

INTRODUCTION

Les entérobactéries constituent une famille très importante en pathologie humaine.

Cette importance est due aussi bien au nombre d'espèces bactériennes qui la compose, qu'à leur incidence au niveau de la santé des populations.

Malheureusement, dans nos pays sous-développés beaucoup de structures sanitaires, vu leur moyen, ne peuvent pas effectuer certaines analyses bactériologiques. Face à cette urgence, la mise au point de méthodes bactériologiques simples, fiables et peu onéreuses devient une nécessité.

C'est dans cette perspective, qu'au Laboratoire de Bactériologie - Virologie du Centre Hospitalier Universitaire A. Le Dantec, a été mise au point une microméthode pour l'identification et l'étude de sensibilité des bactéries.

Le but de ce travail est de faire une étude de biotypage (identification d'une espèce grâce à ces caractères métaboliques) et de la sensibilité des entérobactéries. Cette technique sera un moyen pour identifier non seulement les entérobactéries mais aussi de donner leurs profils de sensibilité aux antibiotiques.

L'étude de la sensibilité pourra également servir d'antibiotypie ou d'antibiogramme.

L'antibiotypie est l'identification d'une espèce bactérienne selon son profil de sensibilité aux antibiotiques.

A - GENERALITES

I/ LES ENTÉROBACTÉRIES

1- Habitat (1)

Le nom d'entérobactérie a été donnée parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux. Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif, des entérobactéries pouvant en effet proliférer en abondance dans l'environnement (sol et eau) et participer aux grands cycles des matières organiques.

2 - Pouvoir pathogène naturel (1)

Sur le plan de la pathologie humaine, il convient de distinguer :

- Les bactéries pathogènes spécifiques (BPS) que l'on ne trouve pas à l'état commensal (en dehors des porteurs sains) et dont la présence en milieu extérieur n'est qu'un phénomène de transit.
Les maladies qu'elles engendrent sont dues à un défaut d'hygiène et la contamination se produit soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur (alimentaire ou animal). Citons les *salmonella*, les *shigella* et les *yersina*.
- Les bactéries pathogènes opportunistes (BPO), ils peuvent provenir de la flore digestive commensale normalement résidente. Les infections ont donc un point de départ endogène. Toutefois elles se retrouvent, par excrétion dans la nature à l'état transitoire et si elles n'engendrent généralement pas d'infection, elles sont cependant le signe d'une contamination fécale voire de défaut d'hygiène.

3 - Morphologie (1)

Ce sont des bacilles à Gram négatif asporulés. Certains genres sont composés de bactéries toujours immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*), d'autres sont mobiles par ciliation péritriche. La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsiella*.

4 - Culture (1)

Les entérobactéries aérobie - anaérobies facultatives se développent facilement sur milieux nutritifs simples.

Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type "smooth" ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse type ("rough" ou R).

Les colonies des bactéries capsulées telles que les *Klebsiella* sont mucoïdes, plus grande que les colonies S avec une tendance à la confluence.

5 - Structure antigénique (1)

Chez les entérobactéries on peut distinguer :

- Des antigènes de paroi ou antigènes O toujours présents,
- Des antigènes flagellaires ou antigènes H
- Des antigènes de surface (capsule ou enveloppe) appelés K

6- Classification

Les caractères morphologiques et biochimiques permet de définir l'appartenance à la famille des *entérobacteriaceae*.

Les principaux genres sont :

- ***Escherichia***

Escherichia coli est l'espèce la plus fréquemment isolée du genre

- ***Shigella***

On distingue 4 sous-groupes :

A : *Shigella dysenteriae*

B : *Shigella flexneri*

C : *Shigella boydii*

- **Salmonella**

L'étude des antigènes O, H et Vi aboutit à l'établissement d'un catalogue de formules antigéniques (schéma de Kanffmann-White)

S. typhi, S. parophi, S. enteritidis...

- **Klebsiella**

K. pneumoniae, K. oxytoca

- **Enterobacter**

E. aerogenes, E. cloacae

- **Serratia**

S. marcescens

- **Proteus**

P. mirabilis, P. vulgaris, P. rettgeri

- **Providencia**

- **Yersinia**

- **Edwarsiella**

- **Levinea**

7 - Caractères biochimiques et métaboliques des entérobactéries (2)

7.1 Production de SH₂ (hydrogène sulfuré)

La production de SH₂ par les micro-organismes est mise en évidence par incorporation de fer ou de plomb dans le milieu destiné à cette étude.

Il se forme une précipité noir de sulfure de fer ou de plomb.

Le soufre est réduit et passe de l'état S²⁺ à l'état S²⁻

Selon S²⁺ + 4 électrons → S²⁻. Ce soufre réduit va se combiner avec le fer ferreux Fe²⁺ selon la réaction :

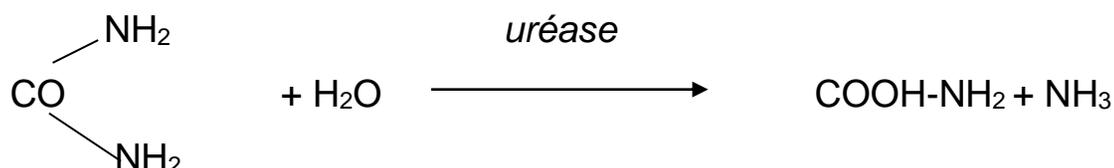


↓
noir

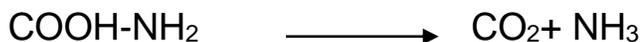


7.2 Recherche de l'uréase

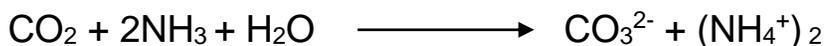
Toutes les bactéries hydrolysent l'urée :



Seule une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



$\text{CO}_2 + \text{NH}_3$ se combinent donnant du carbonate d'ammonium :

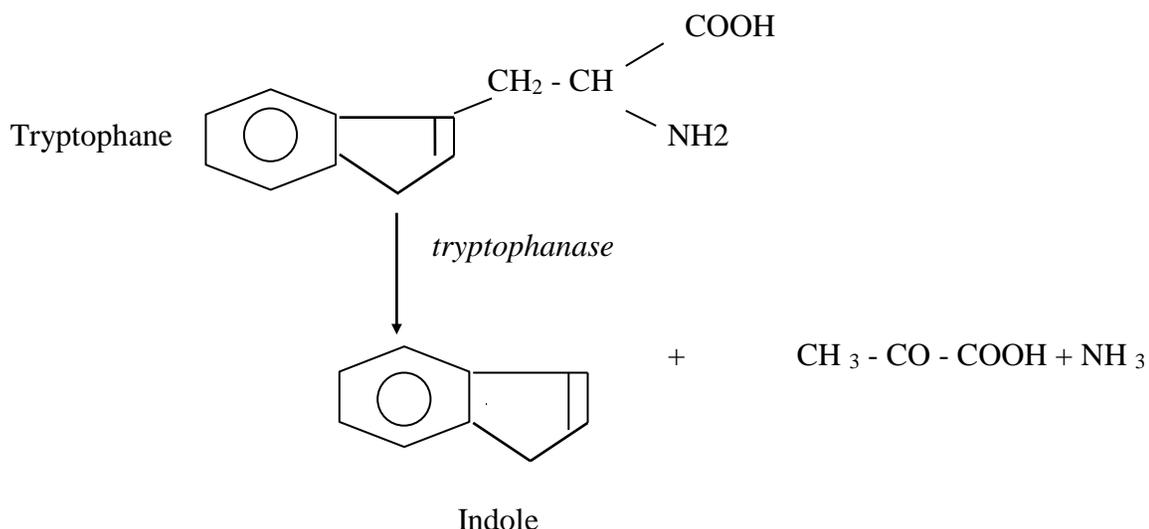


Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu que traduit le virage de l'indicateur coloré de l'orange au rose framboise ou dès fois au rouge violacé.

7.3 Production d'indole

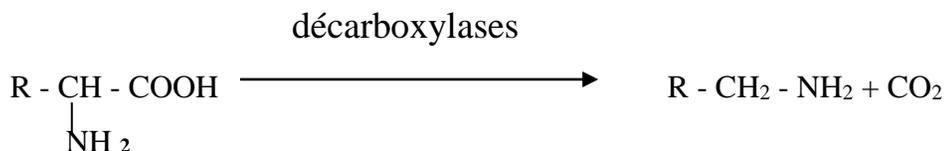
Certaines bactéries dégradent le tryptophane, grâce à une tryptophanase. Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac.

