

INTRODUCTION

Les cocci Gram positif occupent en pathologie humaine une place importante par leur nombre et la gravité des infections qu'ils provoquent.

Ce sont des espèces bactériennes constituées par des cellules de forme arrondie (cocci ou coques) immobiles, à Gram positif, aérobie anaérobie facultative, dont l'importance médicale est très grande.

Nous distinguons :

- Les Staphylocoques appartenant au genre *Staphylococcus*
- Les Streptocoques appartenant au genre *Streptococcus*
- Les Entérocoques

Les Staphylocoques sont responsables chez l'homme d'infections qui peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané. Elles peuvent aussi diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique avec un polymorphisme symptomatique extrême.

La plupart des Streptocoques sont des commensaux habituels des cavités naturelles ou des téguments. Mais certaines espèces peuvent devenir pathogènes dans certaines circonstances et être responsables d'infections streptococciques sévères.

Les entérocoques sont des commensaux du tube digestif, responsables d'infections urinaires et d'endocardites. Les plus fréquemment isolés sont *Enterococcus faecalis* et à moindre degré *Enterococcus faecium*.

La fréquence et la gravité de ces infections traduisent des difficultés de prise en charge, liées non seulement à l'identification de ces bactéries mais également à l'émergence et à la propagation de souches multirésistantes.

L'utilisation rationnelle des antibiotiques en clinique humaine devrait nécessairement passer par l'étude in vitro de la sensibilité des bactéries pathogènes aux différentes molécules antibiotiques. Ceci permettra aux cliniciens d'avoir le choix d'une antibiothérapie de première intention adaptée aux données épidémiologiques locales.

Pour ce faire, différentes méthodes d'étude in vitro de la sensibilité sont actuellement disponibles dans le commerce.

Cependant ces méthodes se sont avérées très coûteuses pour beaucoup de structures sanitaires de nos pays en voie de développement dont les revenus faibles ne permettent pas l'accès à ces techniques.

En vue de pallier les contraintes de ces méthodes, des microméthodes d'étude de la sensibilité, simples, fiables et peu onéreuses ont été mises au point à l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie et virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec : les plaques micro-CSB Sensibilité.

L'efficacité et la fiabilité de ces microplaques ont été démontrées et validées par des études antérieures [5, 19, 32,45].

Néanmoins ces plaques sont toujours à un délai de lecture de 24h. Dans un souci d'avoir une bonne lecture des microplaques de sensibilité en un intervalle de temps court, l'objectif de notre travail était de :

Déterminer grâce à l'étude de la croissance l'inoculum adéquat pour une bonne étude de la sensibilité des cocci à gram positif avec les plaques micro-CSB Sensibilité

Déterminer le délai nécessaire de lecture des plaques de sensibilité.

Ainsi après un bref rappel bibliographique, nous aurons à étudier le temps d'incubation des micro-plaques de Sensibilité-CSB en fonction des différents inocula avant de valider la méthode par le critère de linéarité

I- RAPPEL SUR LES STAPHYLOCOQUES

I-1- DEFINITION

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, immobiles, asporulés et habituellement non capsulés.

La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives, à catalase positive, à l'exception de *S.saccharolyticus* et *S. aureus subsp. anaerobius*. Ce sont des germes dépourvus d'oxydase en dehors de *S.lentus*, *S.sciuri* et *S.caseolyticus*.

I-2- HISTORIQUE [36]

Les staphylocoques ont été identifiés par d'éminents microbiologistes à l'instar de Koch, Pasteur, Ogston et Rosenbach.

En 1878, Koch souligne le rôle pathogène des bactéries se présentant sous forme de cocci à gram positif. Ces cocci seront ensuite isolés puis identifiés d'un pus par Louis Pasteur en 1880.

Ils seront baptisés en 1883 par Ogston sous le nom de staphylocoques, du latin <<staphylla>> ou grappe et <<coccus >> ou grain.

En 1884, ils sont classés en fonction de la pigmentation des colonies par Rosenbach en *S.aureus* du latin << orange >> et *S.albus*, du latin << blanche >>.

I-3- TAXONOMIE ET CLASSIFICATION

Les staphylocoques appartiennent à la famille des micrococcaceae qui comprend quatre genres qui diffèrent par la composition en base de leur ADN G+ C (mol %)

- *Micrococcus*
- *Staphylococcus*
- *Stomatococcus*
- *Planococcus*

Les espèces appartenant à ces genres possèdent une catalase et se développent en aérobie. Les cocci à Gram positif en amas qui se développent uniquement en aérobie sont dénommés *Peptococcus* [42]

- ***Le genre Micrococcus***

Comprend les microcoques qui sont également des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme et par conséquent souvent présents dans les prélèvements.

Ce sont presque toujours des contaminants qu'il importe de distinguer des staphylocoques.

- ***Le genre Staphylococcus***

Plus de 30 espèces de staphylocoques ont été identifiées dont la plupart sont trouvées seulement chez les mammifères inférieurs [48]

Leur classification a subi depuis 30 ans d'incessants changements aboutissant à une meilleure précision grâce à la prise en compte non seulement des classiques caractères morphologiques, physiologiques et métaboliques mais aussi de certains caractères génétiques, antigéniques et écologiques. Il existe malheureusement non pas une seule mais plusieurs classifications, qu'il est cependant utile de connaître en pratique [23].

- **classification de Baird-Parker**

Elle ne reconnaît que trois espèces bien déterminées : *S.aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*. Mais beaucoup de souches de staphylocoques demeurent inclassables. Les espèces *S.epidermidis* et *S.saprophyticus* comprennent chacune 4 biotypes.

- **classification de Kloss et Schleifer**

Ces auteurs distinguent dix espèces dans le genre *Staphylococcus*.

Certaines d'entre elles sont bien individualisées ; d'autres sont regroupées sur la base de caractères communs.

Malgré cette division du genre, la pratique montre qu'il reste 15% de souches inclassables.

- subdivision des souches de *staphylococcus aureus* en fonction de l'origine animale.

