

ANTIBIOGRAMME

TRAVAUX PRATIQUES DE GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNE
MODULE 29 MICROBIOLOGIE II
SV5

FACULTÉ DES SCIENCES, AGADIR
PR. MIMOUNI R.
2015/2016

Règles à suivre au laboratoire de microbiologie



Blouse boutonnée



Foulard en coton



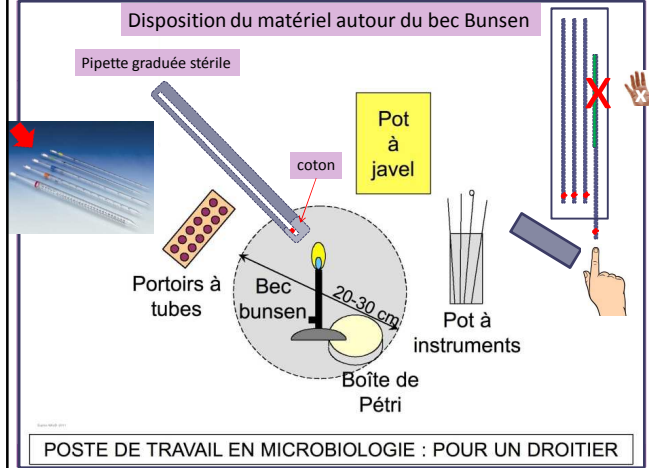
Pas d'affaires personnelles sur les paillasse de laboratoire ni par terre



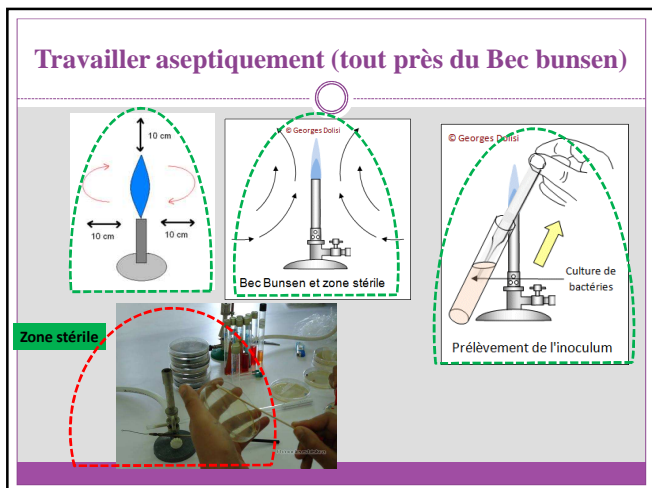
Désinfection de la paillasse avec l'eau de javel

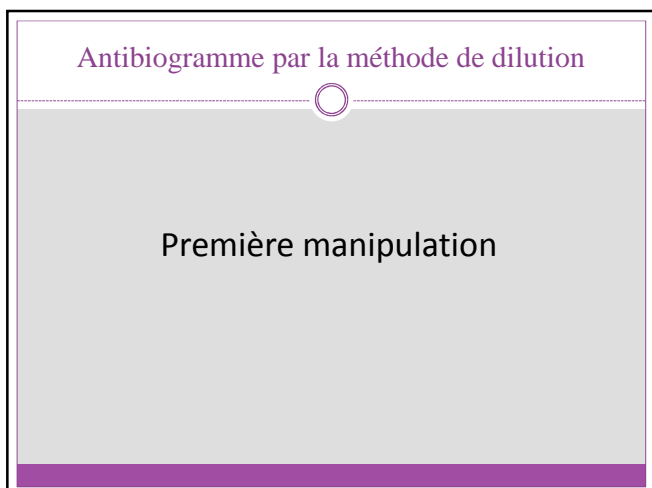


Disposition du matériel autour du bec Bunsen









Objectifs de la manipulation

- Apprendre à déterminer la CMI de l'antibiotique testé
- Apprendre à déterminer la CMB de l'antibiotique testé
- Calculer le rapport CMB/CMI
- Apprendre à déterminer le caractère de l'antibiotique étudié (bactéricide, ou bactériostatique)

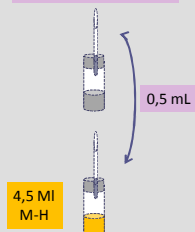
Matériel

- 8 tubes de 2,5 mL du bouillon Mueller-Hinton
- 1 tube de 4,5 mL du bouillon Mueller-Hinton
- solution mère de l'antibiotiques à tester:
 - Chloramphénicol à 640 mg/L dilué dans de l'alcool
 - Ampicilline à dilué dans l'eau
- Une suspension bactérienne pure en tube à essai ($2 \text{ à } 3 \cdot 10^6$ cfu/mL)
- Pipettes graduées cotonnées et stériles (1 et 5 mL)
- Bec bunsen
- Etuve réglée à 37°C
- Un pot d'eau de javel

