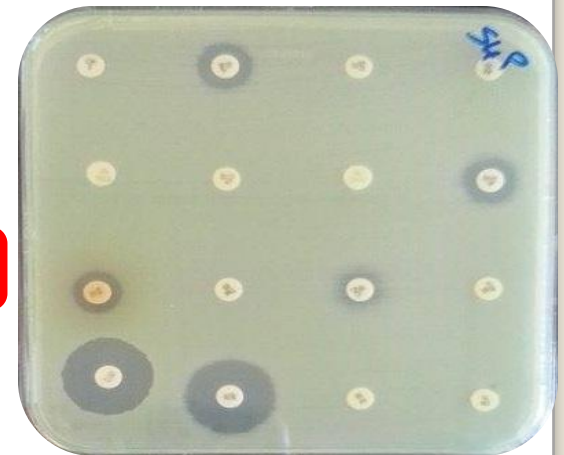


Chapitre 2 : Les techniques analytiques de laboratoire médical relevant de la microbiologie/ bactériologie.

- I. les principes liés aux différentes techniques de stérilisation applicables à la microbiologie**
- II. Techniques d'examen microscopique**
- III. Utilisation des milieux de cultures**
- IV. Identification biochimique**
- V. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme**



L'antibiogramme est toujours indiqué en raison de la fréquence élevée de la **résistance bactérienne aux antibiotiques**:

- ★ β -lactamines
- ★ Amino-glycosides – Tétracycline
- ★ Macrolide
- ★ Fluoroquinolones - Lipopeptide...

IN VITRO : Milieu de culture (Muller Hinton)

La réaction de molécule d'antibiotique sur une souche bactérienne



Selon les recommandations de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ou Clinical Laboratory Standards Institute (EUCAST / CLSI)

- Dépistage des résistances acquises et l'orientation des décisions thérapeutiques.
- Surveiller l'évolution des spectres cliniques des antibiotiques et l'adaptation d'une antibiothérapie probabiliste

Résistance

Les bactéries peuvent résister a un ATB => **Naturelle**
(Caractéristique propre, Chromosomique)
=> **Acquise**
(Modification génétique : mutation, acquisition d'un plasmide ou transposon)



La sensibilité d'une bactérie à un antibiotique est mesurée **par la concentration minimale inhibitrice (CMI)** de ce dernier



La plus petite quantité d'antibiotique capable d'inhiber une croissance visible à l'œil nu, elle explore donc l'effet bactériostatique.

CMI $\mu\text{g/ml}$ ou mg/L

Les dilutions en milieu liquide ou solide

La plus utilisé dans la recherche

Diffusion en milieu gélosé 'E-test'

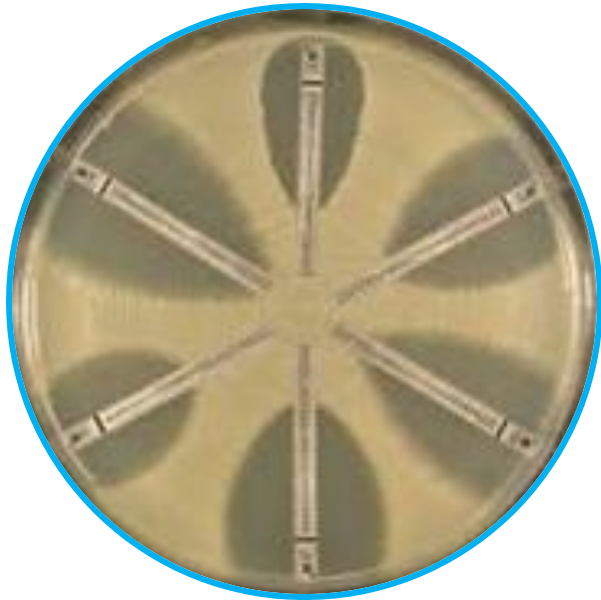
La plus utilisé dans les laboratoires d'analyse et de la recherche aussi

Appareils 'automate'

utilisé dans les laboratoires d'analyse et de recherche avancé

Diffusion en milieu gélosé 'E-test'

(supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur)



Le Etest®, technique en milieu gélosé, permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester.