Espèce ubiquitaire, *S.aureus* s'est cependant adapté à diverses niches écologiques et des biotypes ont été décrits chez les différentes espèces animales.

Récemment Hajek et Marsalek ont proposé une subdivision en 4 biotypes A, B, C et D.

Les biotypes E et F initialement décrits ont été regroupés dans une espèce : *S.intermedius*.

Deux autres espèces ont été récemment identifiées : *S.hyicus* et *S.sciuri*.

Mais récemment la famille des Micrococacceae a été démantelée et l'espèce *S.aureus* n'est plus regroupée avec d'autres genres bactériens.

En 1998, 41 taxons incluant 35 espèces et 7 sous espèces ont été décrits [23] *S.aureus* exprime des caractères qui le différencient des autres staphylocoques : il possède notamment une coagulase et est souvent pathogène. On l'oppose classiquement aux autres staphylocoques non producteurs de coagulase et plus rarement responsables d'infections.

- **Le genre *Stomatococcus***

Comprend *Stomatococcus nucilaginosus* qui fait partie de la flore buccale.

- **Le genre *Planococcus***

Comprend des bactéries du milieu marin.

I-4- HABITAT [22, 42]

Il s'agit de germes très répandus dans la nature (air, eau, sol). Les staphylocoques en particulier les espèces *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des <<porteurs asymptomatiques>>. Cependant ces souches peuvent être à l'origine d'auto-infections ou contaminer d'autres individus.

Les staphylocoques peuvent être trouvés particulièrement dans les fosses nasales antérieures.

Les staphylocoques sont fragiles et vivent à l'état commensal au niveau des téguments ou des muqueuses de l'homme ou des animaux.

Certains groupes sont rencontrés dans le sol, dans l'air et dans l'eau. Leur présence normale au niveau cutanéomuqueux explique qu'ils peuvent contaminer fréquemment des prélèvements et constituer des souillures.

I-5- CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

I-5-1- Caractères morphologiques

Dans le pus *S.aureus* se présente sous l'aspect de cocci en petit amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes (3 à 5 éléments), mesurant 0,8 à 1µm, positivement colorés au Gram.

Sur les cultures en milieu solide il se dispose en <<grappe de raisin >>, alors qu'en milieu liquide il est isolé en diplocoques. Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique sauf de très rares souches (souches Smith) [23]

I-5-2- caractères cultureux

Staphylococcus aureus est un germe aérobi-anaérobie facultatif. Il croît abondamment sur milieu gélosé (colonies de 1 à 2 mm de diamètre) ; certaines souches produisent un pigment jaune orangé, mais cette production est irrégulière [42], car certaines donnent des colonies blanches ; le caractère pigmentaire n'est pas propre à l'espèce.

La culture est obtenue en 18 à 24 heures à 37° C (culture possible entre 10 et 45° C) sur milieux ordinaires. *S.aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif de Chapman à 75% de NaCl). Le pH optimal est de 7,0 à 7,5.

Certains facteurs de croissance sont indispensables (vitamine B₁, acide nicotinique) [42]

En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt. Il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide.

Sur gélose ordinaire, les colonies sont lisses, rondes, bombées et leur diamètre est de 1mm.

A +4° C, les staphylocoques conservent leur vitalité pendant 3 mois dans le pus, pendant 1 an sur gélose, ils sont détruits à 58° C au bout de 60mn. Leur croissance est inhibée par les androgènes et la progestérone.

Staphylococcus aureus possède un équipement enzymatique permettant de métaboliser de nombreux substrats (glucides, lipides, protéides). [22]

Il existe des colonies naines de *S. aureus* provenant de milieux contenant certains sels minéraux (chlorure de lithium ou de baryum), certains colorants (violet de gentiane, acrydine orange), certains antibiotiques (methicilline, aminoside) ou provenant de prélèvements de patients mis sous antibiotiques. Ces souches retrouvent généralement leurs caractères cultureux normaux après une ou deux subcultures. [33]

Les caractères cultureux, physiologiques et métaboliques des espèces de staphylocoques ont été donnés dans les tableaux I et II

Tableau I : Classification des staphylocoques (d'après Baird.Parker, 1974) [47]

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulase	+	-	-
Acidification aérobie du mannitol	+	d	d
Acidification anaérobie du mannitol	+	-	-
Production d' α - toxine	+	-	-
Nucléase thermostable	+	-	-
Exigence en biotine	-	+	NT
Acide ribitol teichoïque pariétal	+	-	+
Acide glycérol teichoïque pariétal	-	+	+
Protéine A pariétale	+	-	-
Sensibilité à la novobiocine	S	S	R

Légende : + : 90p.100 ou plus de souches positives ; - : 90p.100 ou plus de souches négatives ; d : moins de 50p.100 de souches positives ou négatives ; NT : non teste ; S : sensible ; R : résistant.

**Tableau II : Classification simplifiée des staphylocoques cutanés d'origine [47]
humaine (d'après Kloos et Schleifer 1975)**

<i>Staphylococcus</i>	Diamètres des colonies (5j>5mm)	Croissance anaérobie en thioglycate	lystostaphine (R à 50 µg/ml)	Hémolyse (érythrocytes de bœuf)	Réduction du nitrate	Phosphatase	Novobiocine (R à 1,6µg/ml)	Coagulase	Fructose	Galactose	Mannose	Xylose/Arabinose	Ribose	Maltose	Lactose	Saccharose	Tréhalose	Turanose	Mélézitose	Mannitol	Xylitol
<i>aureus</i>	+	+	-	(+)	+	+	-	+	+	+	(+)	-	+	+	(+)	+	+	(+)	-	+	-
<i>saprophyticus</i>	+	+/-	+	-	-	(-)	+	-	+	-	-	-	-	+	(+)	+	+	+	-	+	+/-
<i>epidermidis</i>	-	+	+	+/-	+/-	+	-	-	+	(+)	(+)	-	-	+	(+)	+	-	V	(-)	-	-
<i>haemolyticus</i>	(+)	±C	+	(+)	+	(-)	-	-	++	V	-	-	(-)	+	-+	+	+	V	-	+/-	-

Légende : + positif ; ± faible ; - : négatif ; V : variable ; ces signes indiquent une fréquence de 90 à 100p.100 ; entre () ils indiquent une fréquence de 70 à 89 p.100 ; ±C : gradient avec de grosses colonies.