L'indole est apolaire et réagit fortement avec le paradiméthylamino-benzaldéhyde en milieu acide et donne un anneau rouge qui remonte en surface.



7.4 Recherche des décarboxylases

Les décarboxylases (LDC , ODC, ADH) scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO₂ suivant la réaction :

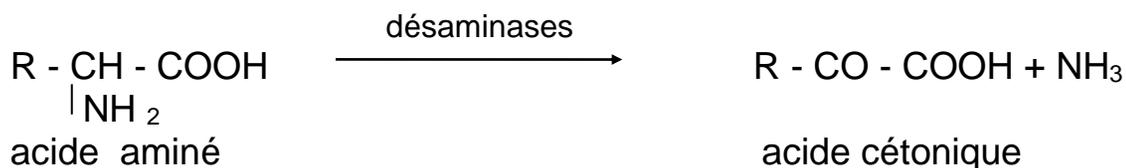


Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH optimum : 3,5 à 5,5) et des conditions anaérobie.

Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré (le rouge de phénol) et bien entendu l'acide aminé. Chez les bactéries à métabolisme fermentatif, la fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme ; l'alcalinité due à l'amine entraîne ensuite le virage de l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement. Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide donc jaune.

7.5 Recherche des désaminases oxydatives

Les désaminases, enzymes induites, agissent sur les acides aminés en entraînant la formation des acides cétoniques correspondants selon la réaction :



Les acides cétoniques formés ont la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe^{+++} , réaction utilisée pour la lecture.

7.6 Utilisation du citrate de Simmons (CS)

L'utilisation du citrate, comme seule source de carbone, par les bactéries se traduit par une alcalinisation du milieu (virage au bleu).

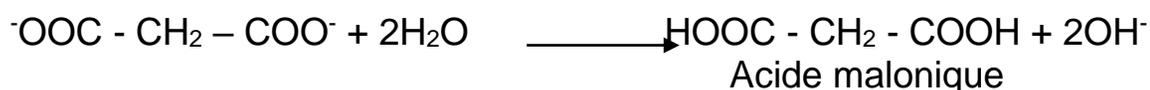
Nous avons la réaction suivante :



7.7 Utilisation du malonate

Le malonate inhibe le cycle de krebs (inhibition de la succinate deshydrogénase). Seules les bactéries qui peuvent utiliser le cycle glyoxylique sont capables de pousser sur un milieu au malonate.

L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions OH^- alcalinisants suivant la réaction :



7.8 Milieu au citrate de Christensen (CC)

A la différence de Simmons, ce milieu contient une faible quantité de glucose et d'extrait de levure (qui permet le départ de la culture) et une source d'azote organique.

Dans ces conditions, certaines bactéries citrate-négatives sur milieu de Simmons sont capables d'utiliser le citrate en milieu de Christensen. La formation d'ions hydroxydes alcalinise le milieu (virage du jaune au rose).

7.9 Recherche de l'acétoïne ou réaction de Voges-Proskauer (VP)

On étudie la formation de l'acétylméthyl carbinol (AMC, ou acétoïne) soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit à partir du glucose.

En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétal).

7.10 Test à l'ONPG (orthonitrophenyl β -D-Galactopyranoside)

Le terme ONPG hydrolase est plus à propos que celui de bêta-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose. En effet, il existe des germes qui reconnaissent que l'ONPG du côté nitro-2-phénol et non celui du bêta-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas les lactoses.

Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl- bêta-D-galactopyranoside, ou le 2-naphtol- bêta-D-galactopyranoside.

Ceux ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le bêta-naphtol.

II/ LES ANTIBIOTIQUES

1 - Définition

Les antibiotiques sont des substances chimiques ou hémisynthétiques élaborées par des micro-organismes et qui ont le pouvoir de s'opposer à la multiplication des bactéries en les détruisant ou en inhibant leur multiplication.

2 - Classification

2.1 Les β -lactamines

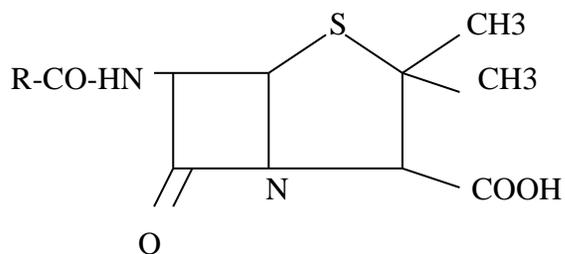
Leur structure chimique comprend un cycle β -lactame responsable de l'activité antibactérienne.

On distingue 3 familles principales :

- Les pénicillines
- Les céphalosporines
- Les monobactams

2.1.1 Les pénicillines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle thiazolidine



Acide 6 aminopénicillanique

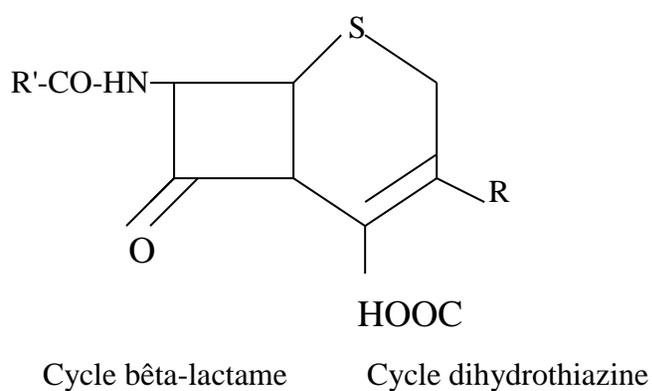
Fig1: Structure des pénames

Dans cette sous famille on distingue entre autres :

- Les pénicillines naturelles (les groupes G et V)
- Les pénicillines du groupe M. (oxacilline, cloxacilline)
- Les aminopénicillines (Ampicilline, amoxicilline)
- Les carboxypénicillines (carbénicilline, Ticarcilline)
- Les acyl ureidopénicillines (piperacilline, Mezlocilline)
- Les amidinopénicillines pivmécillinam)

2.1.2 Les céphalosporines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle dihydrothiazidique.



Acide 7 aminocéphalosporanique

Fig 2 Structure de Céphèmes

Elles sont constituées de 4 générations :

- Céphalosporines de 1^{ère} génération
céfatolatine, céfacétrile, cefadroxil, céfradine.
- Céphalosporines de 2^{ème} génération
Céfuroxime, céfamendole, céfoxitine
- Céphalosporines de 3^{ème} génération
Céftriaxone, latomoxef, céfotaxomine
- Céphalosporines de 4^{ème} génération
Céfépine, cefpirome, céfzoprane

2.1.3 Les monobactams

Elles ont pour formule générale la figure 3

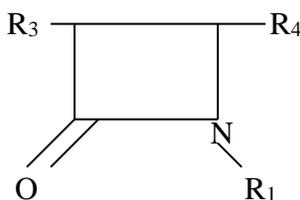


fig 3 formule générale monobactams

l'Aztreonam appartient à cette sous famille

2-2 Les Aminosides

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre possédant une structure aminoglycosidique.

Les aminosides sont divisés en 3 grands groupes :

- Aminosides de 1^{ère} génération
- Streptomycine, Kanomycine, Néomycine...
- Aminosides de 2^{ème} génération
Amikacine, Gentamicine, Tobramycine...
- Aminosides de 3^{ème} génération
Netilmicine

2 - 3 Macrolides, Lincosamides, Streptogramines (MLS)

MLS ont un spectre limité comprenant les bactéries à Gram positif, les cocci à Gram négatif, mycoplasme et les bacilles négatifs anaérobies.

Macrolides (Erythromycine, Oléandromycine, Josamycine, Lincosamides (lincomycine, clindamycine).

Streptogramines ou Synergistine (Pristinamycine, Virginiamycine).

2 - 4 Les cyclines

Les principaux produits sont: les tétracyclines, doxycycline, minocyclines.

Les tétracyclines ont une activité antibiotique large, seulement bactériostatique.

2 - 5 Les phénicolés

Ce sont des bactériostatiques à large spectre dérivés de l'acide dichloro-acétique.

Nous distinguerons le chloramphénicol, le thiamphénicol.