Ce gradient couvre une zone qui, en fonction des molécules, va de 0,016 à 256 mg/L ou de 0,002 à 32 mg/L.



CMI 0.25 µg/mL

l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture, imprimé sur la bandelette, permet une interprétation rapide.

Zone d'inhibition et interprétation



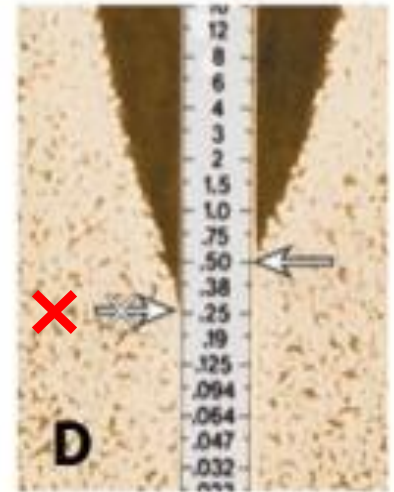
Une zone de décrochage (dip) dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse



La présence de colonies "squatter" doit être analysée (résistance hétérogène, émergence de mutants résistants, mélange bactérien)



La présence d'une croissance en ligne le long de la bandelette n'est pas prise en compte et résulte certainement d'un séchage insuffisant de la surface du milieu



Une asymétrie des points d'intersection de l'ellipse avec la bandelette conduit à lire la CMI au niveau le plus élevé.

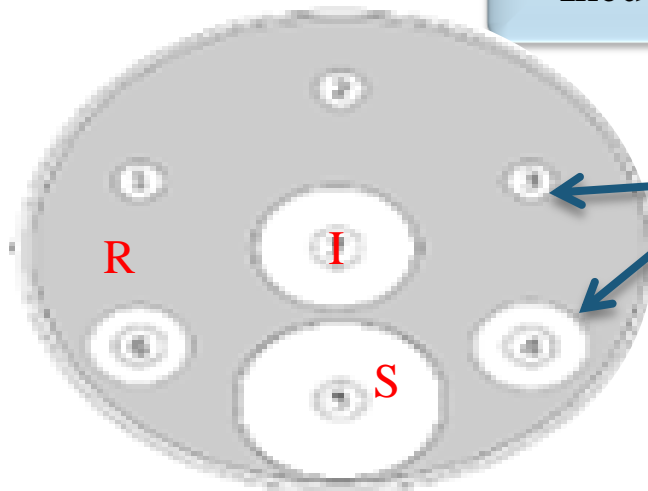
La technique standardisée : diffusion des disques en milieu gélosé

Principe de la technique

un milieu de culture standardisé « Muller Hinton » préalablement ensemencé avec un inoculum **calibré à 0.5 MF** d'une culture pure de la bactérie à tester