Dans l'ensemble, *S. epidermidis* a un métabolisme beaucoup plus faible que *S. aureus*.

I-5-3- Caractères biochimiques

L'étude des différents caractères biochimiques et métaboliques des souches de staphylocoques a permis le développement de galeries d'identification rapides et efficaces, permettant de définir les différents profils biochimiques de souches appartenant à une même espèce [28].

I-5-3-1- Caractères généraux

Les staphylocoques possèdent une catalase à l'exception de *S. aureus* sous espèce *anaérobicus* que l'on retrouve exclusivement chez les moutons [28, 30] et qui est une souche anaérobie stricte. Ce sont des germes dépourvus d'oxydase en dehors de *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. caseolyticus* [28, 24].

I-5-3-2- Production d'Uréase [29]

Les bactéries hydrolysent toute l'urée mais seules celles ayant une uréase constitutive, c'est à dire dont la synthèse est indépendante de la présence du substrat, vont arriver à alcaliniser le milieu, entraînant le virage de l'indicateur coloré

L'uréase est également une enzyme inductible. La recherche de l'uréase repose sur la libération d'ions ammonium qui alcalinisent le milieu, entraînant le virage du rouge de phénol du jaune au rouge cerise.

I-5-3-3- Production d'acétoïne [29]

Les micro-organismes produisent lors de leur métabolisme, de nombreux produits de dégradation qui comme dans le cas ci-présent peuvent être recherchés.

L'acétoïne en langage courant, ou hydroxy-3-butanone ou encore dans la nomenclature ancienne acétyl-méthyl-carbinol (AMC) est un produit de dégradation du glucose au cours de la fermentation 2-3 butylène glycolique en passant par l'acétolactate et le diacétyl. Elle peut également être obtenue par condensation de deux molécules de pyruvate.

Il existe entre autres, la méthode conventionnelle de Voges-Proskauer miniaturisée ou non, incorporée aux méthodes biochimiques d'identification des staphylocoques disponibles dans le commerce.

I-5-3-4- Production de décarboxylases [29]

La production de l'ornithine décarboxylase (ODC) concerne essentiellement l'espèce *S. lugdunensis* et secondairement certaines souches de *S. epidermidis* dont l'enzyme a cependant une activité retardée.

Les décarboxylases sont des enzymes qui sont actives à pH acide ; le milieu d'étude sera donc acidifié par la fermentation du glucose puis réalcalinisé par l'action des décarboxylases sur le substrat qui est un acide aminé.

Les décarboxylases scindent les acides aminés avec formation de l'amine correspondante et libération de dioxyde de carbone selon la réaction suivante :

Les enzymes recherchées le plus souvent sont :

- l'ornithine décarboxylase (ODC)
- l'arginine dihydrolase (ADH)
- la lysine décarboxylase (LDC)

I-5-3-5- Production de la bêta-galactosidase [29]

La β -galactosidase est une enzyme bactérienne inductible, existant à un niveau de base dans le milieu intracellulaire, capable de scinder la molécule de lactose en sucres simples que sont le glucose et le galactose après avoir traversé la paroi cellulaire sous l'action de la bêta-galactosidase perméase.

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 l'ONPG du côté du nitro-2-phénol et non de celui du bêta-galactosidase. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas le lactose.

Le test à l'ONPG est une technique relativement simple, 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 substrats et libèrent respectivement l'orthonitrophénol jaune et le bêta-naphtol qui se combine au sel de Fast blue B en solution dans le 2-méthoxyéthanol pour donner une coloration rouge pourpre.

I-5-3-6- Réduction des Nitrates

La réduction des nitrates et des nitrites constitue un des caractères taxonomiques importants chez les staphylocoques lors de leur identification. Ce test permet d'étudier la réaction de réduction des nitrates en nitrites sous l'action du nitrate réductase produite par certains staphylocoques.

La réaction sera mise en évidence par l'addition d'acide sulfanilique et d'alpha-naphtylamine qui révèlent la présence de l'ammoniaque libérée

I-5-3-7- Utilisation des hydrates de carbone

Les glucides sont utilisés de trois manières différentes par les staphylocoques : soit après conversion par l'action d'isomérases, soit après hydrolyse en sucres simples ou directement, s'ils sont fournis sous une forme simple (glucose, fructose) [33].

L'assimilation étudiée surtout par la voie fermentaire mais également par la voie oxydative se traduit presque toujours par l'accumulation de dérivés acides quelle que soit la voie de dégradation.

II- STREPTOCOQUES ET ENTEROCOQUES

II-1- DEFINITION

Ce sont des cocci à gram positif ; les cellules peuvent être ovoïdes, sphériques ou rarement allongées en bâtonnets, et se divisent en un seul plan pour former des paires ou plus souvent des chaînettes. Ils sont dépourvus de cytochrome et de catalase. Le contenu en (G + C) est compris entre 33 et 42. [42]

II-2- HISTORIQUE [21, 17, 2, 41]

Le nom *Streptococcus* (streptus : flexible ; coccus : grain) fut pour la première fois attribué par BILBROTH et EHRLICH à des coques formant des chaînettes observées dans les prélèvements provenant de blessures infectées.

PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX (1881) rendirent compte d'une infection septicémique obtenue chez les lapins inoculés avec de la salive humaine.

FAHLEISEN (1883) décrivit une coque similaire comme agent de l'érysipèle.

Le nom de *Streptococcus pyogenes* fut donné par ROSENBAACH (1884) à des coques groupées en chaînettes et isolées de lésions suppuratives chez l'homme.