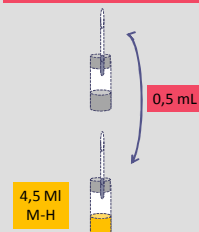
Antibiogramme par la méthode de dilution

Première séance: j1

Méthodes: Préparation des solutions d'antibiotiques

Ampicilline 1280 mg/L
(Soluble dans l'eau)

Ampicilline 128 mg/L

Chloramphénicol 640 mg/L
(Soluble dans l'alcool)

Chloramphénicol 64 mg/L

Attention
explosion

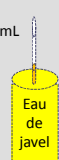
Déroulement de la manipulation: préparation de la gamme de dilution de l'antibiotique

Solution mère de l'ATB	4,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH

Antibiotique :

Solution mère du chloramphénicol à 640 mg/L

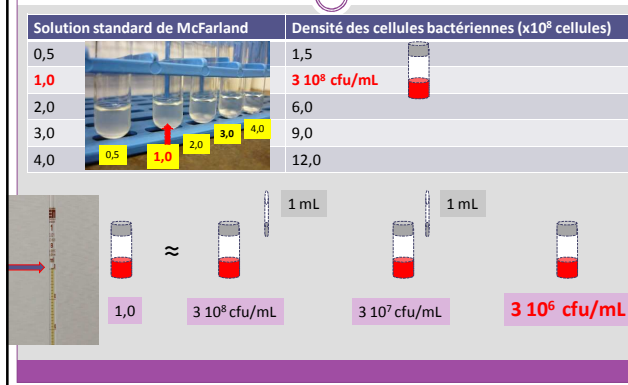
2,5 mL



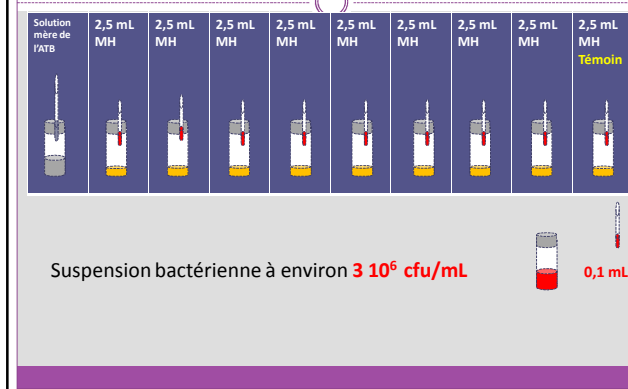
Déroulement de la manipulation: action du chloramphénicol

Solution mère de l'ATB	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH
0,5 mL Cm à 640 mg/L	64 mg/L (1/10)	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	0,5 mg/L	0 mg/L	
Volume total	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	

Préparation de la suspension bactérienne













Déroulement de la manipulation: action du chloramphénicol









Déroulement de la manipulation: action du chloramphénicol

Solution mère de J'ATB	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH
										Témoin
0,5 mL 640 mg/L	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	0,5 mg/L	0 mg/L	
Susp. B	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Volume total	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL

Déroulement de la manipulation: action de l'ampicilline

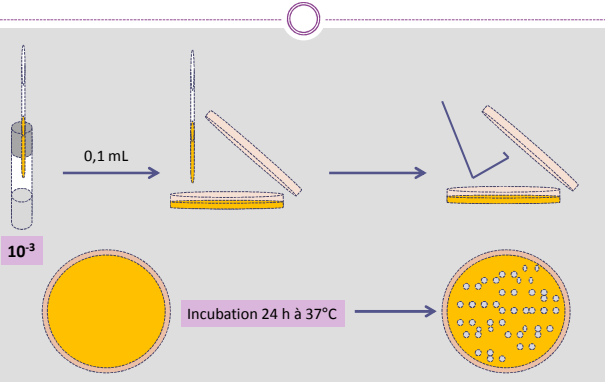
Solution mère de J'ATB	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH	2,5 mL MH
									
0,5 mL 1280 mg/L	128 mg/L (1/10)	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	0 mg/L
Susp.B	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Volume total	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL

Détermination de la concentration bactérienne du tube témoin (100%)

Témoin	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
					
Milieu M-H	9 mL d'eau physiologique stérile	9 mL d'eau physiologique stérile	9 mL d'eau physiologique stérile	9 mL d'eau physiologique stérile	9 mL d'eau physiologique stérile

Nombre de bactéries / mL ?

