

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE
MEDECINE 3^{ème} Année

Etude de la sensibilité des Bactéries aux antibiotiques

Intérêt

Elle a un double intérêt :

- **Thérapeutique** : confirme et/ou adapte une antibiothérapie.
- **Epidémiologique** : surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Les méthodes d'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

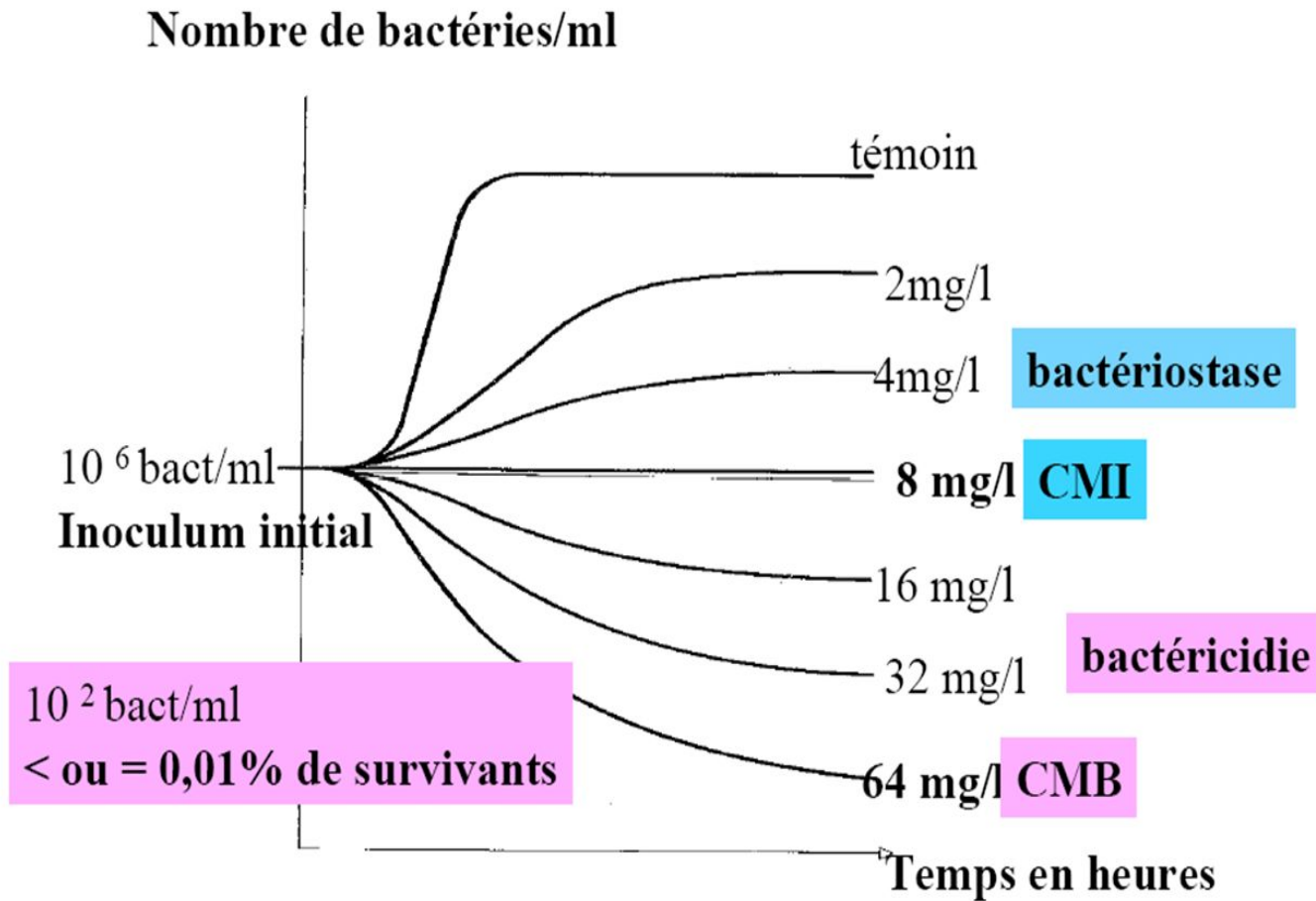
- CMI
- Antibiogramme
- Automates
- Nouvelles méthodes rapides
- Etude du pouvoir bactéricide du sérum ou le dosage des antibiotiques dans le sérum.

1. La CMI : concentration minimale inhibitrice

- Est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24H.
- C'est le point limite universellement utilisé pour caractériser l'activité d'un antibiotique.
- Quantifie la **bactériostase**.