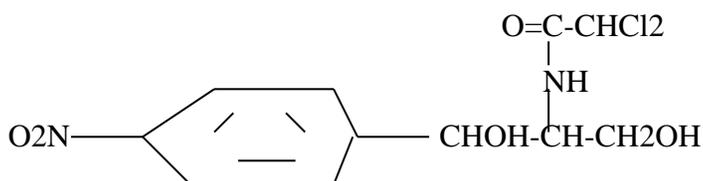


Fig.4 Structure du chloramphénicol

2 - 6 Les quinolones

On peut les diviser en 2 groupes :

- Les anciens qui ne sont pratiquement actifs que sur les bacilles à Gram négatif, principalement les entérobactéries et ne sont indiqués que dans le traitement des infections urinaires.
(Acide nalidixique, acide piromidique, fluméquine).
- Les produits plus récents ont une plus grande activité par leur spectre large et leur pharmacocinétique (Ciprofloxacine péfloxacine , norfloxacine)

2 - 7 Les polypeptides

Ce sont des antibiotiques bactéricides (colistine, polymicyne B)

2 - 8 Les sulfamides

Ce sont des antibiotiques bactériostétiques (Sulfaméthizol, sulfaguandine)

3 - Mécanisme d'action des antibiotiques

3 - 1 Mécanisme d'action des bêta-lactamines

Elles bloquent la synthèse du peptidoglycane, qui est un constituant de la paroi des bactéries.
Elles inhibent les transpeptidases et carboxypeptidases qui sont essentielles à la synthèse de la paroi.

3 - 2 Mécanisme d'action des phénicolés

Les phénicolés inhibent la synthèse protéique des bactéries en se fixant au niveau de la sous-unité 50 S des ribosomes et en empêchant la transpeptidation de l'ARN de transfert.

3 - 3 Mécanisme d'action des aminosides

Les aminosides inhibent la synthèse protéique des bactéries en fixant sur la sous-unité 30 S du ribosome.

3 - 4 Mécanisme d'action des fluoroquinolones

Les fluoroquinolones inhibent la synthèse des acides nucléiques par le blocage de l'ADN gyrase.

3 - 5 Mécanisme d'action des cyclines

Elles inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30 S.

3 - 6 Mécanisme d'action des polypeptides

Les polypeptides agissent au niveau de la membrane cytoplasmique de certaines bacilles à Gram négatif.

3 - 7 Mécanisme d'action macrolides et apparentés

Ils inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50 S du ribosome .

3 - 8 Mécanisme d'action des sulfamides

Le sulfaméthoxazole inhibe la dihydrofolate synthétase (DHS).

4 - Sensibilité des bactéries aux antibiotiques

4 - 1 Notion de sensibilité

La résistance microbienne est la possibilité pour une bactérie de se multiplier in vivo en présence de concentrations d'antibiotiques supérieures à celles qui permettent normalement d'inhiber la croissance des souches bactériennes de la même espèce, ceci par modification de son capital génétique. Cette résistance peut ne pas se manifester sur le plan clinique (5).

Il existe d'autres définitions données par certains auteurs :

- Une souche est dite "résistante" lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique, notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (6).
- Une souche est dite "résistante" lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration pouvant être atteinte in vivo (6).
- Une bactérie est dite "sensible" à un antibiotique si elle fait partie de son spectre d'activité c'est à dire l'éventail d'espèces bactériennes susceptibles d'être inhibées par des concentrations de cet antibiotique (surtout in vivo après utilisation d'une posologie standard) (7).

4-2 Type de résistance

4.2.1 Résistance naturelle

Un micro-organisme peut présenter une résistance naturelle vis à vis de certains antibiotiques. Il s'agit d'un caractère chromosomique qui correspond à la propriété de l'espèce et qui peut être retenu comme critère d'identification.

Par exemple les Klebsiella sont résistante à l'ampicilline, à l'amoxicilline. cette propriété génétique sera de génération en génération (sauf mutation).(8)

4.2.2 Résistance acquise

Correspond à l'acquisition d'une résistance à un antibiogramme par une souche normalement sensible chez quelques souches d'une espèce normalement sensible, à l'inverse de la sensibilité de la résistance naturelle qui est un caractéristique de l'espèce. (9)
L'expression de la résistance est contrôlée génétiquement par apport plasmidique ou à une mutation chromosomique.

4.2.3 Résistance clinique

C'est l'échec thérapeutique, si les facteurs d'environnement (concentration en cations, protéines inhibitrices...), la pharmacocinétique, le choix plus au moins judicieux de l'antibiotique en sus des mécanismes développés par le germe, sont en cause. (10)

5- Support génétique (11)

Au plan génétique, la résistance acquise peut survenir par mutation ponctuelle, par remaniement d'un génome ou par acquisition de matériel génétique étranger. Il existe deux supports essentiels.

5 - 1 Résistance chromosomique

5.1.1 Résistance chromosomique par mutation

Il peut s'agir d'une mutation ponctuelle dans les gènes de résistance entraînant par exemple une hypersécrétion d'enzyme inactivant les antibiotiques ou dans un gène de structure qui modifie le spectre d'une enzyme.

Une mutation se caractérise par :

- La rareté
- La spontanéité
- La discontinuité
- La spécificité et indépendance
- La stabilité

5.1.2 Résistance extra chromosomique

L'information génétique est apportée par des plasmides transférables à d'autres bactéries par conjugaison, sa transduction et par transformation.

L'ensemble de ces gènes peut être sur des fragments d'ADN appelés transposons qui peuvent s'intégrer soit dans les plasmides, soit dans le chromosome en allant de l'un à l'autre.

5 - 2 Mécanismes de la résistance (13, 14)

La résistance génétique ou chimique peut être due à :

- Une modification de la molécule bactérienne qui constitue la cible de l'antibiotique : l'antibiotique ne se fixe plus sur la structure qui représente son site d'action. (1)
Les PLP (protéines de liaison à la pénicilline) individualise dans la membrane cytoplasmique des différentes espèces bactériennes, interviennent dans les stades ultimes de la biosynthèse du peptidoglycane.
Une modification de ces PLP et / ou une diminution de l'affinité de ces PLP par les antibiotiques permettent à certaines bactéries de rester insensibles à l'action d'un antibiotique. Car pour être actif l'antibiotique doit se fixer sur une cible.
- Production d'enzyme capable d'inactiver la molécule de l'antibiotique (acétylase, adénylase, phosphorylase pour les aminosides ou de l'hydrolyser (pénicillinase, céphalosporinase pour les β -lactamines)
- Imperméabilisation de la paroi

La structure de la paroi permet de comprendre le mécanisme d'action des antibiotiques de même que le mécanisme de résistance.

La résistance par imperméabilité de la paroi n'est observée que chez les bactéries à Gram négatif, car leur paroi (du fait de sa structure) empêche naturellement la diffusion des molécules hydrophobes (mécilline, cloxacilline, acide fusidique, érythromycine par exemple).

6 - Méthodes d'étude de la sensibilité (13)

6 - 1 Méthode par diffusion : méthode par disque

Les disques d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance.

L'antibiotique imprégnant le disque va diffuser dans la gélose, la concentration diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18heures à 37°C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication bactérienne à une concentration supérieure ou égale à la CMI.

La CMI est la concentration minimale d'antibiotique inhibant en 18 heures à 24 heures la multiplication des bactéries (bactériostase). Pour chaque antibiotique, on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur approchée de la CMI. En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre le diamètre d'inhibition et la CMI. Celle-ci étant établie par des études comparatives portant sur un grand nombre d'espèces différentes.

En fonction de la CMI, on classera la souche en 3 catégories :

- Résistante lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte in vivo sans atteindre les doses toxiques,
- Sensible, lorsque la CMI est inférieure à la concentration obtenue après administration d'une dose thérapeutique,

- Intermédiaire si la CMI se situe entre ces deux extrêmes. L'effet inhibiteur est obtenu soit par une forte concentration de l'antibiotique au niveau du siège de l'infection, soit par une administration par voie générale avec des doses élevées.

6 - 2 E-Test® (13) (*epsilon*meter – test)

Le E-Test® est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone continue de 0,016 à 256 mg/l ou 0,002 à 32 mg/l en fonction des molécules.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes de 5mm de large et de 80mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse dont le point d'intersection avec la bandelette définit la CMI.

Une échelle de lecture imprimée sur la face supérieure de la bandelette permet une lecture rapide.