NOCARD et MOLLEREAU (1887) découvrirent le "*Streptococcus* de la mammitte de Nocard" qui ensuite fut appelé *Streptococcus agalactiae*.

LANCEFELD, en 1933 décrivit les groupes sérologiques de A à F.

Les souches de référence de streptocoques du groupe B étaient d'origine bovine. Les infections néonatales dues à ce groupe ont été plus récemment signalées en 1962 par REITEL et collaborateurs et par WAHL et collaborateurs en 1964 par EICKHOFF et coll.

SCHULTZ décrivit les streptocoques isolés de lésions de pneumonie et de gourme chez les chevaux.

SCHLEIFER réalisa à la séparation des deux genres *Streptococcus* et *Enterococcus* en 1984. Les infections à streptocoques qui autrefois étaient considérées comme propres aux pays froids et humides sont maintenant fréquentes en zone tropicale particulièrement en Afrique de l'Ouest.

Pour ce qui est du Sénégal, les premiers travaux ont été décrits avec les infections à streptocoques hémolytiques du groupe A.

D'autres suivirent et permirent de démontrer que ces affections occupaient la deuxième place des statistiques cardiologiques de villes africaines.

II-3- CLASSIFICATION

Il n'existe pas de critère unique qui permette de classer en pratique les différentes espèces du genre *Streptococcus*.

La classification fait appel à l'étude de plusieurs types de caractères bactériologiques. [42]

Selon leur pouvoir hémolytique, on distingue :

- des souches α hémolytiques : hémolyse incomplète
- des souches β hémolytiques : hémolyse complète
- des souches non hémolytiques (γ) : pas d'hémolyse.

Ce critère ancien n'a plus aujourd'hui qu'une valeur d'orientation.

Selon l'équipement antigénique : classification de Lancefield (1933).

Elle s'appuie sur des critères immunologiques qui permettent de détecter des antigènes spécifiques de groupe.

La plupart des espèces de streptocoques, notamment bêta hémolytiques, possèdent dans leur paroi un polysaccharide C dont la composition et les propriétés antigéniques permettent de définir des groupes sérologiques.

La classification de Lancefield distingue 20 groupes sérologiques (désignés par des lettres de A à M et de K à W). [42]

Certaines espèces dépourvues de polysaccharide C sont souvent des souches non hémolytiques ou donnant une hémolyse dite α viridans. Elles sont dites « non groupables ». [42]

La technique de Lancefield comprend une extraction du polysaccharide C à partir d'une suspension de la souche par l'acide chlorhydrique à chaud ou par l'acide nitrique ou la formamide.

Selon les caractères biochimiques qui permettent d'individualiser des espèces dans le genre *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis*, etc...

Les critères de la taxonomie moléculaire ont permis de définir des groupes génomiques et d'individualiser de nouvelles espèces. Le séquençage d'un fragment de l'ARN 16 S conduit à reconnaître 6 groupes :

- les « pyogènes » (groupes A, B et C),
- les streptocoques oraux ou « viridans » en 3 groupes,
- les streptocoques du groupe D,
- les streptocoques non classés. [42]

Une classification encore largement acceptée, basée sur des tests sérologiques et biochimiques reconnaît quatre divisions principales :

- Streptocoques pyogènes (habituellement β hémolytiques possédant un antigène polysidique de groupe),
- Entérocoques (résistant à 6,5 p.100 de Cl),
- Streptocoques lactiques (isolés principalement des produits laitiers),
- Streptocoques « viridans » (dépourvus d'antigène de groupe). [25]

II-4- HABITAT

Les streptocoques appartenant à la famille des *Streptococcaceae* sont retrouvés à l'état commensal sur la peau et les muqueuses [49]. Ce sont des germes ubiquitaires.

Les Streptocoques du groupe D sont retrouvés dans l'intestin et ceux du groupe B dans les voies génitales. Dans la bouche on a les streptocoques non groupables appelés *salivarius*, *sanguis*, *mitis*, *mutans* ; qui donnent des dextrans jouant un rôle dans les caries dentaires.

II-5- CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

II-5-1- Caractères morphologiques [30, 49]

Ils se présentent sous forme de coques ovoïdes ou sphériques à Gram positif et groupées en chaînette. Les chaînettes résultent de la non séparation des paires de coques en division et se présentent comme une succession de diplocoques.

Par contre, la formation de chaînettes est de rigueur dans les milieux artificiels et dans les exsudats purulents des lésions ouvertes.

Les Streptocoques des groupes A, C, G caractérisés par de longues chaînettes donnent sur milieux liquides une culture en dépôt.

Les autres donnent un trouble homogène du bouillon et se présentent alors sous la forme de diplocoques (*S. pneumoniae*) ou de courtes chaînes (streptocoques du groupe B, *S. bovis*).

Le phénomène de capsulation peut être observé avec les streptocoques du groupe A et surtout du groupe C dans la phase exponentielle de croissance.

Dans les cultures âgées les coques deviennent Gram négatif.

Les streptocoques déficients présentent des anomalies morphologiques constantes lors de l'isolement.

D'une manière générale, les streptocoques du groupe A sont constitués de cellules bien arrondies. Ceux du groupe D ont une forme de ballon de rugby *Streptococcus pneumoniae* possède un aspect en flamme de bougie.

II-5-2- Caractères culturels [5, 6, 30]

Les streptocoques peuvent pousser sur des milieux usuels mais néanmoins, ils ont des exigences nutritives très complexes.

Tous les streptocoques sont aéro-anaérobies. Ce sont des germes très fragiles. La température idéale de croissance est comprise entre 20 et 42°C avec un optimum à 35-37°C.

II-5-2-1- Culture sur milieux usuels

La plupart des streptocoques poussent sur ces milieux et réalisent sur gélose nutritive des colonies très fines transparentes dispersées à la surface en grain de semoule avec une couleur légèrement bleutée.

Cette culture étant difficile, il est préférable de la réaliser sur milieux enrichis.

II-5-2-2- Culture sur milieux enrichis

Certaines substances sont habituellement utilisées pour enrichir les milieux. Ce sont les peptones, les extraits de viande ou infusion de cœur-cerveau, le sang, le sérum et / ou l'ascite.