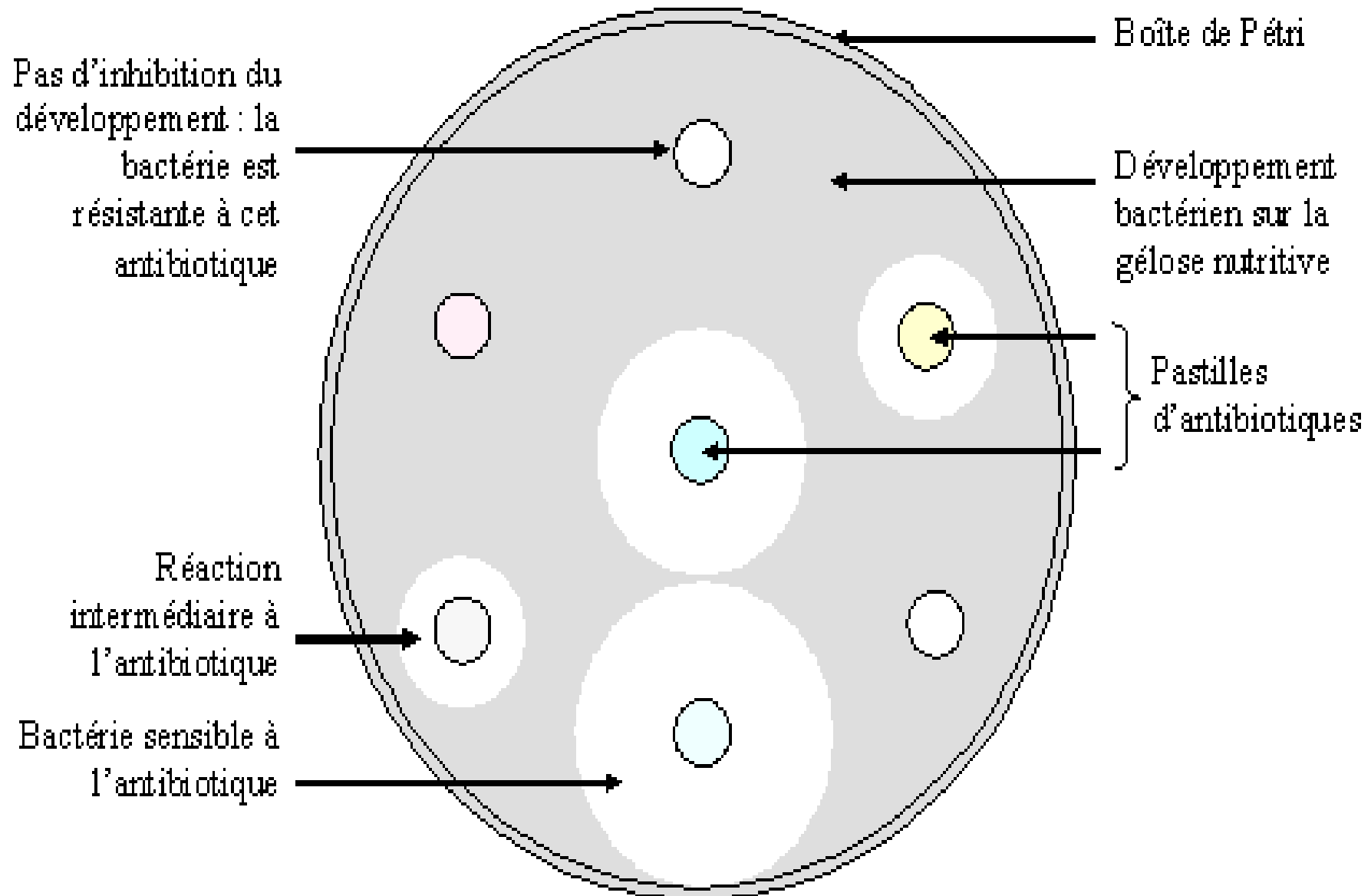
Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien

Incubation



les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés


Céphalosporines	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Céfaclor	-	-		-	-
Céfadroxil (cystites)	16	16	30	12	12
Céfalexine (cystites)	16	16	30	14	14
Céfazoline	-	-		-	-
Céfépime	1	4	30	24	21
Céfixime (cystites)	1	1	5	17	17
Céfotaxime	1	2	5	20	17
Céfoxitine	8	16	30	15	19
Céfoxitine (dépistage) ¹	NA	NA	30	19	19
Cefpodoxime (cystites)	1	1	10	21	21
Ceftaroline	0,5	0,5	5	23	23
Ceftazidime	1	4	10	22	19
Ceftibuten (cystites)	1	1	30	23	23
Ceftriaxone	1	2	30	23	20
Céfuroxime iv	8 ²	8	30	18	18
Céfuroxime oral (cystites)	8	8	30	18	18



Un antibiogramme

Paramètres importants

Le milieu de culture

- 
- Permettre la croissance de nombreuses bactéries,
 - Ne pas contenir d'inhibiteurs des antibiotiques,
 - Teneur en calcium et en magnésium contrôlées,
 - Un pH entre 7,2 et 7,4.