B/ MATERIEL ET METHODES

I/ IDENTIFICATION DES ENTEROBACTERIES

1- Préparation des milieux

1.1 Matériel

- Agitateur magnétique
- Balance de précision
- pH mètre
- Seringues
- Filtre de 0,2 μ m de diamètre
- Micropipettes
- Embouts stériles
- Flacons de verre avec bouchon à vis 50- 100- 150ml
- Tubes stériles 2,5- 5ml
- Erlen Meyer
- Papier d'emballage

1.2 Réactifs

- Glucides : glucose, mannitol, lactose, sorbitol, saccharose, dulcitol, inositol, adonitol, rhamnose.
- Bleu de bromothymol, peptone bactériologique, peptone tryptique, rouge phénol
- Chlorure de sodium
- Soude
- Bouillon nutritif
- L tryptophane, L lysine, L.arginine, L ornithine, L phényl alamine
- Phosphate monopotassique, dipotassique
- Citrate trisodique, malonate de Na
- Urée
- Alcool 95°
- Extrait de levure
- Sulfate d'ammonium
- Sulfate de Mg
- Phosphate d'ammonium

- Thiosulfate de Na
- Sous acétate de Pb
- Nitrate de potassium
- Poudre d'ONPG, tampon phosphate

1-3 Préparation

1.3.1 Sucres

Tableau I : Préparation des sucres

Glucides		Stérilisation	Température et durée	
Lactose	10 %	Tyndalisation ou filtration	110°C	30min × 3j
Glucose	10 %	Autoclavage	110°C	10min
Mannitol	10 %	Autoclavage	110°C	10min
Saccharose	10 %	Tyndalisation ou filtration	100°C	30min × 3j
Sorbitol	10 %	Autoclavage	110°C	10min
Rhamnose	10 %	Autoclavage	110°C	10min
Adonitol	5 %	Autoclavage	110°C	10min
Dulcitol	2 %	Autoclavage	110°C	10min
Inositol	5 %	Autoclavage	110°C	10min

1.3.2 MEVAG

- Préparation de l'eau peptonée

Formule :	Peptone tryptique	1,5g
	NaCl	0,5g
	Eau distillée	100 ml

Le milieu a été ajusté à pH 7,4 puis autoclavé à 120°C pendant 20 min.

- Préparation bleu de bromothymol

Formule :	Bleu de bromothymol	0,2g
	Soude 0,1N	5 ml
	Eau distillée	95 ml

On ajoute de l'eau distillée pour avoir 100 ml. Stérilisation par autoclave à 110°C pendant 10 mn.

Pour préparer le MEGAV complet, on ajoute 1 à 4 ml de bleu de bromothymol à 100 ml d'eau peptonée.

1.3.3 Milieux de recherche des décarboxylases

• Formule :	extrait de levure	0,6g
	Glucose	0,2g
	NaCl	1g
	Rouge phénol	0,03g
	Acide aminé (L arginine, L lysine, L ornithine)	1g
	Eau distillée	100 ml

Le milieu est ajuster à pH 6,3 - 6,4 et autoclavé à 120°C pendant 15 mn
NB : ajouter l'acide aminé à 4% quand c'est sous la forme DL.

1.3.4 Milieu pour recherche de l'urease

• Formule :	L tryptophane	0,6g
	Phosphate monopotassique	0,2g
	Phosphate dipotassique	0,2g
	NaCl	1g
	Urée	4g
	Alcool 95°	2 ml
	Rouge phénol (ou 0,5 ml de solution à 1%)	0,05g

La stérilisation se fait par filtration.

1.3.5 Milieu de CLARK et LUBS (VOGES PROSKAUER)

• Formule :	Peptone trypsique ou polypeptone	2,1g
	Pyruvate de sodium	1,84g
	Phosphate dipotassique	0,6g
	Fumarate disodique	0,6g
	Glucose	1,5g

Le milieu est ajusté à pH 7 et stérilisé par filtration

1.3.6 Milieu pour la mise en évidence de la gélatinase

- Préparation de la gélatine

Gélatine	15g
Eau distillée	100 ml

La solution est chauffée au bain-marie bouillant jusqu'à la dissolution complète, refroidie à 45°C ensuite on ajoute en mélangeant, activement 4g de charbon de bois en poudre fine.

Le moulage se fait dans les moules de 0,5cm sur une surface horizontale puis porté une demi heure à la glacière. Démouler et faire séjourner les plaques pendant 24 heures dans la solution de formol suivante :

Formol de commerce à 40%	1 volume
Eau distillée	69 volumes

Découper ensuite en petits fragments de 0,5cm de côté qui sont rincés l'eau courante pendant 24-48 heures pour éliminer le formol. Les cubes lavés sont introduits dans des flacons contenant de l'eau distillée pour être tyndalisés 1 heure à 60°C , 3 jours de suite.

1.3.7 Milieu au citrate de SIMMONS

- Formule :

Sulfate de Mg	0,04 g
Phosphate mono ammonique	0,02 g
Phosphate dipotassique	0,2 g
Citrate trisodique	0,4 g
NaCl	1 g
Bleu de bromothymol	0,016 g
Eau distillée	100 ml

La dissolution se fait à chaud. PH est ajusté à 7 et stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

1.3.8 Milieu au citrate de CHRISTENSEN

- Formule : Extrait de levure 0,1 g
- Citrate de Na 0,16 g
- Glucose 0,04 g
- Chlorhydrate de L cystéine 0,02 g
- Phosphate monopotassique 0,2 g
- NaCl 1 g
- Rouge phénol (0,4ml de solution à 1%) 0,004 g
- Eau distillée 100 ml

Le pH est ajusté à 6,5 et stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 mn.

1.3.9 Milieu pour la recherche de H₂S et de l'indole (SI)

- Formule : Peptone de Caséine (ou tryptone) 6 g
- Peptone de viande 1,78 g
- Tryptophane 0,9 g
- Citrate ferrique ammoniocal 0,06 g
- Thiosulfate de Na 0,06 g

On ajuste l'autoclave à 120°C pendant 15 mn

1.3.10 Milieu au malonate et a la phénylalanine (MAL-PDA)

- Formule : Extrait de levure 0,2 g
- Sulfate d'ammonium 0,4 g
- Phosphate dipotassique 0,16 g
- Phosphate monopotassique 0,08 g
- NaCl 0,4 g
- Malonate de sodium 0,6 g
- L- Phénylalanine 0,2 g
- Bleu de bromothymol 0,005 g

Le pH est ajusté à 6,9 et autoclavage à 115°C pendant 10 mn.

1.3.11 Milieu à L'ONPG (β galactosidase)

- Préparation solution tampon NaH_2PO_4 , H_2O à pH = 7
Dissoudre 13,8 g de NaH_2PO_4 , H_2O dans 45 ml d'eau distillée.
Ajouter de la lessive de soude 36°B pour ajuster à pH 7 (6ml environ).
Compléter à 50 ml avec de l'eau distillée et conserver à 4°C.
- Solution d'ONPG M/75
Dissoudre 160mg d'ONPG dans 15 ml d'eau distillée portée à 50°C .
Laisser refroidir. Ajouter 5ml de la solution tampon .
Le mélange doit être incolore.
Conserver à 4°C.
Avant l'emploi , incuber à 37°C pour remettre le phosphate en solution.

2 - Déshydratation des milieux

Les milieux liquides ont été repartis dans les puits des microplaques pour être déshydratés au four à micro-onde en présence de dessicateur. La température est de 37°C pendant 48 heures, 40°C pendant 24 heures ou 42°C pendant 18 heures.

Matériel d'isolement et d'identification :

Etude stérile + thermomètre
Microplaques
Embouts stériles
Dessicateur
Plastique pour emballage
Film adhésif
Réactifs de révélation :

- Soude à 40% (ou KOH à 10%)	VP1
- Créatinine à 1%	VP2
Créatinine	1 g
Eau distillée	100 ml
- Alpha naphthol	VP3
Naphthol 1	6 g
Ethanol	100 ml

- Perchlorure de Fer au 1/3		
Perchlorure de Fer officinal		10 ml
Eau distillée		20 ml
- Réactifs de Kovacs		
p-diméthylamino-benzaldéhyde		5 g
Alcool amylique		75 ml
Hcl pur		25 ml

NB: L'aldéhyde est dissout dans de l'alcool au bain-marie à 60°C.
Après refroidissement on ajoute l'acide goutte à goutte en maintenant le récipient dans la glace.
La conservation se fait à 4°C en flacon ombré.

3 - Méthodologie

3 - 1 Principe

Les cupules des plaques renfermant les substrats déshydratés, permettant la mise en évidence d'activité enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés.

L'ensemencement avec un inoculum reconstitue le milieu. Après incubation, le lecteur des réactions est effectuée directement (virage de l'indicateur coloré) ou après addition de réactif de révélation.