Les milieux peuvent se présenter soit sous forme liquide, soit sous forme solide.

➤ Milieux liquides d'enrichissement [30]

Les Streptocoques supportent très mal les milieux glucosés. En effet le glucose par voie fermentative donne de l'acide lactique avec un abaissement du pH qui rend le milieu hostile. C'est la raison pour laquelle on utilise le bouillon glucosé tamponné (B.G.T.).

On peut également utiliser le bouillon streptosele. Les Streptocoques donnent soit un trouble homogène avec ou sans dépôt (groupe B, D), soit une pousse granulaire avec sédimentation rapide, le surnageant pouvant être limpide ou légèrement trouble (A, C, G).

➤ Milieux solides d'isolement [5, 30]

Les milieux les plus généralement utilisés sont les géloses enrichies au sang (sang de mouton ou de cheval). Ces milieux permettent de voir la capacité des streptocoques à lyser les hématies.

On peut observer une pousse des streptocoques 24 heures après incubation à l'étuve sous une atmosphère enrichie en CO₂.

L'aspect de la zone d'hémolyse et sa dimension sont fonction de l'hémolysine élaborée par la souche, du sang utilisé mais également du milieu.

Sur ces milieux enrichis, on distingue différents types d'hémolyse.

❖ Hémolyse bêta

C'est une hémolyse complète. Les hématies sont complètement lysées sur un diamètre d'environ 3 à 4 mm autour des colonies.

Cette hémolyse s'observe en général avec les streptocoques des groupes A, C, G double et quelque fois quadruple celle de la zone en question.

Les streptocoques du groupe B quant à eux présentent une zone d'hémolyse très petite et par conséquent pas claire.

❖ Hémolysé alpha

Elle est incomplète. Les globules rouges ne sont que partiellement lysés sur un diamètre d'environ 1 à 2 mm. Cette hémolyse peut quelque fois être accompagnée d'un verdissement du milieu.

On parle alors d'une hémolyse alpha viridans. Le mécanisme de cette coloration est mal connu.

❖ Hémolysé gamma ou absence d'hémolyse

Il n'existe aucune trace d'hémolyse. On utilise plus couramment le terme streptocoque non hémolytique. *S. salivarius* et *S. milleri* présentent une telle hémolyse.

II-5-3- Caractères biochimiques [49]

II-5-3-1- Absence de catalase

Elle permet d'établir un diagnostic différentiel entre *Streptococcus* d'une part et *Staphylococcus* et *Micrococcus* d'autre part. L'absence de catalase constitue alors un caractère clef d'orientation vers les streptocoques.

II-5-3-2- Sensibilité à la bacitracine [42]

Ce test a été très critiqué car c'est une épreuve mal standardisée : la charge des disques n'est pas toujours précisée par les fabricants : la densité de l'inoculum varie ; le diamètre de la zone d'inhibition considéré comme significatif n'est pas toujours le même. Si l'on retient toute zone d'inhibition quel qu'en soit le diamètre, la presque totalité des Streptocoques du groupe A est sensible à la bacitracine.

On utilise des disques de bacitracine à 0,04 UI. Cette dose est suffisante pour provoquer sur une culture de *Streptococcus pyogenes* sur gélose au sang, une zone d'inhibition.

Les Streptocoques viridans peuvent également être inhibés par la bacitracine.

II-5-3-3- Le groupage antigénique

Il se fait à l'aide d'un antisérum monovalent dirigé contre l'antigène spécifique du groupe A. Plusieurs techniques existent :

- la technique de LANCEFIELD, (cf. II.3. classification)
- la précipitation en milieu gélosé par contre immunoélectrophorèse,
- l'immunofluorescence directe,
- la coagglutination de staphylocoques ou de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques (actuellement la plus utilisée).

III- LA CROISSANCE BACTERIENNE

III-1- DEFINITION

La croissance est l'augmentation ordonnée de la somme de tous les composants d'un organisme. Ainsi, l'augmentation de la taille lorsqu'une cellule absorbe l'eau ou libère un lipide ou un polysaccharide n'est pas la croissance réelle. La multiplication des cellules est une conséquence de la croissance ; dans les organismes unicellulaires, la croissance conduit à une augmentation du nombre d'individus composant une population ou une culture. [26].

La division bactérienne est le corollaire habituel mais non obligé de la croissance. [50]

III-2- LA COURBE ET LES PHASES DE CROISSANCE

Si un milieu liquide non renouvelé estensemencé avec des cellules bactériennes prélevées d'une culture déjà saturée et le nombre de cellules viables par millilitre déterminé régulièrement, une courbe du type de celle de la figure ci-dessous, est habituellement obtenue [26]. La courbe peut être segmentée en 7 phases représentées par les chiffres 1 – 7.