Mueller Hinton (plus 5% de sang pour les germes exigeants).

Coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

l'antibiotique contenu dans le disque se solubilise dans l'eau de la gélose.

La diffusion peut-être schématiquement présentée en **deux étapes** :

une diffusion verticale (en profondeur) dans le milieu contenu dans le cylindre délimité par le disque pré-imprégné,

une diffusion horizontale (latéralement) qui répartit l'antibiotique selon un gradient de concentrations dont le maximum est situé au niveau du disque

Les disques d'antibiotiques

- Fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure,
- Imprégnés d'agents antimicrobiens à des concentrations précises appelée charge du disque.
- Identifiés par un sigle, comportant 1 à 3 lettres, imprimé de chaque côté du disque

Sigle	Antibiotique	Famille
AM	Ampicilline	Aminopénicilline
AMC	Amoxicilline + acide clavulanique	Aminopénicilline
AMX	Amoxicilline	Aminopénicilline
AN	Amikacine	Aminosides
ATM	Aztréonam	Monobactame
AZM	Azithromycine	Macrolides
B	Bacitracine	Polypeptides
C	Chloramphénicol	Phénicolés

Le laboratoire a pour responsabilité de **stocker les disques** dans des conditions optimales et de ne pas utiliser des disques périmés.

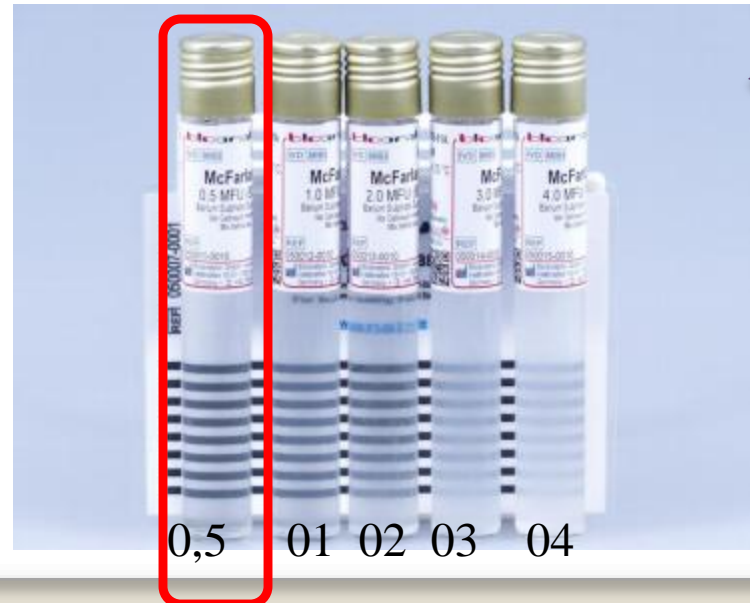
Avant utilisation, les disques doivent être amenés à température ambiante. Toute cartouche ouverte doit être utilisée dans les cinq jours.

L'inoculum bactérien

Paramètres importants

La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial. Elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de McFarland). En Algérie, la suspension est calibrée à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm contenant environ 10^8 bactéries par ml.

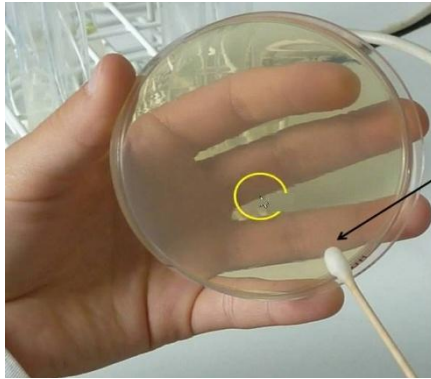
La suspension cellulaire doit être préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune et pure sur milieu d'isolement approprié.



La technique de l'ensemencement

→ L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

→ Réalisé par écouvillonnage ou par inondation



Ensemencement par écouvillonnage d'une manière serrée, à 3 reprises.