3 - 2 Préparation de l'inoculum

La suspension bactérienne doit avoir une turbidité égale à 0,5 sur l'échelle ou Mc Farland dans 1,5 ml d'eau distillée avec des colories d'une culture ou 18 -24 heures sur milieu solide.

- 100µl d'inoculum bactérien par cupule de LDC à ONPG puis le reste de l'inoculum est mélangé et homogénéisé avec 1 ml de MEVAG entérobactérie.

La dernière préparation ainsi obtenue, les cupules allant de LAC à INO ont été inoculées.

- avec 2 gouttes de paraffine, les cupules LDC, ODC, ADN, UREE et tous les sucres sont fermés.

L'incubation est faite à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.

Lecture faite 18 -24 heures après.

Tableau II : Disposition de la microplaque

LDC	ODC	ADH	URE	VP
GEL	CS	CC	SH2 IND	MAL PDA
ONPG	LAC	GLU	MAN	SAC
SOR	RHA	ADO	DUL	INO

TABLEAU III : Tableau de lecture des entérobactéries

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ ENZYMES	REACTIFS DE REVELATION	RESULTATS POSITIFS	RESULTATS NEGATIFS
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase		Rouge	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rouge	Jaune
ADH	Arginine	Arginine décarboxylase		Rouge	Jaune
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orange
VP	Glucose + Pyruvate	Production d'acétoïne	VP1+VP2 + VP3	Rose-rouge	Incolore
GEL	Gélatine	Gélatinase		Diffusion du charbon	Inchangé
CS	Citrate de sodium	Utilisation du citrate		Bleu	Vert
CC	Citrate de sodium	Utilisation du citrate		Rose	Jaune claire
H ₂ S	Thiosulfate sodium de	Production d'H ₂ S		Noir	Incolore
IND	Tryptophane	Tryptophanase	1 goutte de Kovacs	Anneau rouge	Anneau incolore
MAL	Malonate de sodium	Utilisation du malanote		Bleu	Jaune vert
PDA	Phénylalanine	Phénylalanine désaminase	1 goutte de perchlorure fer	Vert	Jaune
ONPG	ONPG	βgalactosidase		Jaune	Incolore
LAC	Lactose	Fermentation		Jaune	Bleu
GLU	Glucose				
MAN	Mannitol				
SAC	Saccharose				
SOR	Sorbitol				
RHA	Rhamnose				
ADDO	Adonitol				
DUL	Dulcitol				
INO	Inositol				

3 - 3 Contrôle de qualité des milieux déshydratés

3.3.1 Contrôle de stérilité

Chaque fois qu'un lot de plaques déshydratées est préparé, une plaque est inoculée avec de l'eau distillée stérile pour tous les caractères n'étudiant pas l'attaque des glucides et avec le milieu destiné à l'étude du métabolisme glucidique, pour les caractères étudiant les fermentations sucrées.

Après 24 à 48 heures d'incubation et après révélation de certains tests, le lot est considéré stérile en l'absence de virage de l'indicateur et en l'absence de réaction positive pour les tests révélés.

3.3.2 Contrôle d'efficacité

Il est réalisé avec les mêmes souches bactériennes que pour le cas des milieux liquides.

A la différence des milieux liquides :

- L'inoculum bactérien est ajusté à 0,5 McFarland pour les Entérobactéries,
- Le milieu pour l'étude du métabolisme glucidique est préparé d'une façon normale (une fois concentrée),
- Pour les milieux n'étudiant pas le métabolisme glucidique, 100µl d'inoculum bactérien sont distribués dans les puits correspondants,
- Pour l'étude du métabolisme glucidique, 500µl d'inoculum bactérien sont incorporés dans un millilitre de milieu et 100µl du mélange sont distribués dans les puits correspondants.

3.3.1 Contrôle d'efficacité proprement dit

Les tableaux ci-après donnent la répartition des contrôles positifs et négatifs :

Tableau IV: Répartition des contrôles positifs et négatifs

TESTS	TEMOINS POSITIFS	TEMOINS NEGATIFS
LDC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella</i>
ODC	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ADH	<i>Salmonella sp</i>	<i>Escherichia coli</i>
URE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
VP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
GEL	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
CS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella</i>
CC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
SH2	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
IND	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>
MAL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
PDA	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Shigella flexneri</i>
ONPG	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Lactose	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Glucose	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Mannitol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Saccharose	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Sorbitol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Rhamnose	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Adonitol	<i>Enterobacter cloacea</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Dulcitol	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Inositol	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>

II/ ETUDE DE SENSIBILITE

1- Matériel et Réactifs

1 - 1 Matériel de laboratoire

- balance de précision
- agitateur magnétique
- pH-mètre
- flacons en verre avec bouchon à vis de 5, 100, 150 ml
- seringues
- filtres
- embouts stériles
- micro pipettes
- autoclave
- hotte à flux laminaire
- papier emballage

1 - 2 Réactifs

- Gélose MH
- Glucose
- Rouge phénol
- $MgCl_2$, $CaCl_2$
- bouillon MH

1 - 3 Antibiotiques

- * Acide nalidixique
- * Aztréonam
- * Amikacine
- * Chloramphénicol
- * Ciprofloxacine
- * Tétracycline
- * Ampicilline
- * Amoxicilline
- * Céfuroxime
- * Ceftriaxone

1- 4 Souches bactériennes

- *Escherichia coli*
- *Shigella sonnei*
- *Salmonella sp*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus vulgaris*
- *Enterobacter cloacea*
- *Shigella sp*
- *Shigella flexneri*
- *Pseudomonas aeruginosa*

2 - Méthodologie

2-1 Principe

L'utilisation du glucose contenu dans le bouillon se traduit par un virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol) qui passe du rouge au jaune.

L'étude de sensibilité aux antibiotiques va consister à ajouter au milieu deux concentrations critiques d'un antibiotique donné. Après une incubation de 18 h, la croissance bactérienne est décelée grâce au virage de l'indicateur (consommation de glucose).

2-2 Préparation du milieu d'étude de la sensibilité

la formule est la suivante :

bouillon MH	50 g
glucose	4 g
rouge de phénol	100 mg (1 ml d'une solution à 1%)
solution de MgCl ₂ à 25mg/l	2,5 ml
solution de CaCl ₂ (50mg/l)	5 ml
eau distillée qsp	1000 ml
ajuster à pH 7,4 ± 0,2	

Les solutions de MgCl₂ et Cacl₂ ont été ajustées après filtration au milieu stérilisé par autoclavage.

2 - 3 Préparation de solutions d'antibiotique

2.3.1 Solutions de stock (solution mère)

La solution mère a une concentration 200 fois plus concentrée que celle de la concentration critique supérieure (CCS) de l'antibiotique dans le solvant indiqué.

La masse à peser va dépendre de l'activité des antibiotiques. L'activité étant la quantité du principe actif en µg contenu dans 1mg de produit.

La formule suivante a été utilisée :

$$\text{Masse à peser (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{concentration (mg/ml)}}{\text{Activité (}\mu\text{g/mg)}}$$

Les solutions de stock ont été conservées entre 0 et 5°C ou elles restent stables pendant plusieurs mois (3 mois environ).

2.3.2 Concentration critique supérieure CCS

Elle est obtenue après 2 dilutions successives :

- Dilution au 1/100 de la solution de stock par le diluant approprié à l'antibiotique,
- Dilution au 1/2 avec l'inoculum contenu dans le milieu MH préparé,

2.3.3 Concentration Critique Inférieure CCI

Elle est obtenue par dilution de la CCS. La dilution est effectuée en faisant :

le rapport $\frac{\text{CCI}}{\text{CCS}}$ de l'antibiotique.