- La CMB : **concentration minimale bactéricide**:
 - Est la concentration d'antibiotique permettant d'obtenir **après 18h de contact, un taux de survivants inférieur ou égal à 0,01% de l'inoculum initial.**
 - Quantifie **la bactéricidie.**

Courbe de croissance en présence d'antibiotiques

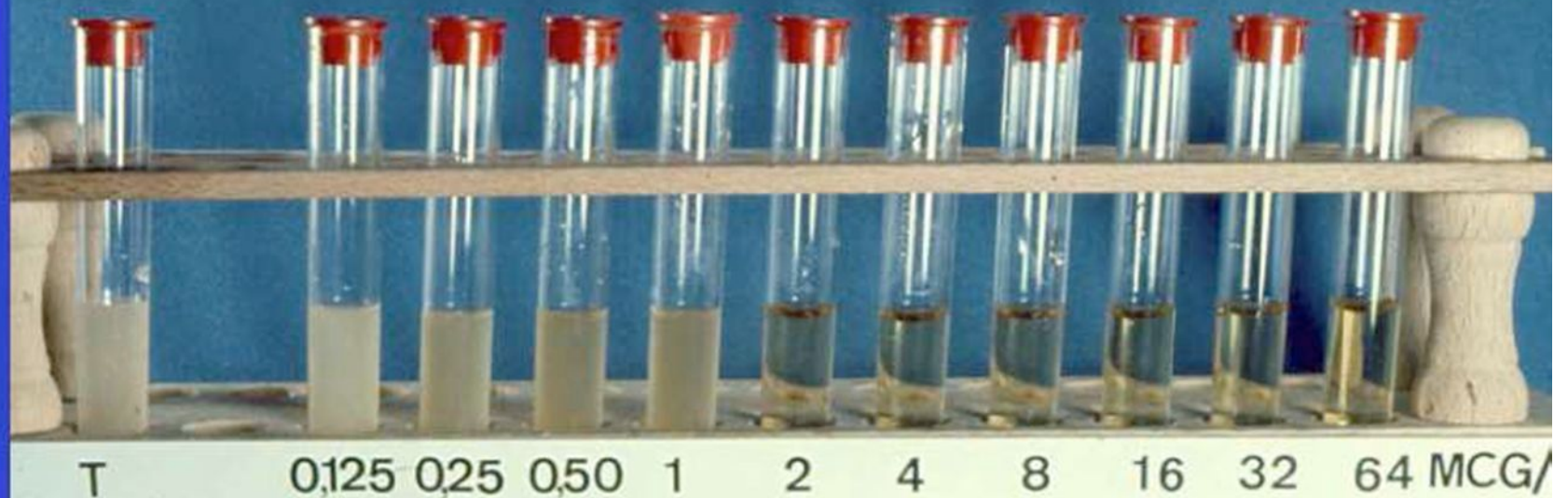


Méthodes de détermination de la CMI

a) Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide:

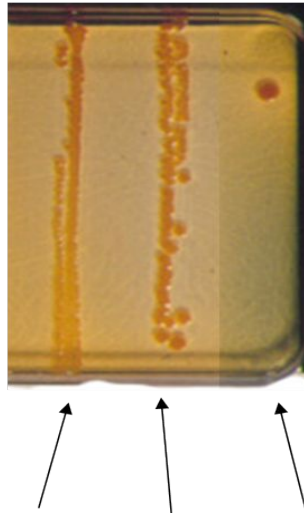
- Une gamme de concentrations d'antibiotiques de progression géométriques 2 puis la suspension bactérienne préparée en bouillon est ajoutée à volume égal.
Après 18-24H d'incubation à 37°C, la CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible.
- Les tubes négatifs sont repiqués sous formes de stries sur une gélose sans antibiotique.
- Après une nouvelle incubation, la CMB est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique qui laisse le même nombre de survivants (0 à 1 colonie) que la dilution 10^{-4} de l'inoculum; qui laisse un nombre de survivants $< \text{ou} = 0,01\%$ de l'inoculum initial.