Dénombrement par étalement de l'inoculum sur la surface de la gélose nutritive (du 10⁻⁵ à 10⁻²)



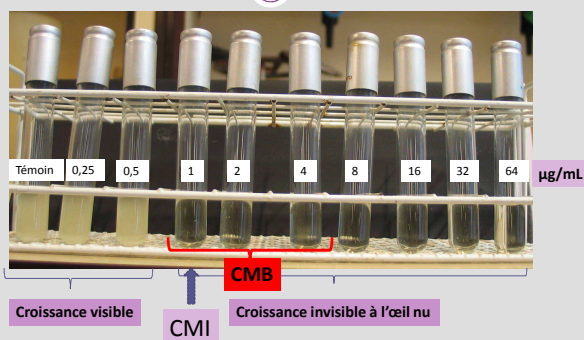
Ensemencement par étalement de 0,1 mL



Antibiogramme par la méthode de dilution

Deuxième séance: j2

Antibiogramme en milieu liquide (par dilution)



Détermination de la CMI après 24 heures d'incubation à 37 °C

1280 mg/L ATB	128 mg/L ATB	64 mg/L ATB	32 mg/L ATB	16 mg/L ATB	8 mg/L ATB	4 mg/L ATB	2 mg/L ATB	1 mg/L ATB	0 mg/L ATB
Solution mère de l'ATB	Pas de croissance visible	Pas de croissance visible	Pas de croissance visible	Pas de croissance visible	Croissance	Croissance	Croissance	Croissance	Croissance
				CMI = 16 mg/L d'ATB					

Détermination de la concentration bactérienne du tube témoin (100%)

Témoin	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
		Nombre de colonies > 300	60 ufc / 0,1 mL	4 ufc / 0,1 mL	0 ufc / 0,1 mL
N_o ufc / mL ?					

Détermination de la concentration bactérienne du tube témoin (100%)

0,1 mL

10⁻³

• 60 colonies / 0,1 mL 10⁻³

• Le nombre de colonies est compris entre 30 et 300 / boîte

• On considère la dilution 10⁻³ pour calculer le nombre de colonies

$$60 \times 10 \times 10^3 = 6 \times 10^5 \text{ cfu / mL}$$

Matériel

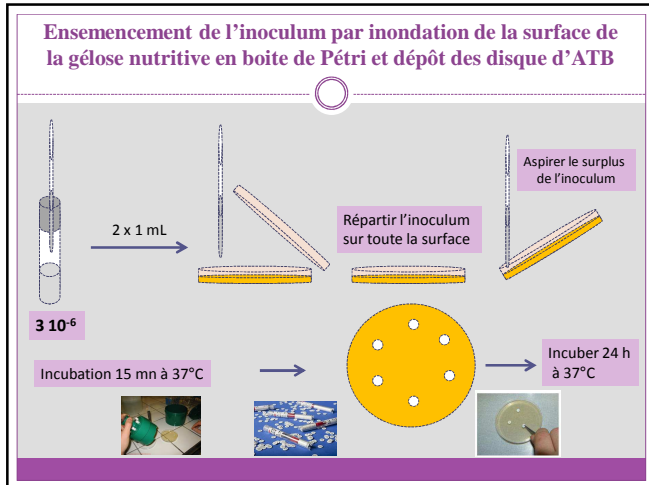
- Gélose Mueller-Hinton en boîte de Pétri
- Disques d'antibiotiques à tester
- Une suspension bactérienne pure en tube à essai (2 à 3 10^6 cfu/mL)
- Pipettes graduées cotonnées et stériles de 1 mL
- Bec bunsen
- Etuve réglée à 37°C
- Un pot d'eau de javel

Objectifs de la manipulation

- Apprendre à mesurer les diamètre des zones d'inhibition pour chaque antibiotique
- Apprendre à déterminer la CMI pour les antibiotiques testés
- Apprendre à utiliser l'échelle de concordance pour déterminer la catégorie de la souche étudiée (sensible, intermédiaire ou résistante)

Antibiogramme par la méthode de diffusion

Première manipulation: j1



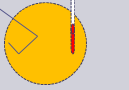
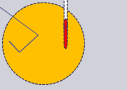

Antibiogramme par la méthode de diffusion

Deuxième séance: j2


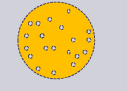
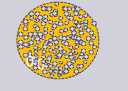
Antibiogramme par la méthode de dilution

Première manipulation

Détermination de la CMB après 24 heures d'incubation
(x: nombre de survivants ?)