Tableau V : préparation des solutions

Antibiotiques	Solution stock mg / ml	CCS µg/ml	Dilution	CCI µg/ml
Ac. Nalidixique	3,2	16	1/2	8
Aztréonam	6,4	32	1/2	16
Amikacine	4	16	1/2	8
Chloramphénicol	4	16	1/2	8
Ciprofloxacine	0,4	2	1/2	1
Tétracycline	1,6	8	1/2	4
Ampicilline	3,2	16	1/4	4
Amoxicilline	6,4	32	1/4	8
Cefuroxime	6,4	32	1/4	8
Ceftriaxone	6,4	32	1/8	4

Tableau VI : des solvants et diluants utilisés

Antibiotiques	Solvants	Diluant
Ac. Nalidixique	NaOH 0,1N	Eau distillée stérile
Aztréonam	Eau distillée stérile	Eau distillée stérile
Amikacine	Eau distillée stérile	Eau distillée stérile
Chloramphénicol	Méthanol	Eau distillée stérile
Ciprofloxacine	Eau distillée stérile	Eau distillée stérile
Tétracycline	HCl 0,1N	Eau distillée stérile
Ampicilline	Tampon phosphate 0,1M pH 8	Eau distillée stérile
Amoxicilline	Tampon phosphate 0,1M pH 6	Eau distillée stérile
Céfuroxime	Tampon phosphate 0,1M pH 6	Eau distillée stérile
Ceftriaxone	Tampon phosphate 0,1M pH6	Eau distillée stérile

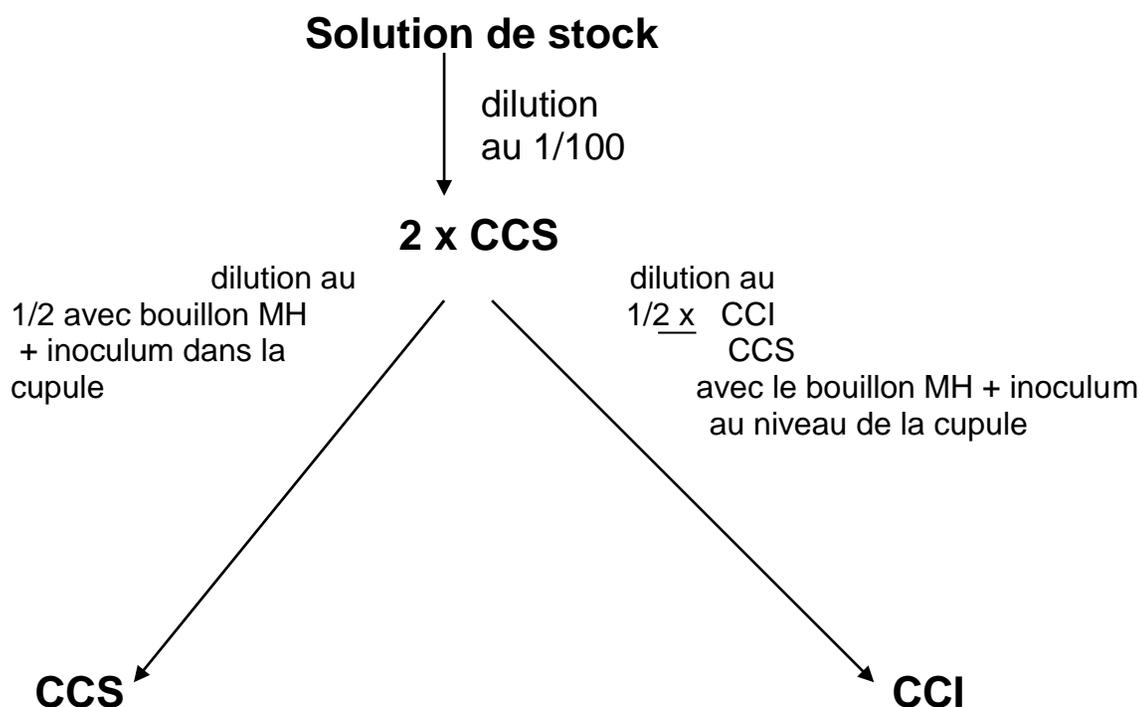
2 - 4 Préparation de l'inoculum

Après culture sur un milieu ordinaire (MH), une suspension a été effectuée avec quelques colonies pures de 24 heures.

La suspension a été faite de façon à obtenir une turbidité égale à 0,5 sur l'échelle Mac Farland, ce qui équivaut à environ 10^8 bactéries/ml.

L'inoculum a été obtenu après dilution de la suspension avec une quantité de milieu d'étude de la sensibilité (Bouillon MH + rouge phénol), cette dilution nous a donné une concentration finale de $10^5 - 10^6$ bactéries/ml.

Récapitulatif des déductions



2 - 5 Lecture

Elle se fait après incubation de 18h à 37°C.

Plusieurs cas peuvent se présenter pour chaque antibiotique :

- Bactérie sensible : absence de virage dans les 2 cupules (CCS et CCI rouges),
- Bactérie résistante : virage au jaune dans les 2 cupules,
- Sensibilité intermédiaire : virage seulement au niveau de la CCI, la CCS reste rouge.

Lors de cette lecture on peut avoir un résultat incohérent lorsqu'il y a croissance bactérienne au niveau de la CCS et inhibition cette croissance au niveau de la cupule contenant la CCI.

2 - 6 Contrôle de la qualité de microplaques

2.6.1 Stérilité

Avant son utilisation, le milieu d'étude de la sensibilité est incubé sans inoculum pendant 18h à 37°C.

Le milieu est considéré comme stérile s'il y a absence de virage de l'indicateur coloré.

2.6.2 Efficacité du milieu

Le milieu estensemencé avec une bactérie qui consomme le glucose (E coli)
Après 18 h d'incubation à 37°C, le milieu doit normalement subir un virage de sa couleur rouge en jaune.

2.6.3 Reproductibilité

Test effectué avec la souche de référence *E. coli* ATCC 25922.

L'inoculum est le même pour les différentes plaques testées. Les résultats obtenus doivent être similaires.

2.6.4 Stabilité

Le milieu d'étude de sensibilité et les antibiotiques est très stable lorsque la conservation est faite au frais a 4°C.

Les antibiotiques ont une date de péremption et des conditions de conservation déterminées par le fabricant.

2.6.5 Etude comparative

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus par la méthode du E-test[®] qui est la méthode de référence.

Cette comparaison permettra de vérifier la validité des résultats obtenus avec la microméthode.

L'amoxicilline, l'amikacine, l'acide nalidixique et la ciprofloxacine ont été les antibiotiques utilisés avec les deux techniques (E-test[®] et la microméthode) pour la comparaison.

C - RESULTATS ET COMMENTAIRE

I/ IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

1 - Les souches testées

Nous avons eu à tester lors de notre étude 39 souches d'entérobactéries qui ont été isolées au niveau du laboratoire de Bactériologie Virologie de l'HALD.

Les souches ont été conservées dans un bouillon nutritif à - 4°C.

<u>Souches</u>	<u>Nombre</u>
<i>Escherichia coli</i>	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Proteus vulgaris</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	2
<i>Citrobacter diversus</i>	2
<i>Citrobacter freundii</i>	2
<i>Salmonella typhi</i>	2
<i>Shigella dysenteriae</i>	2
<i>Shigella flexneri</i>	2
<i>Providencia rettgeri</i>	2

A partir d'une colonie obtenue d'une culture de 24 h sur milieu ordinaire, toutes les souches testées ont été identifiées avec les microplaques sans test complémentaire.

2 - Substrats utilisés

La galerie d'identification de la microméthode a comporté 22 substrats :

- les sucres (lactose, glucose, mannitol, saccharose, sorbitol, rhamnose, adonitol, dulcitol, inositol) qui sont associés avec le MEVAG. Les résultats obtenus avec les sucres pouvaient varier au sein d'une même espèce,
- les acides aminés (lysine, ornithine, arginine) qui sont utilisés pour l'étude des décarboxylases,
- la gélatine est un substrat métabolisé de manière caractéristique par les genres *proteus* et *providencia*,
- la recherche de l'uréase
- VP (production d'acétoine)
- la production SH₂,
- la production indole,
- l'utilisation du malonate,
- la phénylalanine (la recherche désaminase),

3 - Déshydratation des substrats

Les milieux d'étude ont été déshydratés à l'étuve à la température de 37°C en présence de dessicateur.

Au bout 72 heures, la majorité des plaques se trouvait déshydratée mais tout le lot ne l'était qu'après 4 jours dans l'étuve.

Cette déshydratation à 37°C est relativement longue mais présente l'avantage de ne pas entraîner une dénaturation des milieux.

4 - Lecture

La lecture des caractères métaboliques se fait après un délai de 16 heures d'incubation. Le résultat obtenu à la 16^{ème} heure reste inchangé jusqu'à 24 heures d'incubation.

Par contre à partir de la 30^{ème} heure, on a noté un revirement progressif de l'indicateur coloré au niveau de l'ADH, LDC, ODC, des sucres et du VP. Ce virage de l'indicateur rendait positifs les résultats précédemment négatifs.