2. Résultat après 24 heures

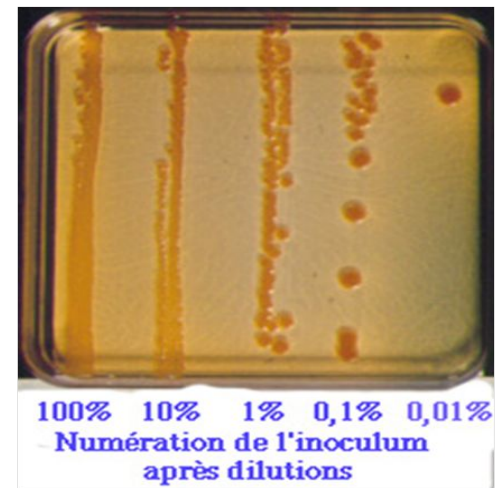
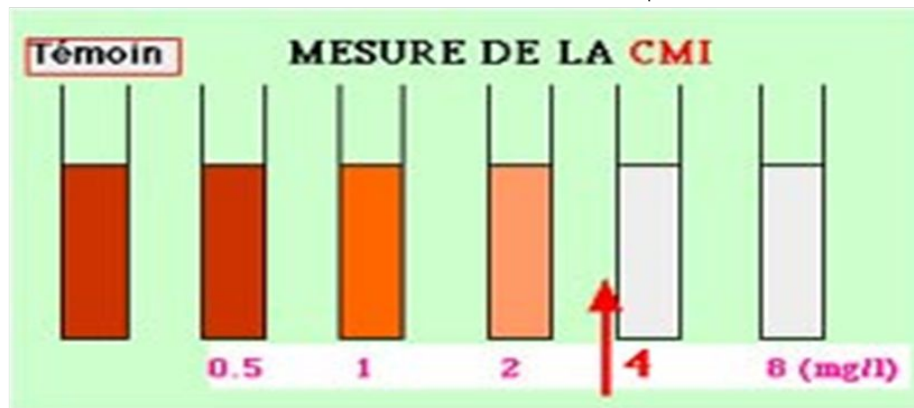


CMB

CMB de l'amoxicilline
pour E.coli: 8 mg/l



La CMB est la plus petite
concentration de l'antibiotique
qui réduit la population
bactérienne 10 000 fois



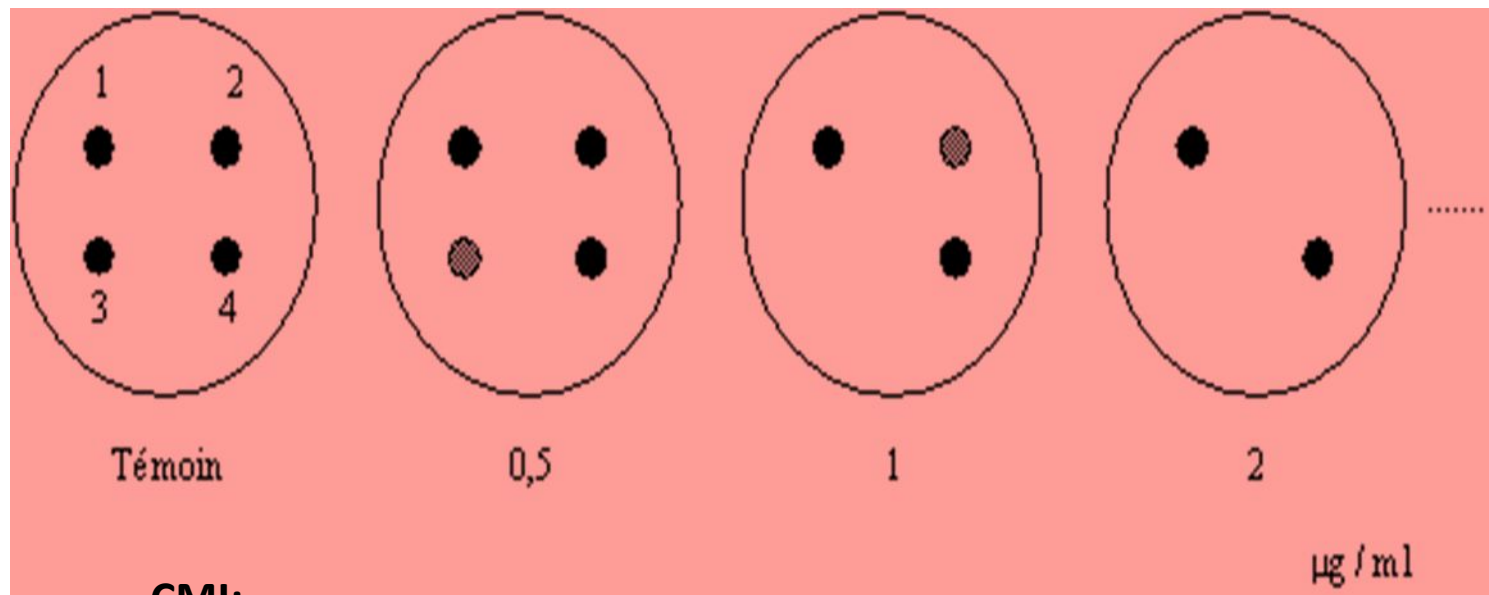
b) Détermination de la CMI par dilution en milieu solide :

Une gamme de concentrations d'antibiotique de progression géométrique 2 est préparée, puis chaque dilution est ajoutée dans de la gélose en surfusion coulée en boîte de pétri.

Après solidification et séchage, les suspensions bactériennes sont déposées à l'aide d'une anse calibrée.