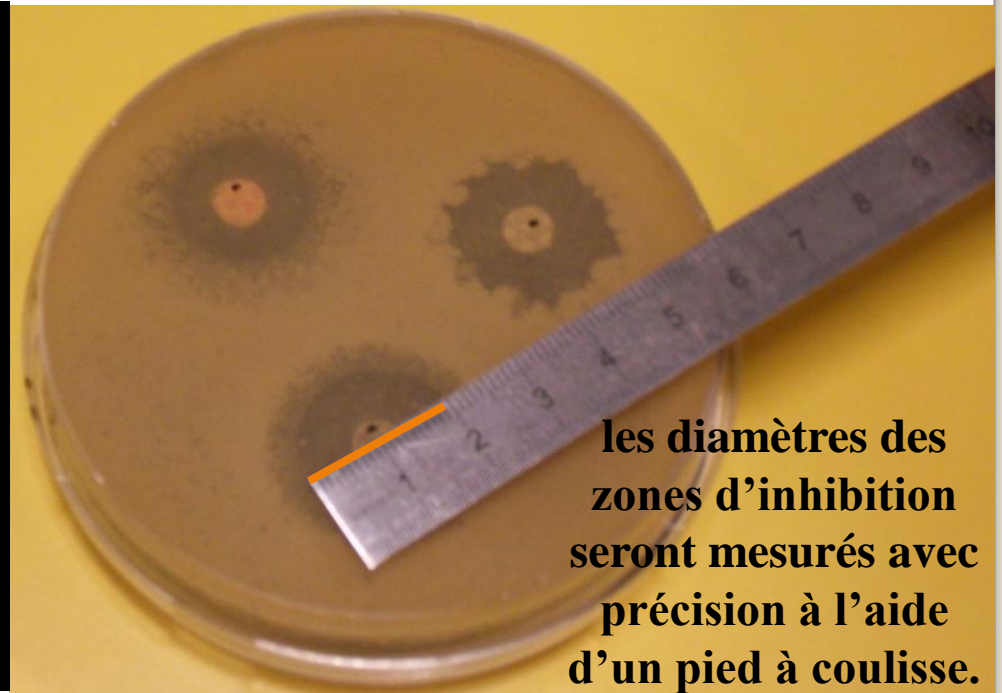
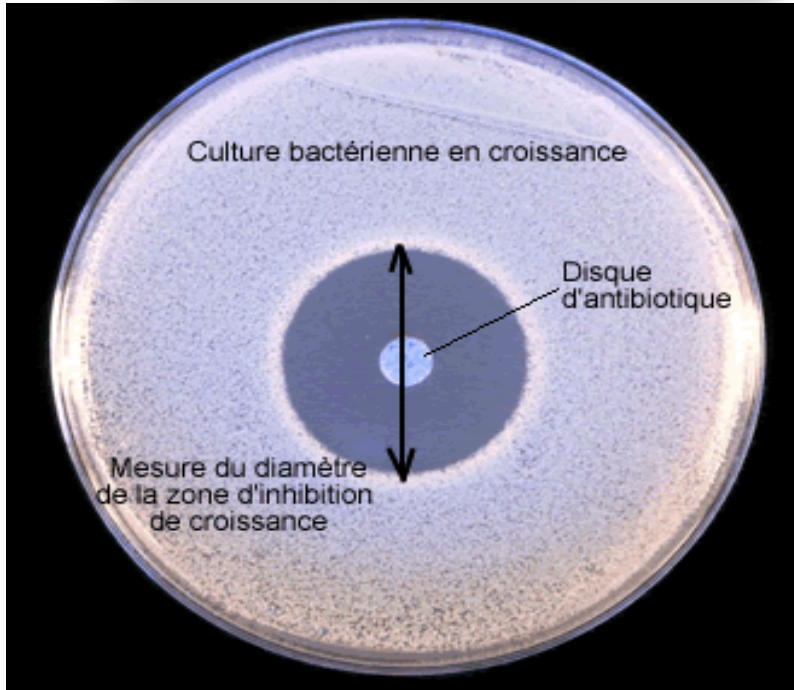
Dépôt des disques d'antibiotiques