5 - Evaluation de la méthode

Sur les 39 souches testées, toutes ont été aisément identifiées. Certes il nous est quelques rares fois arrivé de reprendre l'identification pour cause de souillure mais aucune souche n'a donné de résultats ininterprétables.

Toutes les identifications faites avec la galerie classiquement utilisée pour les entérobactéries ont été confirmées par la microméthode.

Rappelons que la microméthode utilise 22 caractères biochimiques pour l'identification contre 8 caractères en général (glucose, lactose, phénylalanine, citrate, mannitol, indole, urée, SH₂) pour la minigalerie.

Cependant, le caractère de la mobilité de la bactérie n'est pas tenu en compte d'où la nécessité de faire l'étude à l'état frais et le Gram avant d'utiliser la microméthode.

La pureté de l'inoculum qui a servi à réaliser un test ne peut pas être contrôlée contrairement à la méthode classique qui présentera les colonies de formes différentes.

III/ ETUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

1 - Les souches testées

La sensibilité des 23 souches d'entérobactéries a été étudiée. Elles ont été choisies parmi celles qui ont fait l'objet d'un test avec la méthode de référence en matière de sensibilité : le E-test®.

<u>Souches</u>	<u>Nombres</u>
<i>Escherichia coli</i>	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3
<i>Proteus vulgaris</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3

Ces souches ont été conservées à - 70 °C. Avant leur utilisation elles sont repiquées sur gélose ordinaire.

2 - Antibiotiques utilisés

Pour cette étude de sensibilité 10 antibiotiques ont été utilisés : ampicilline, amoxicilline, céfuroxime, ceftriaxone, amokacine, acide nalidixique, ciprofloxacine, tétracycline, aztréonam, chloramphénicol.

3 - Résultats contrôle de qualité

3 -1 Stérilité du milieu

A chaque lot de préparation du milieu d'étude de la sensibilité, la stérilité a été contrôlée. Le milieu témoin non ensemencé ne doit normalement pas virer après une incubation à l'étude. Tout virage de ce milieu indique une souillure.

Après autoclavage, les milieux préparés ont été conservés stérilement à 4°C pendant un mois.

3-2 Efficacité du milieu

Une bactérie utilisant le glucose , en occurrence la souche de référence de *E. coli* ATCC 25922, a provoqué après incubation un virage de l'indicateur coloré montrant ainsi l'efficacité du milieu.

3-3 Reproductibilité

La souche de référence *E. coli* ATCC 25923 a été mise à l'essai à raison 2 tests par lot et les résultats ont montré une bonne reproductibilité.

4 - Stabilité

4-1 Stabilité du milieu

Le milieu une fois préparé a été conservé à 4°C ce qui a permis d'avoir une stabilité relativement bonne 2 mois après préparation.

4 - 2 Stabilité des antibiotiques

Les directives des fabricants ont été respectées pour une bonne stabilité des molécules sous forme de poudre ou en solution. Ces directives de bonne conservation concernaient la température, les solvants à utiliser, les tampons, le pH, etc.

5 - Profil de sensibilité des souches

5 - 1 *Escherichia coli*

Les souches ont montré une bonne sensibilité vis à vis d'aztréonam 32 µg/ml, la ciprofloxacine 8µg/ml, la céfuroxime 8µg/ml, la céftriaxone 4 µg/ml .

La sensibilité est intermédiaire avec l'acide nalidixique . Par contre une forte résistance a été notée avec les aminopénicillines et la tétracycline.

Tableau VII : *Escherichia coli*

Antibiotiques	<i>Escherichia coli</i>		
	S	I	R
Ac .nalidixique	4	2	0
Aztréonam	4	2	0
Chloramphénicol	5	1	0
Ciprofloxacine	6	0	0
Tétracycline	2	3	1
Ampicilline	0	2	4
Amoxicilline	1	1	4
Céfuroxime	4	1	1
Ceftriaxone	5	1	0
Amikacine	4	2	0

5-2 Enterobacter

On a noté une résistance assez marquée au béta-lactamine (ampicilline, amoxicilline et l'amikacine). Cette résistance est moins nettement marqué pour les céphalosporines de deuxième génération céfuroxime à 32µg/ml ; deux souches *E. cloacae* ont été résistantes à cette concentration et une souche s'est montrée sensible à une CCI 4µg/ml.

Pour les trois souches *E. aerogens*, la sensibilité pour la céfuroxime s'est constamment révélée.

La ciprofloxacine a eu une action inhibitrice toutes les souches d'enterobacter.

Tableau VIII : *Enterobacter*

Antibiotiques	<i>Enterobacter cloacae</i>			<i>Enterobacter aerogenes</i>		
	S	I	R	S	I	R
Ac .nalidixique	0	2	1	1	1	1
Aztréonam	2	1	0	0	2	1
Chloramphénicol	0	1	2	1	1	1
Ciprofloxacine	2	0	0	3	0	0
Tétracycline	1	2	0	2	1	0
Ampicilline	0	0	3	0	1	2
Amoxicilline	0	1	2	0	1	2
Céfuroxime	0	2	1	0	2	1
Ceftriaxone	1	1	1	1	2	0
Amikacine	1	2	0	3	0	0

5 - 3 *Proteus*

Seules les quinolones (acide nalidixique, ciprofloxacine) et la céphalosporine de trois génération (ceftriaxone) ont inhibé les souches de *Proteus* (*P. mirabilis* et *P. vulgaris*) a leur concentration critique inférieure.

L'efficacité de l'amoxicilline et de l'ampicilline négligeable puisqu'on a eu un seul résultat intermédiaire contre 5 souches résistantes.

Tableau IX : Proteus

Antibiotiques	<i>Proteus vulgaris</i>			<i>Proteus mirabilis</i>		
	S	I	R	S	I	R
Ac .nalidixique	2	0	1	1	1	1
Aztréonam	3	0	0	2	0	1
Chloramphénicol	0	1	2	1	0	2
Ciprofloxacine	3	0	0	3	0	0
Tétracycline	0	1	2	0	0	3
Ampicilline	0	0	3	0	1	2
Amoxicilline	0	2	1	1	0	2
Céfuroxime	1	1	1	0	1	2
Ceftriaxone	0	0	3	0	1	2
Amikacine	0	1	2	0	1	2

5- 4 Klebsiella pneumoniae

Les souches K. pneumoniae ont présenté toutes une résistance naturelle aux aminopénicillines.

Les autres antibiotiques (quinolones, céphalosporines, cyclines) ont eu une bonne inhibition à leur concentration critique inférieure.

Tableau X : Klebsiella pneumoniae

Antibiotiques	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	S	I	R
Ac .nalidixique	4	1	0
Aztréonam	5	0	0
Chloramphénicol	2	1	2
Ciprofloxacine	5	0	0
Tétracycline	2	1	2
Ampicilline	0	0	5
Amoxicilline	0	1	4
Céfuroxime	4	1	0
Ceftriaxone	5	0	0
Amikacine	5	0	0

5 - 5 Comparaison E-test[®] et microméthode (résultats)

Seuls quatre antibiotiques ont été testés par E-test[®] (amoxicilline, amikacine, l'acide nalidixique et la ciprofloxacine).

Pour la comparaison deux types de discordances seront notées :

- discordance majeure où on obtient un résultat « sensible » par une méthode et résistant pour l'autre méthode,
- discordance mineure où on obtient un résultat « intermédiaire » par une méthode et « sensible » ou « résistant » par l'autre méthode.

Sur les 22 résultats comparés au E-test[®] :

- * Les discordances majeures représentent 5,4% des résultats
- * Les discordances mineures sont à 10%.

La microméthode a tendance à donner un résultat « intermédiaire » pour un résultat « sensible » par le E-test[®].

D – DISCUSSION

Le but de notre travail était de faire une standardisation de la microméthode et d'étudier les paramètres biotechnologiques de l'identification ainsi que l'étude de la sensibilité.

Il sera aussi intéressant pour cette étude de comparer notre travail avec d'autres études ou méthodes qui ont été décrites dans la littérature. Cette comparaison sera un moyen de jauger les capacités de la microméthode.