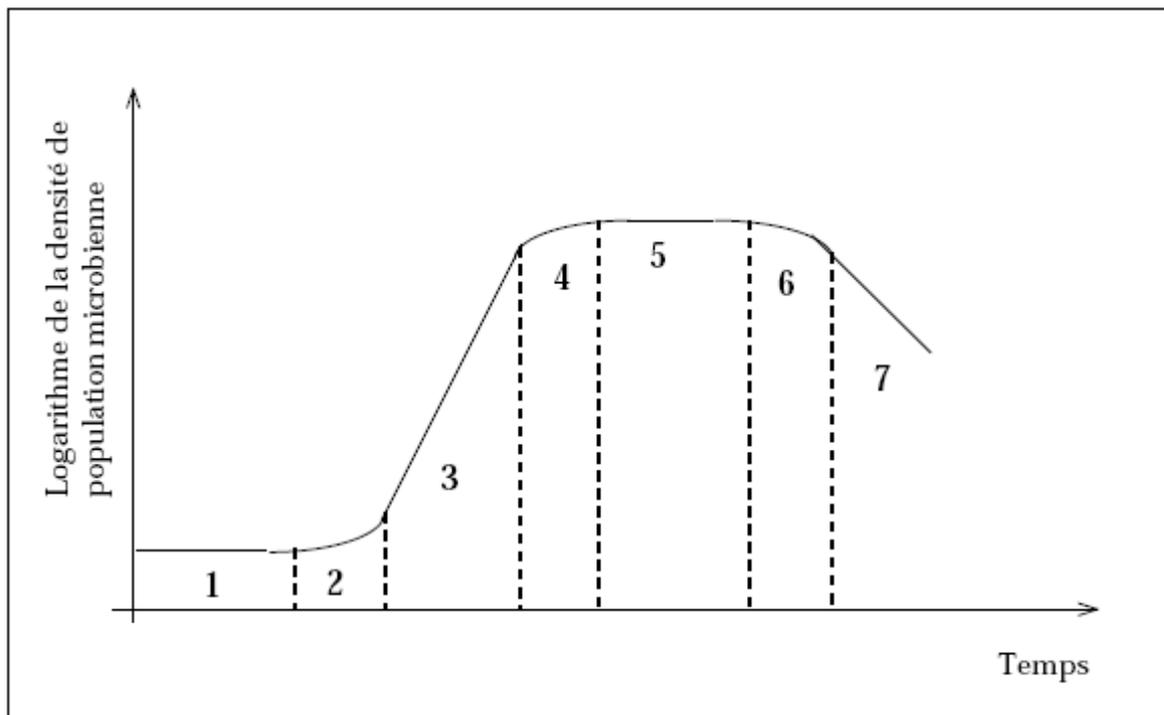


Figure1 Les 7 phases de la cinétique de croissance d'une population bactérienne. D'après Buchanan (1919). [8]

- *La phase de latence* (1)

Elle représente la période où les cellules ayant épuisées les métabolites et les enzymes de leur environnement initial, s'adaptent à leur nouvel environnement.

Les enzymes et les intermédiaires sont formés et s'accumulent jusqu'à ce qu'ils soient présents à des concentrations permettant une reprise de la croissance.

Elle peut être supprimée en incubant le milieu avec des bactéries prélevées pendant la phase exponentielle de croissance.

- ***La phase d'accélération*** (2) au cours de laquelle, le taux de croissance s'accroît régulièrement. [50]

- ***La phase exponentielle*** (3)

Les cellules sont en équilibre. Le nouveau matériel de la cellule est synthétisé à un taux constant, mais ce matériel est également catalysé, et la masse augmente de façon exponentielle. Ceci continue jusqu'à ce que l'un des deux phénomènes suivants se produisent : un ou plusieurs des nutriments s'épuisent dans le milieu, ou, que des produits métaboliques toxiques s'accumulent et inhibent la croissance. Le taux de croissance devient constant et atteint sa valeur maximale. [26,50].

- ***La phase de ralentissement*** (4), liée à l'épuisement du facteur limitant. La valeur de μ diminue progressivement. [22,50]

μ : taux de croissance

- ***La phase stationnaire*** (5), liée à l'épuisement de l'aliment, à l'accumulation de produits toxiques ou à la constitution d'un équilibre ionique défavorable. [22]

- ***La phase de décroissance*** (6) au cours de laquelle la masse bactérienne décroît et le taux de croissance prend des valeurs négatives. Cette phase de décroissance correspond à une mort et à une lyse progressive des bactéries en présence des déchets du métabolisme accumulés pendant la croissance. [50]

- ***La phase de mortalité logarithmique*** (7), durant cette phase le taux de mortalité par organisme reste constant.

NB. Les bactéries peuvent être maintenues dans la phase exponentielle en les transférant à plusieurs reprises dans le milieu frais de composition identique. Deux dispositifs automatiques ont été inventés pour suivre ce processus automatiquement : le chemostat et le turbidostat. [26]

III-3- FACTEURS INFLUENCANT LA CROISSANCE

De nombreux facteurs physiologiques affectent la croissance de la cellule bactérienne et incluent la concentration en ions hydrogène de son environnement, la température, l'humidité et le potentiel d'oxydo-réduction [40].

a) La température

Suivant leur comportement à l'égard de la température, on distingue classiquement des micro-organismes mésophiles (l'échelle de température est comprise entre 20 et 45°C). Les bactéries pathogènes pour l'homme font partie des mésophiles et ont un optimum aux environs de 37°C ; toutefois certaines espèces comme *Listeria monocytogenes* peuvent se développer à + 4°C. Cependant certaines bactéries ne se comportent qu'occasionnellement comme des parasites des organismes supérieurs (infections à bactéries opportunistes), et leurs conditions confèrent une adaptation soit à des températures inférieures à 30°C (bactéries psychrophiles), soit à des températures de l'ordre de 40 à 45°C (bactéries thermophiles). [35]

La température, paramètre sélectif pour la croissance des bactéries, conditionne la prolifération exclusive de certaines espèces dans un biotype donné. [35]

Les températures élevées sont incompatibles avec la multiplication et même la survie des bactéries, la chaleur sèche au poupinel à 180° C pendant 30 minutes et la chaleur humide par l'autoclave à 120°C pendant 30 à 60 minutes servent pour la stérilisation. [23]

b) Le pH

Les bactéries sont généralement tolérantes à des variations de pH entre 6 et 9, grâce à la régulation exercée par leur membrane à l'encontre des ions H⁺. [14]

Les bactéries fermentant l'urée et productrices d'ammoniaque tolèrent des pH très alcalins. [23]

Dans les cultures en milieux non tamponnés, les alcalins libérés à partir notamment des réactions de décarboxylation des acides aminés ou les acides libérés par dégradation des carbohydrates peuvent modifier le pH dans des conditions telles que le milieu devient toxique pour les bactéries.

c) La pression osmotique

Les bactéries sont assez tolérantes vis-à-vis des variations des concentrations ioniques ; l'affinité de certaines espèces pathogènes pour la salinité est utilisée pour la réalisation de milieux sélectifs (staphylocoques, vibrion cholérique). On décrit des bactéries halophiles exigeant plus de 2% de Cl pour cultiver tel *Vibrio para haemolyticus*.