Après 18-24H, la CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible (au plus 03 colonies).

Cette méthode permet de tester simultanément plusieurs souches vis-à-vis chaque antibiotique.



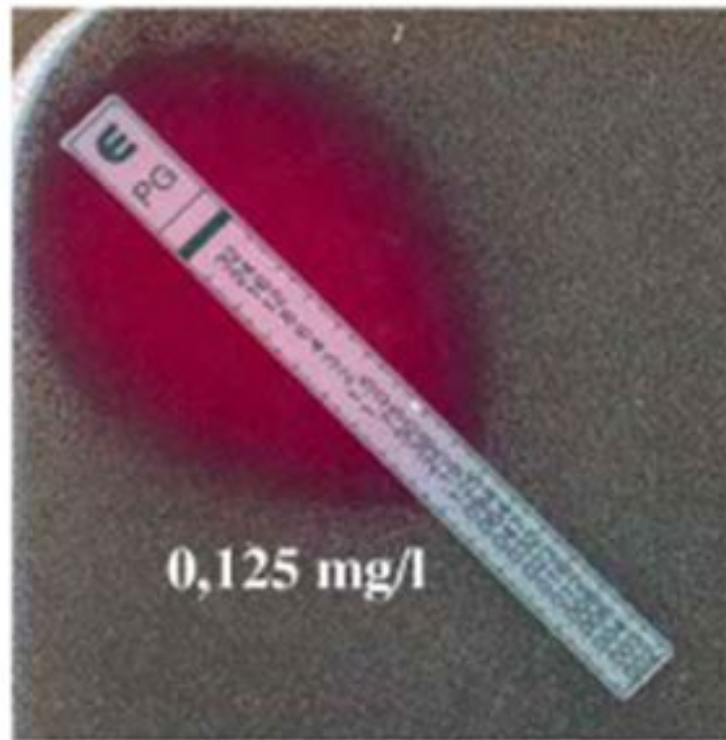
CMI:

Souche 1: > 2mg/l

Souche 2: 2mg/l

Souche 3: 1 mg/l

C) Détermination de la CMI par bandelette (E-test) :



D) Détermination automatisée de la CMI :



Mesure de la cinétique de croissance des germes en présence d'une concentration d'antibiotiques judicieusement choisie.



E) AntibioGramme par diffusion en milieu gélosé (estimation de la CMI) :



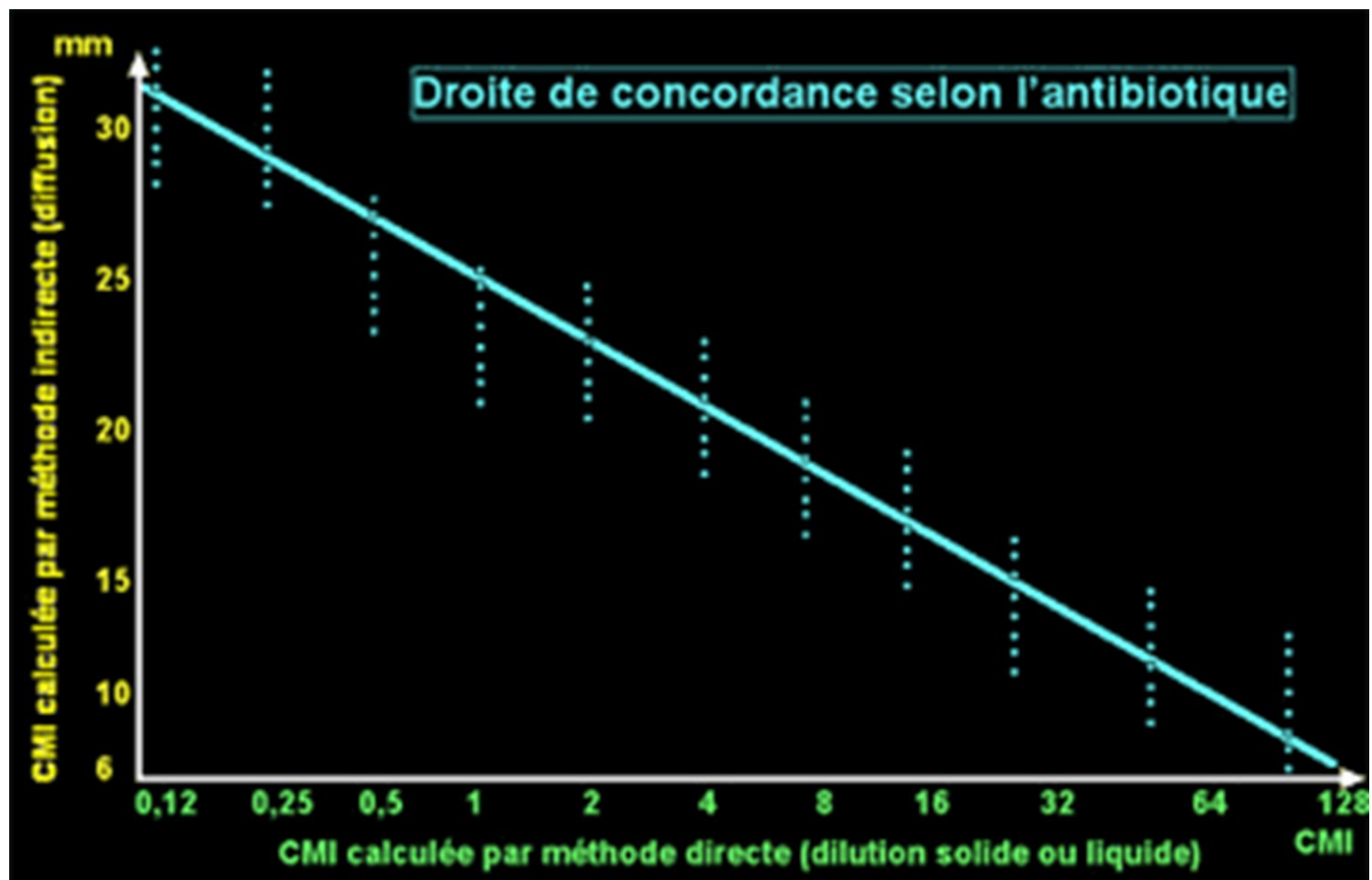
Antibiogramme par diffusion des disques en milieu gélosé