4x [CMI] mg/L ATB	2x [CMI] mg/L	[CMI] mg/L ATB
		
Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive	Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive	Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive

Détermination de la CMB après 24 heures d'incubation
(x: nombre de survivants ?)

4x [CMI] mg/L	2x [CMI] mg/L	[CMI] mg/L
		
Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive	Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive	Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive
a = nombre de colonies / mL = 3 ufc / 0,1 mL	b = nombre de colonies / mL = 20 ufc / 0,1 mL	c = nombre de colonies / mL = 150 ufc / 0,1 mL

Calcul de la CMB




Témoin	CMI = mg/L	2x [CMI] mg/L	4x [CMI] mg/L
6 10 ⁵ cfu/0,1 mL	150 cfu/0,1 mL	20 cfu/0,1 mL	3 cfu/0,1 mL
6 10 ⁵ cfu/mL	1500 cfu/mL	200 cfu/mL	30 cfu/mL
100 %	0,25 %	0,03 %	0,005 %

• 6 10⁵ → 100 %

• 30 → ? %

$$? \% = \frac{100 \times 30}{6 \times 10^5} = 0,005 \%$$

↑
CMB

Détermination de la CMB après 24 heures d'incubation (x: nombre de survivants ?)		
4 x [CMI] mg/L	2 x [CMI] mg/L	[CMI] mg/L
		
Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive	Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive	Étaler 0,1 mL sur la surface de la gélose nutritive
a = nombre de colonies / mL = 3 ufc / 0.1 mL	b = nombre de colonies / mL = 20 ufc / 0.1 mL	c = nombre de colonies / mL = 150 ufc / 0.1 mL
$x_{64} (\%) = [100 \times a \times 10] / A$ = 0.005%	$x_{32} (\%) = [100 \times b \times 10] / A$ = 0,03%	$x_{16} (\%) = [100 (\text{Témoin}) \times c \times 10] / A$ (nombre de colonies au niveau du témoin) = 0,25%
CMB = 64 mg / L moins de 0,01 % de Survivants	Plus de 0,01 % de survivants	Plus de 0,01 % de survivants

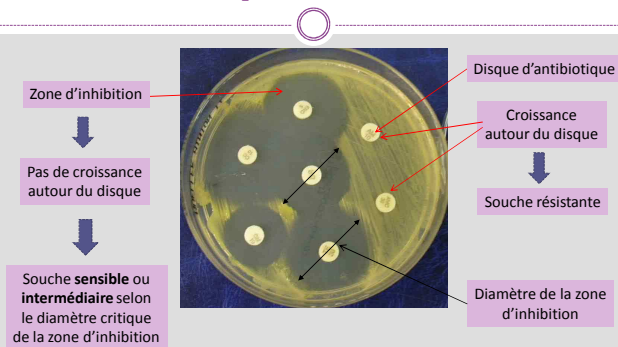
Interprétation du rapport CMB / CMI

- La CMI et la CMB sont des caractéristiques d'un antibiotique pour une souche donnée.
- L'analyse de la concentration minimale bactéricide et de la concentration minimale inhibitrice (CMB/CMI) permet de caractériser l'effet de l'antibiotique étudié sur une souche bactérienne donnée.
 - CMB / CMI = 1, l'antibiotique est **bactéricide**
 - CMB / CMI est supérieur à 2, l'antibiotique est **bactériostatique**.
- CMB / CMI = (64 / 16) = 4**

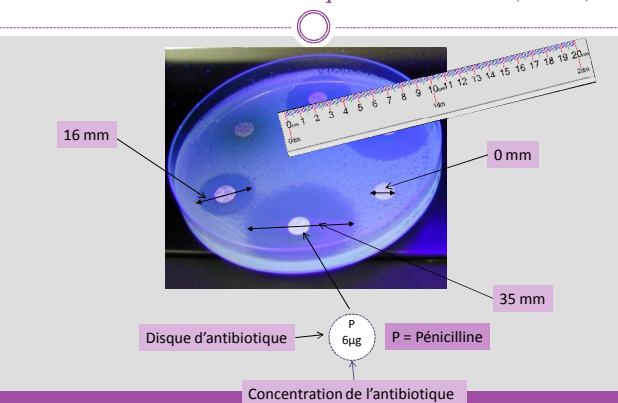
Antibiogramme par la méthode de diffusion

Deuxième manipulation

Lecture du résultat après 24 heures d'incubation à 37°C



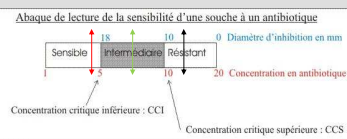
Mesure des diamètres critiques d'inhibition (d et D)