d) Les pressions partielles d'oxygène

Les bactéries peuvent être groupées dans trois catégories selon leurs exigences en oxygène :

- Les aérobies strictes ou obligatoires sont celles qui se développent en présence d'oxygène.
- Les anaérobies strictes ou obligatoires se développent seulement en l'absence d'oxygène.
- Les aéro-anaérobies facultatives sont des bactéries qui se développent aussi bien en conditions aérobiques qu'anaérobiques. Dans ce groupe, figurent la plupart des bactéries d'intérêt médical.

e) Les radiations [22]

Les bactéries sont sensibles aux rayons UV, aux rayons RX, à la lumière.

f) Les substances antibactériennes

Les antiseptiques, les antibiotiques s'opposent à la croissance des bactéries et sont utilisés pour les détruire. Toutefois, certaines substances sont des inhibiteurs sélectifs de certains micro-organismes et on les ajoute dans les milieux pour favoriser électivement la multiplication de bactéries insensibles.

III-4- TECHNIQUES DE MESURE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

La croissance bactérienne peut être appréciée en estimant, en fonction du temps, les variations de la masse bactérienne ou, plus souvent, du nombre de cellules. [50]

Des concentrations microbiennes peuvent être mesurées en termes de concentration en cellules (le nombre de cellules viables par unité de volume de culture) ou de la concentration de biomasse (poids sec de cellules par unité de volume). Ces

deux paramètres ne sont pas toujours équivalents, parce que le poids sec moyen de la cellule change à différentes étapes de l'évolution d'une culture. Ils ne sont pas non plus d'importance égale. [26]

Deux types de méthodes sont utilisés pour mesurer la croissance bactérienne :

- les méthodes de numération,
- les méthodes quantitatives.

- ***Méthode de numération*** [22, 26, 27 ,50]

Deux méthodes principales peuvent être utilisées :

- numération totale : elle consiste à dénombrer au microscope ou avec des compteurs spéciaux les individus viables ou non.

Les cellules mortes ne peuvent pas être distinguées de celles en vie. Seules les suspensions denses peuvent être comptées ($>10^7$ cellules par ml), mais des échantillons peuvent être concentrés par centrifugation ou filtration pour augmenter la sensibilité ;

- numération des cellules viables : on compte les colonies bactériennes apparues sur ou dans un milieu de culture gélosé convenable, inoculé par une aliquote d'une suspension bactérienne homogène et suffisamment diluée.

Sur un milieu approprié, chaque unité viable croît et forme une colonie. Chaque colonie pouvant être comptée s'appelle une unité formant colonies (UFC), et le nombre d'UFC est lié au nombre de bactéries viables dans le milieu. Cette méthode est plus facile et de très grande sensibilité, mais elle nécessite beaucoup de dilutions et de boîtes.

- ***Méthodes quantitatives*** [22, 26, 27, 50]

Plusieurs méthodes sont envisageables, parmi lesquelles :

- la mesure directe de la masse bactérienne : en principe, la biomasse peut être mesurée directement en déterminant le poids sec d'une culture microbienne. Les bactéries sont lavées, séchées et pesées. C'est une méthode longue qui nécessite une grande quantité de cellules pour que les pesées soient assez précises. Mais c'est la méthode de référence (1mg de poids sec correspond à quelques milliards de corps bactériens).

- la mesure de l'activité enzymatique : mesure du pH, mesure de la consommation d'oxygène. Ces méthodes sont peu précises.

- le dosage de l'azote bactérien : cette méthode a les mêmes applications que la méthode gravimétrique.

- la mesure de la densité optique : ici on admet que l'absorption lumineuse est proportionnelle à la masse des microbes. Elle est rapide et précise, mais sa sensibilité est modérée, car il faut une teneur d'au moins 10^7 bactéries/ml pour obtenir une densité optique mesurable. Elle est fortement entachée d'erreurs en cas de suspensions bactériennes non homogènes.

Tableau III : Exemple de comptage de cellules viables

Dilution	Dénombrement sur boîte*
Non dilué } 10^{-1}	Trop trouble
10^{-2}	510
10^{-3}	72
10^{-4}	6
10^{-5}	1

* Chaque dénombrement est effectué sur 3 boîtes [26].

III-5- CONDITIONS DE CROISSANCE DES STAPHYLOCOQUES ET DES STREPTOCOQUES

III-5-1- Les staphylocoques

Les staphylocoques cultivent sur des milieux contenant 5% de chlorure de sodium et certaines espèces tolèrent jusqu'à 10 et même 15%. Les staphylocoques fermentent les sucres en produisant abondamment de l'acide lactique. Ils puisent l'énergie indispensable à leur métabolisme par respiration, ils possèdent en effet une chaîne de transport électronique adaptée et en particulier des cytochromes et d'autres chromoprotéines porphyriniques.

Staphylococcus aureus est auxotrophe vis-à-vis de la thiamine qui agit comme un facteur de croissance. C'est une molécule organique indispensable à la croissance et qui n'est pas synthétisée par l'organisme.

Les températures minimales et maximales de développement sont respectivement de 6 à 8°C et de 45°C. Il se multiplie facilement à des pH compris entre 4,0 et 9,8 même s'il affectionne plutôt les pH légèrement acides. Il se développe dans des milieux dont l'Aw est de 0,86.

III-5-2- Les streptocoques

La majorité des souches de Streptocoque est capable de croître en présence de 40% de bile mais incapable de cultiver à 45°C ou à pH 9,6. La température idéale de croissance est de 36°C ± 2, le pH est de 7.

Une culture est facilement obtenue sur gélose au sang et les colonies, de petite taille, sont parfois pigmentées en jaune ou en orange ; l'hémolyse est variable.