→ Respecter une distance entre les disques



La lecture des résultats

Après incubation à la température et sous atmosphère recommandées

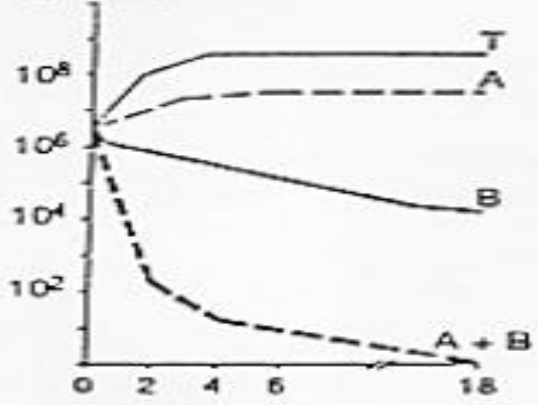


Les diamètres des zones d'inhibition mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par (EUCAST ou CLSI) afin de classer la bactérie dans l'une des catégories Résistant, Intermédiaire, Sensible.

L'effet (A + B) > effet A + effet B

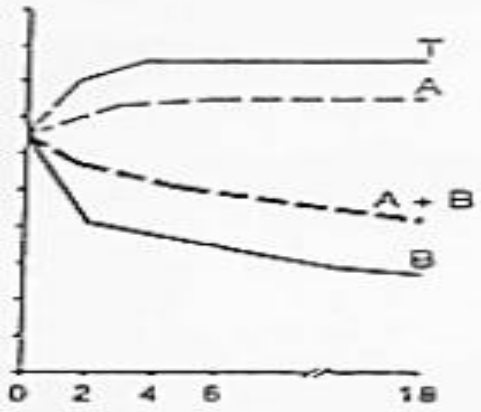
SYNERGIE

BACTERIES VIABLES (par ml)



ANTAGONISME

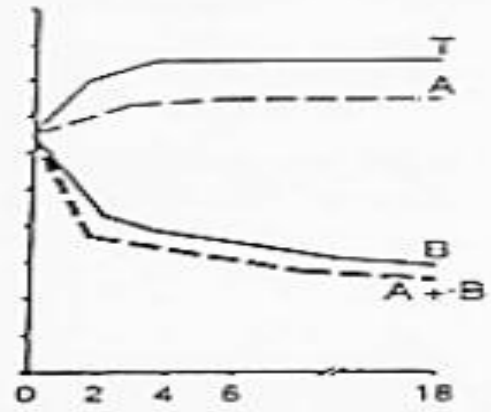
L'effet (A + B) < effet A ou effet B.



L'effet (A + B)=effet A ou effet B

INDIFFERENCE ADDITION

L'effet (A + B)=effet A + effet B



Temps (heures)