I/ IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

- Les souches qui ont été utilisées, sont isolées du laboratoire de Bactériologie du C.H.U. Le Dantec. Certaines bactéries ont été isolées des années auparavant et la conservation a été faite par congélation dans un bouillon nutritif et conditionné dans des cryotubes.
- La galerie de la microméthode utilise tous les milieux qui composent une galerie classique d'identification des Entérobactéries. D'autres caractères y ont été ajoutés : LDC, ODC, ADH, ONPG, les sucres (saccharose, rhamnose, adonitol, dulcitol, inositol).
Hormis l'adonitol, tous ces caractères composent le kit d'identification API 20 E[®] commercialisé par Biomérieux **(6)**.
L'API 20 E[®] présente 4 caractères qui ne sont pas étudiés avec notre microméthode. Ces caractères sont l'oxydase, la réduction de nitrate en nitrite (NO₂), réduction des nitrate en azote (N₂) et la mobilité.

Cependant, ces caractères ne sont pas des éléments de différenciation majeur des entérobactéries entre elles ; elles sont en général toutes oxydase négatif, elles n'entraînent pas une réduction des nitrates en azote et elles produisent toutes du NO₂. Les entérobactéries sont en général mobiles sauf les Klebsielles, Shigelles, Yersinia.

Ainsi, ces 4 caractères qui ne sont pas étudiés par la microméthode ne constituent pas un véritable handicap dans l'identification.

- L'inoculum bactérien constitue un élément important dans l'identification biochimique, surtout avec notre méthode qui utilise de très faibles quantités de substrat ; une forte concentration de l'inoculum entraîne son épuisement rapide et une faible concentration entraîne un temps de virage très long de l'indicateur coloré.

La concentration de l'inoculum doit prendre en compte celle que doit avoir le milieu déshydraté.

Il est impératif de travailler avec une souche pure et jeune, de standardiser la concentration finale de l'inoculum comme l'a montré NIASSE M. F. (19).

La turbidité de l'inoculum est ajustée à l'échelle de 0,5 Mac Farland .

Cette concentration a donné un meilleur résultat pour les entérobactéries (2). 0,5 Mac Farland équivaut à une concentration de 10^6 bactéries /ml.

- La déshydratation des milieux a permis naturellement une meilleure stabilité, réduisant ainsi les risques de souillure. L'autre avantage de la déshydratation, est de faciliter le conditionnement et l'utilisation de la microplaque,

➤ Résultats

- La reproductibilité de la méthode est équivalente aux coffrets qui sont vendus dans le commerce API 20 E. Les tests de reproductibilité ont donné des résultats identiques avec la souche de référence,
- La stabilité est très bonne, la conservation peut se faire pendant une année au frais et au sec sans aucune altération,

- Le temps de réalisation de la microméthode pour un manipulateur expérimenté est d'environ 3 mn et le temps nécessaire pour l'identification est de 16 heures. Ces performances montrent l'efficacité de la méthode,
- Le coût de revient d'un test n'excède pas 1000 F CFA, ce qui répond à la nécessité du moindre coût.

III/ ETUDE DE SENSIBILITE

- Le milieu d'étude de la sensibilité doit répondre à certaines conditions pour donner des résultats fiables.

Le milieu utilisé est le milieu Müller Hinton supplémenté en ions (Ca^{2+} , Mg^{2+}) préparé selon les recommandations des auteurs Daniel F. Sahm, John A. (3) pour des travaux d'étude de sensibilité en milieu liquide.

Le glucose constituant essentiel de ce milieu est un sucre utilisé par les entérobactéries. Son utilisation produit une acidification du milieu qui sera mise en évidence par l'indicateur coloré le rouge (5).

Un virage du rouge au jaune démontre une croissance bactérienne.

Le milieu est très stable et la zone de virage correspond à une variation du pH de 8,4 à 6,8.

Le supplément en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sera ajouté, au milieu autoclavé, par filtration stérilisante.

- Les antibiotiques ont été choisis en fonction des entérobactéries mais aussi en fonction de leur disponibilité. En effet, les antibiotiques utilisés en recherche fondamentale coûtent excessivement chers.

Pour des raisons de commodités, 10 molécules ont été choisies; la microplaque contenant 20 puits, chaque molécule occupe 2 puits (1 puits pour la CCS et 1 puits pour la CCI.)

La CCI et la CCS ont été tirées du logiciel Whonet 5.

Les antibiotiques choisis :

- **Bêta- lactamines**

- Aminopénicilline (ampicilline, amoxicilline)
- Céphalosporine 2^{ème} génération (céfuroxime)
- Céphalosporine 3^{ème} génération (ceftriaxone)
- Aminoside (amikacine)

- **Quinolones**

- Acide nalidixique
- Ciprofloxacine

- **Monobactam**

- Aztréonam

- **Phénicolé**

- Chloramphénicol

- **Cycline**

- Tétracycline

➤ La conservation des antibiotiques a été faite selon les directives du fabricant.

Une fois mis en solution , les conditions de conservation changent comme l'indique Dorothy et coll. (4).

L'ampicilline et l'amoxicilline ont été les moins stables (6 semaines).

Par contre les autres antibiotiques ont une stabilité de 6 mois à – 20°C.

➤ L'inoculum bactérien est le même que pour l'identification 0,5 Mac Farland (étalonnage).

➤ Résultats

Les résultats obtenus par rapport aux autres méthodes :

- La reproductibilité de la méthode est bonne, mais moins bonne que la méthode de disque ou E-test[®],
- Beaucoup de résultats discordants ont été notés, en moyenne 1,5 par microplaque (7,5 %) de discordances, par rapport aux résultats donnés par les E-test[®].

La majorité de ces discordances sont mineures. Elles concernent les résultats “intermédiaires” avec notre méthode, qui se sont révélés “sensibles” avec le E-test[®].

La préparation extemporanée des concentrations critiques fait que le temps de réalisation est très long si on le compare la méthode des disques ou au E-test[®].

C'est un travail minutieux et fastidieux, nécessitant beaucoup de calculs pour obtenir la CCI ou la CCS.

Duval J. (5) a montré par ailleurs que les tétracyclines formaient des complexes inactifs avec les ions Mg^{2+} , ce qui diminuait son efficacité.

CONCLUSION

Les microméthodes pour identifier et étudier la sensibilité des bactéries ont montré au cours de nos travaux une grande capacité à donner des résultats fiables, rapides et de coût moindre.

La microméthode repose sur des réactions chromogéniques. Elle nécessite l'utilisation d'indicateurs colorés dont la zone de virage coïncide le plus possible avec les variations de pH des milieux lorsqu'elles sont positives.

Les milieux qui entrent dans la confection de notre galerie sont ceux qui composent la galerie classique des entérobactéries. Ces milieux sont disposés dans les puits de la microplaque puis subissent une déshydratation à 37°C dans l'étuve.

Cette opération permet d'accroître la stabilité du milieu et présente comme autre avantage un conditionnement plus facile de la microplaque. Comme préalable à l'utilisation de cette technique, il nous faut faire des études préliminaires avec la colonie pure obtenue d'une culture sur milieu ordinaire (boîte de pétri).

Ces études préliminaires sont : la mobilité, la morphologie, la coloration de Gram.

La microméthode d'identification des entérobactéries est déjà mise à l'essai dans des structures sanitaires .

Nous avons testé 32 souches appartenant à la famille des entérobactéries, toutes ont été identifiées grâce à notre microméthode sans test complémentaire.

La réalisation du test est de 3 minutes et la lecture des caractères d'identification se fait après 16 heures d'incubation.

La microplaque pour l'étude de la sensibilité contient 10 antibiotiques chacun à 2 concentrations CCI et CCS.

Le milieu d'étude de la sensibilité aux antibiotiques est à base de bouillon MUELLER HINTON, glucose et le rouge de phénol est l'indicateur coloré.

Un virage du milieu montre que le glucose a été utilisé, qu'il y a croissance bactérienne en présence d'antibiotiques et l'absence de virage démontre le contraire.

Les résultats obtenus sont de 3 catégories :

- Sensible : si l'inhibition de croissance s'est faite aux 2 concentrations
- Résistante: si la bactérie survit à l'antibiotique à ses 2 concentrations.
- Intermédiaire: si la croissance s'est faite avec la CCI et inhibée avec la
- CCS.

Contrairement à l'identification qui donne une concordance d'espèces à 100%, l'étude de la sensibilité par la microméthode donne une concordance inférieure à 80% par rapport au E-TEST®

Le temps mis pour sa réalisation est assez long puisque les préparations se font extemporanément.

Sa réalisation est délicate puisqu'on a beaucoup de calculs à faire pour les concentrations et dilutions.

L'amélioration de cette méthode d'étude de la sensibilité se fera certainement par une déshydratation des antibiotiques ce qui permettra de réduire considérablement le temps de réalisation de ce test de sensibilité.