- Principe :

Une suspension bactérienne est étalée à la surface d'un milieu gélosé, puis des disques de papiers imprégnés d'antibiotique sont appliqués à la surface de la gélose .

L'antibiotique diffuse depuis le disque dans la gélose, avec un gradient de concentration diminuant du disque jusqu'à la périphérie .

- Après 18-24H d'incubation à 37°C, la culture bactérienne délimite une zone d'inhibition dont le diamètre est inversement proportionnel à la CMI.
- Une courbe de concordance est établie entre le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI en testant un grand nombre de souches de sensibilités variées.
- Les diamètres critiques de sensibilité (D) et de résistance (d) sont déduits de cette courbe et des concentrations critiques de sensibilité (C) et de résistance (c) déterminées lors d'études pharmacologiques et cliniques.



Technique en pratique

a) Milieu :

- Gélose Mueller-Hinton (MH) coulée en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

b) Inoculum ou suspension bactérienne:

- A partir d'une **culture pure de 18h** sur milieu d'isolement, racler quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne → son opacité doit être équivalente à **0,5MC Farland** ou à une **DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm** contenant environ **10^8 bactéries par ml**
- Ensemencer les boîtes gélosées rapidement .

c) Ensemencement de la suspension bactérienne sur MH :

Par écouvillonnage (voir video)

d) Application des disques d'antibiotiques

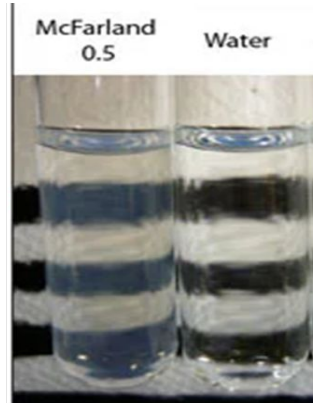
- **Les ATB à tester sont choisis selon la bactérie isolée** (les ATB qui sont normalement actifs sur l'espèce en question, à la recherche de l'apparition de résistances acquises)
- On ne met **pas plus de 6 disques d'antibiotiques** sur une boîte de 90 mm de diamètre.
- Les disques d'antibiotiques doivent **être espacés de 24 mm.**
- Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.

e) Incubation des boîtes de géloses à 35° C pendant 18h

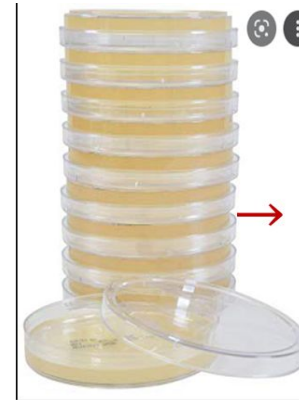
(Etuve bactériologique)