Synergique

l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Antagoniste

l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Indifférent

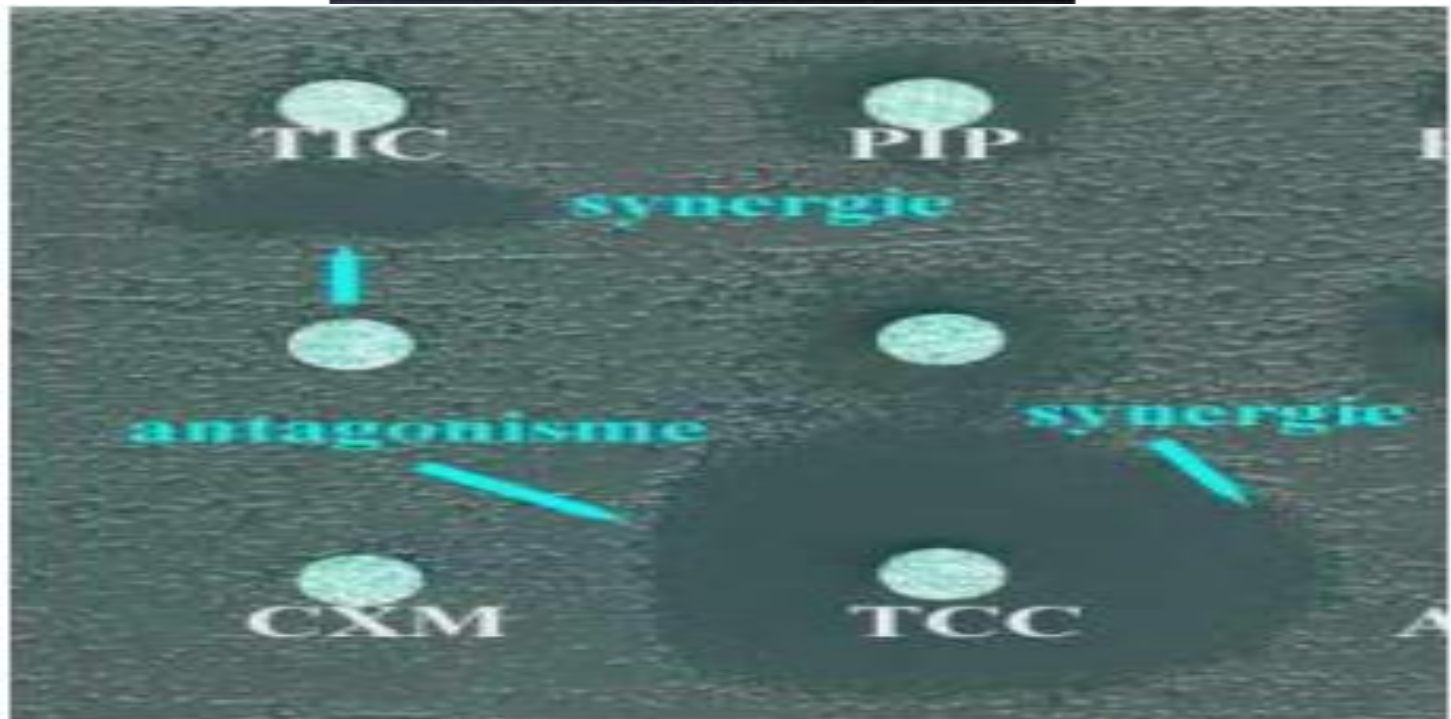
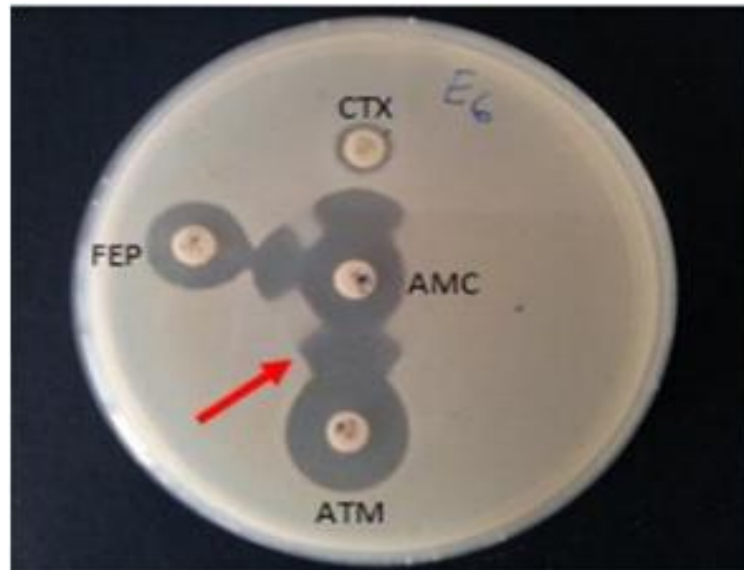
l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre.

Additif

l'effet de l'association est légèrement supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Principaux effets





Question du Chapitre 2 partie 5:

La CMI en milieu solide et liquide