Critères de catégorisation selon les valeurs critiques

Catégorie	CMI (mg/L)	Diamètre ϕ en mm
S	$CMI \leq c$	$\phi \geq D$
R	$CMI > C$	$\phi < d$
I	$c < CMI \leq C$	$d \leq \phi < D$

c: concentration critique inférieure
C: concentration critique supérieure
d: diamètre critique inférieur
D: diamètre critique supérieur



Détermination des catégories cliniques (souches sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistantes (R))

DÉNOMINATIONS COMMUNES	NOMS DE SPÉCIALITÉS (liste indicative)	CHARGE DU DISQUE (1)	SIGLE DU DISQUE	diapason (mm) SENSIBLE INTERM. RESISTANT CMI (mg/l)
PÉNICILLINES				
Pénicillines G	Réponse valable pour toutes les pénicillines G			
Pénicilline G	Extencilline, Oracilline, Oopen, Pénicilline G, Specilline G	6 µg (10 U.I.)	P	D = 30 d = 8
Pénicillines A				
Ampicilline et dérivés (Entérobactéries)	Bacampiciline, Magnipen, Negmapen, Penglobe, Pénicilline, Pondocil, Proampi, Rosampiline, Suvipen, Totapen, Ukapien, Versapen	10 µg	AM	29
Ampicilline* (3) + Sulbactam		10 µg = 10 µg	FAM	CMI

LECTURE:
 Diamètre mesuré ≥ D → Souche sensible
 Diamètre mesuré entre D et d → Souche intermédiaire
 Diamètre < d → Souche résistante

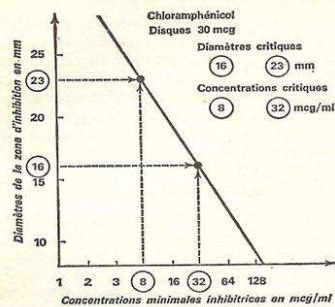
Interprétation des tests de sensibilité

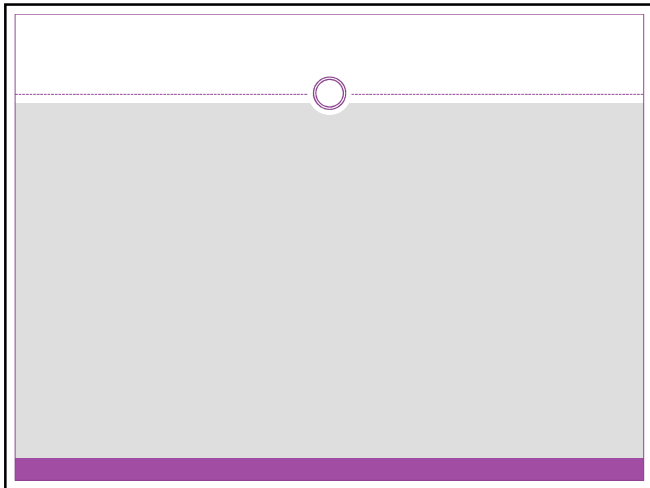
- On distingue trois catégories: Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).
 - Les souches de la **catégorie S** sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte selon la posologie recommandée.
 - Les souches de la **catégorie R** sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quelque soit le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
 - Les souches de la **catégorie I** sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible.

Corrélation entre le diamètre de la zone d'inhibition et la concentration de l'antibiotique

LECTURE:

- Les souches sensibles présentent une large zone d'inhibition (D) et de faibles concentration en ATB (c).
- Les souches résistantes présentent une zone d'inhibition réduite (< d) ou nulle (= 0) et de des concentrations assez grandes en ATB (D).





Calcul de la CMB

- Culture à 64 mg/L d'ATB
 - $a = 3 \text{ cfu} / \text{mL}$ (nombre de colonies sur la surface de la gélose nutritive ensemencée avec 0,1 mL de la culture contenant 64 mg / L d'ATB)
 - $a \times 10 = 3 \times 10 \text{ cfu} / \text{mL}$ (nombre de colonies sur la surface de la gélose nutritive ensemencée avec 1 mL de la culture contenant 64 mg / L d'ATB)
 - Nombre de colonies de la culture témoin = A (100%) = $6 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$
 - $x_{64} (\%) = (100 (\%) \times a \times 10) / A = (100 \times 3 \times 10 / 6 \times 10^5 = 3000 / 6 \times 10^5 = 0,005 \%$
 $< 0,01 \%$
- Conclusion: CMB = 64 mg / L d'ATB car moins de 0,01 % de survivants