Culture pure d'une bactérie



Suspension de la bactérie à 0,5

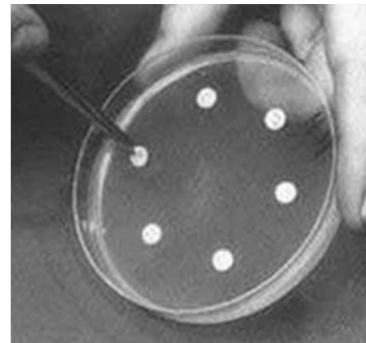


Géloses MH

**Ensemencer la
suspension
Bactérienne
sur cette
gélose**

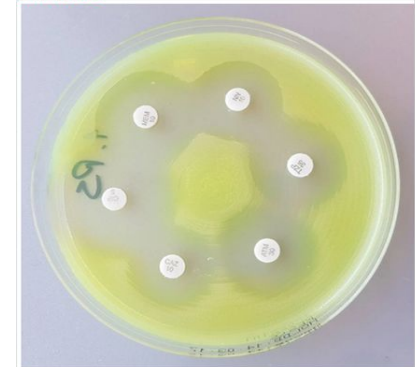


Exp d'une cartouche de disque ATB



**Appliquer les disques ATB
avec une pince ou un
applicateur**

**18H
d'incubation
(Etuve)**



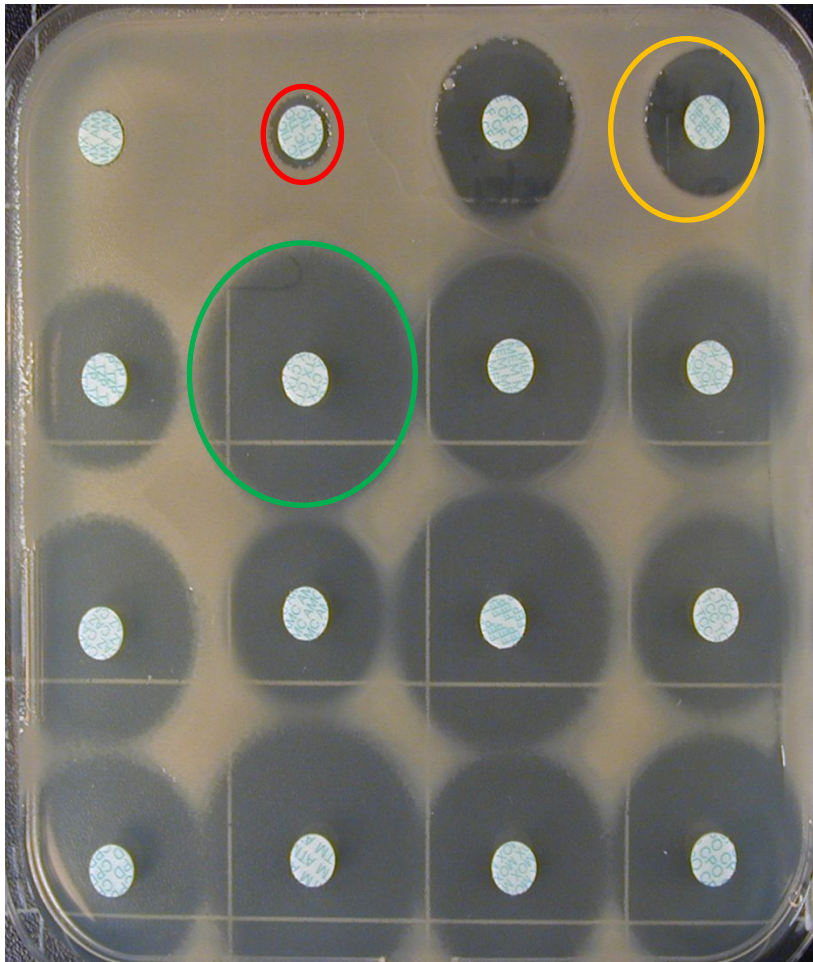
**Mesurer les diamètres
d'inhibition de la croissance
bactérienne par l'ATB**

