemencé noté « bouillon nutritif ».

100 ml de tampon de dilution stérile : tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ à pH 8 (± 0,1) noté "**tampon de dilution**".

8 disques pour antibiogramme stériles, diamètre 12,7 mm, dans une boîte de Pétri.

2 tubes contenant chacun 12 mL de milieu de dosage (notés « milieu n°11 ») en surfusion.

Une boîte de Pétri (pour imprégner les disques).

2 boîtes de Pétri, diamètre 100 mm.

Solution de gentamicine sulfate étalon à 1000 µg / mL notée « **gentamicine étalon** ».

Solution de gentamicine à doser (à environ 80 mg/mL) notée " « **gentamicine à doser** ».

7 tubes stériles à fond conique de 15 mL.
 2 tubes à hémolyse stériles.
 4 cuves pour spectrophotomètre.
 5 pipettes de 10 mL stériles.
 5 pipettes de 1 mL stériles.
 Pipette automatique de 20, 200 µL, et cônes stériles.

3.2 - Protocole opératoire.

3.2.1 - Préparation des dilutions.

Effectuer ces dilutions en tube à fond conique :

- solution étalon : à partir de la solution à 1000 µg/mL, préparer une **solution S_A** de la façon suivante : 2 mL de solution étalon et 8 mL de tampon pH 8,0 ;
- solution inconnue : réaliser en cascade, en solution tampon pH 8,0 , deux dilutions de raison 1 /20. La deuxième dilution sera la solution **S_B** ;
- réaliser ensuite les dilutions suivantes , conformément au tableau ci-après, dans les tubes à fond conique :

Dilution :	Solution S _A	Solution S _B	tampon pH 8,0
R1 (« standard bas »)	100 µL		qsp 10 mL
R2 (« standard haut »)	200 µL		qsp 10 mL
E1 (« échantillon bas »)		100 µL	qsp 10 mL
E2 (« échantillon haut »)		200 µL	qsp 10 mL
Matériel à utiliser	P200	P200	pipette stérile de 10 mL pipette stérile de 1 mL

3.2.2 - Préparation des cultures bactériennes.

Ajuster la densité de la suspension de *Staphylococcus aureus* de façon à obtenir une absorbance de l'ordre de 0,40 à 580 nm.

Ajouter 0,15 mL de la suspension ainsi préparée à chacun des 2 tubes contenant le milieu de dosage n°11. Agiter et couler dans 2 boîtes de Pétri.

La lecture au spectrophotomètre sera effectuée devant un examinateur.

3.2.3 - Dépôt des disques (quatre disques par boîte).

Imprégner les disques avec 100 µL des solutions échantillons ou standards.

Déposer sur les milieux gélosés coulés en boîte de Pétri selon le gabarit joint en annexe.

Incuber 18 heures à 37°C.

3.3 - Compte rendu.

3.3.1 - Calculer les concentrations de gentamicine des solutions standards et estimer les concentrations de gentamicine dans les solutions échantillons.

3.3.2 - Expliquer la préparation de la suspension inoculum de *Staphylococcus aureus*.