- Disques ATB selon les familles ou les genres bactérien

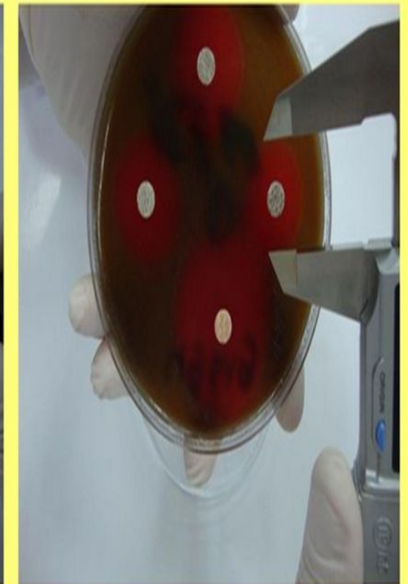
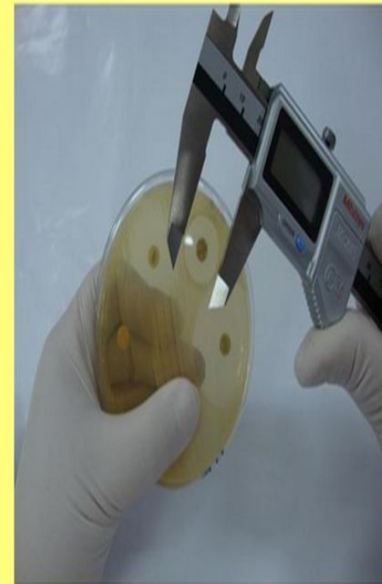
| Entérobactéries | <i>Pseudomonas</i> spp. |
|--|---|
| Ampicilline* (10µg) | Ticarcilline (75µg) |
| Amoxicilline + Acide clavulanique (20/10µg) | Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg) |
| Céfalotine**** (30µg) | Pipéracilline (100µg) |
| Céfazoline (30µg) | Céftazidime (30µg) |
| Céfoxitine (30µg) | Aztréonam (30µg) |
| Céfotaxime** (30µg) | Imipénème (10µg) |
| Imipénème (10µg)/ Méropénème (10µg) | Amikacine (30µg) |
| Ertapénème (10µg) | Gentamicine (10µg) |
| Amikacine (30µg) | Tobramycine (10µg) |
| Gentamicine (10µg) | Nétilmicine (30µg) |
| Acide nalidixique (30µg) | Ciprofloxacine (5µg) |
| Ciprofloxacine (5µg) | Lévofloxacine (5µg) |
| Colistine (10µg) ***** | Fosfomycine (50µg) +50µg G6P |
| Chloramphénicol (30µg) | Rifampicine (30µg) |
| Furanes (300µg) | Colistine (10µg) |
| Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg) | |
| Fosfomycine (200µg) | |
| | |

- **f) Lecture-Interprétation :**

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer les résultats aux valeurs critiques établis au préalable pour chaque ATB,
- Classer la bactérie en : Sensible , Intermédiaire ou résistante à l'ATB ,
- **Recommandations du CLSI**



Bien positionner le pied à coulisse afin de faire une bonne lecture des diamètres



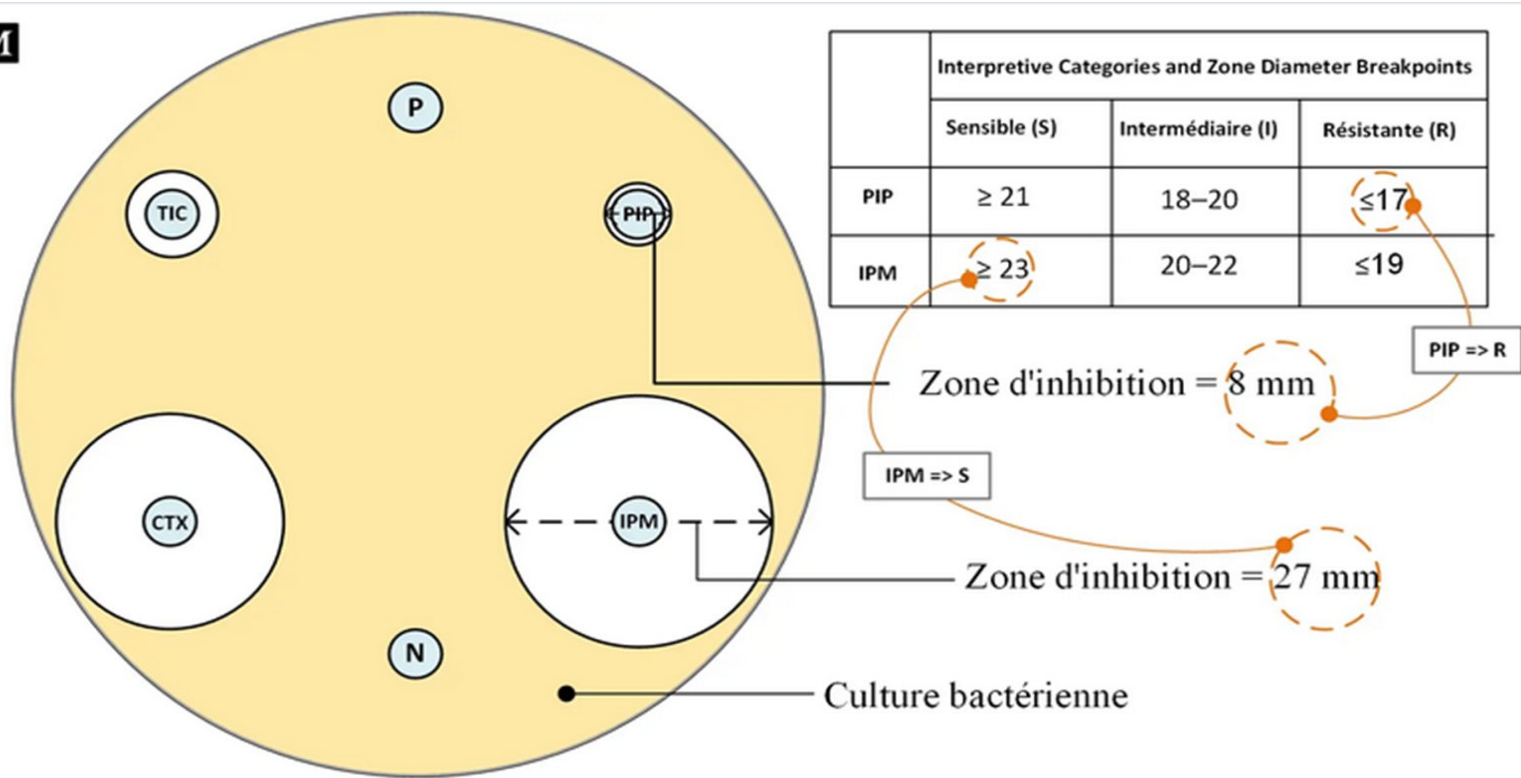
M**Lecture d'antibiogramme**

Table de lecture des diamètres des zones d'inhibition et CMI pour entérobactéries

| Antibiotiques testés | Charge des Disques | Diamètres critiques (mm) | | | CMI critiques (µg/ml) | | |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------------|---------|-------|-----------------------|-------|--------|
| | | R | I | S | R | I | S |
| Ampicilline | 10µg | ≤ 13 | 14 – 16 | ≥ 17 | ≥ 32 | 16 | ≤ 8 |
| Amoxicilline +Ac.clavulanique | 20/10µg | ≤ 13 | 14 – 17 | ≥ 18 | ≥ 32/16 | 16/8 | ≤ 8/4 |
| Céfazoline | 30µg | ≤ 19 | 20 – 22 | ≥ 23 | ≥ 8 | 4 | ≤ 2 |
| Céfalotine | 30µg | ≤ 14 | 15 – 17 | ≥ 18 | ≥ 32 | 16 | ≤ 8 |
| Cefoxitine | 30µg | ≤ 14 | 15 – 17 | ≥ 18 | ≥ 32 | 16 | ≤ 8 |
| Céfotaxime | 30µg | ≤ 22 | 23 – 25 | ≥ 26 | ≥ 4 | 2 | ≤ 1 |
| Ceftriaxone | 30µg | ≤ 19 | 20 – 22 | ≥ 23 | ≥ 4 | 2 | ≤ 1 |
| Imipénème/Meropénème | 10µg | ≤ 19 | 20 - 22 | ≥ 23 | ≥ 4 | 2 | ≤ 1 |
| Ertapénème | 10µg | ≤ 19 | 20 - 22 | ≥ 23 | ≥ 1 | 0,5 | ≤ 0,25 |
| Amikacine | 30µg | ≤ 14 | 15 – 16 | ≥ 17 | ≥ 64 | 32 | ≤ 16 |
| Gentamicine | 10µg | ≤ 12 | 13 – 14 | ≥ 15 | ≥ 16 | 8 | ≤ 4 |
| Acide nalidixique | 30µg | ≤ 13 | 14 – 18 | ≥ 19 | ≥ 32 | --- | ≤ 16 |
| Ciprofloxacine | 5µg | ≤ 15 | 16 – 20 | ≥ 21 | ≥ 4 | 2 | ≤ 1 |
| Chloramphénicol | 30µg | ≤ 12 | 13 – 17 | ≥ 18 | ≥ 32 | 16 | ≤ 8 |
| Colistine | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Furanes | 300µg | ≤ 14 | 15 – 16 | ≥ 17 | ≥ 128 | 64 | ≤ 32 |
| Fosfomycine | 200µg | ≤ 12 | 13 – 15 | ≥ 16 | ≥ 256 | 128 | ≤ 64 |
| Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole | 1.25/23.75µg | ≤ 10 | 11 – 15 | ≥ 16 | ≥ 4/76 | ----- | ≤ 2/31 |

- **S = forte probabilité de succès thérapeutique aux posologies recommandées** en cas de traitement par voie générale ou orale.
- **R = forte probabilité d'échec thérapeutique** indépendamment de la dose et de la voie d'administration.
- **I = probabilité de succès thérapeutique forte uniquement dans le cas d'un traitement par voie systémique avec une posologie forte ou lorsque l'antibiotique se concentre au site de l'infection.**

Lecture interprétative de l'antibiogramme

- Un antibiogramme ne se lit pas : il s'interprète.