IV- RAPPEL SUR LES ANTIBIOTIQUES ET L'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

IV-1- Les antibiotiques [10, 13, 20, 18, 34, 37, 38,46]

IV-1-1- Définition d'un antibiotique

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

Pour être efficace, l'antibiotique doit satisfaire aux trois conditions suivantes :

- pénétration à l'intérieur de la bactérie ;
- intervention au niveau d'une cible à l'intérieur de cette bactérie ;
- l'antibiotique ne doit pas être inactivé par des enzymes pouvant être synthétisées par cette bactérie.

L'action de l'antibiotique sur la bactérie se traduit par :

- des modifications de la croissance : dans ce cas l'antibiotique est bactériostatique.
- des modifications de la capacité de survie : dans ce cas l'antibiotique est bactéricide.

IV-1-2- Mécanisme d'action des antibiotiques

IV-1-2-1- Action sur la paroi bactérienne

Les antibiotiques agissant par ce mécanisme extracellulaire ne le sont que sur les germes en croissance. Les cellules qui sont au repos ne sont pas perturbées par l'action de ces molécules.

Les antibiotiques bloquent la synthèse de la paroi, la cellule s'allonge sans faire de paroi (cloison) et explose sous l'effet de la pression osmotique interne. Si on ajoute un stabilisant osmotique, on obtient un protoplaste.

Exemple : la pénicilline, les céphalosporines.

IV-1-2-2- Action sur la membrane des cellules

Les antibiotiques 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.

IV-1-2-3- Action sur l'ADN

Les sulfamides par exemple sont des analogues structurels de molécules biologiques. La cellule va les reconnaître, les insérer dans son métabolisme, bloquant ainsi les voies métaboliques. Ceci provoque une inhibition de la synthèse des bases nucléiques indispensables à la synthèse de l'ADN.

IV-1-2-4- Action sur le ribosome bactérien

Approximativement, la moitié des antibiotiques utilisés en thérapeutique ont pour cible le ribosome bactérien, organe cellulaire responsable de la synthèse des protéines. Ces antibiotiques se répartissent en plusieurs classes, de nature chimique et d'actions différentes. La plupart interagissent avec l'ARN ribosomique.

- Les aminoglycosides ou aminosides se fixent sur les sous unités 30S et 50S des ribosomes, empêchant ainsi la traduction de l'ARNm.
- Les phénicolés bloquent la formation de la liaison peptidique. Ils se fixent sur la sous unité 50S du ribosome bactérien (50 Svedberg) mais pas sur celle des ribosomes eucaryotiques.
- Les cyclines, en se fixant sur la sous unité (30S), bloquent l'élongation de la chaîne polypeptidique.
- Les macrolides agissent sur la partie (50S) du ribosome et bloquent l'élongation de la chaîne polypeptidique.

IV-1-3- Classification des antibiotiques

IV-1-3-1- Les β -lactamines

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

On distingue trois familles principales :

- Les pénicillines
- Les céphalosporines
- Les monobactams

➤ ***Les pénicillines***

Dans cette famille on distingue :

- Les pénicillines naturelles (les groupes G et V)
- Les pénicillines du groupe M. (oxacilline)
- Les aminopénicillines (ampicilline, Amoxicilline)
- Les carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline)
- Les acyl ureidopénicillines (piperacilline, mezlocilline)
- Les amidino-pénicillines (pivmécillinam)

➤ ***Les céphalosporines***

Elles sont constituées de 4 générations :

- Céphalosporines de 1^{ère} génération (Céfato latine, Céfacétrile, Céfadroxil, Céfradine).
- Céphalosporines de 2^{ème} génération (Céfuroxime, Céfamendole, Céfoxitine)
- Céphalosporines de 3^{ème} génération (Céftriaxone, latomoxef, Céfotaxime)
- Céphalosporines de 4^{ème} génération (Céfépine, Cefpirome, Céfozoprane)

➤ ***Les monobactams***

L'Aztreonam appartient à cette sous famille.

IV-1-3-2- 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, Kanamycine, Néomycine...
- Aminosides de 2^{ème} génération : Amikacine, Gentamicine, Tobramycine...
- Aminosides de 3^{ème} génération : Nétilmicine

IV-1-3-3- Macrolides, Lincosamides, Streptogramines (MLS)

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

- Macrolides (Erythromycine, Oléandromycine, Josamycine)
- Lincosamides (Lincomycine, Clindamycine)
- Streptogramines ou Synergistine (Pristinamycine, Virginiamycine).

IV-1-3-4- Les cyclines

Les principaux produits sont : les tétracyclines, doxycyclines, minocyclines. Les tétracyclines ont une activité antibiotique large, seulement bactériostatique.

IV-1-3-5- Les phénicolés

Ce sont des bactériostatiques à large spectre, dérivés de l'acide dichloro-acétique. Nous distinguerons le chloramphénicol, le thiamphénicol.

IV-1-3-6- Les quinolones

On peut les diviser en deux 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 grande activité par leur spectre large et leur pharmacocinétique (Ciprofloxacine, péfloxacine, norfloxacine).

IV-1-3-7- Les polypeptides

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques (polymyxine).

IV-2- METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Différentes techniques d'évaluation de l'activité des antibiotiques peuvent être mises en œuvre au laboratoire de bactériologie.

IV-2-1- Méthode de diffusion : antibiogramme standard [1, 7, 9, 3, 11, 12,46]

Les disques d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose préalablement ensemencée 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 (18 heures à 37° C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication bactérienne a une concentration supérieure ou égale à la CMI

La CMI est la concentration minimale d'antibiotiques 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.

Standardisation [11]

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. La standardisation est régie par des documents émanant de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et des divers Comités Nationaux. Selon les pays, il peut exister des variations techniques et il est important de respecter une technique identique à celle utilisée pour l'établissement des courbes de concordance.

IV-2-2 E-test® (epsilon-meter-test) [4, 5, 18, 19, 31, 44]

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 256mg/l ou 0,002 à 32mg/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 préalablementensemencée 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.

IV-2-3- Les Micro méthodes d'étude in vitro de la sensibilité [4, 5, 18, 19, 31,44]

Les appareils utilisés par cette méthode fonctionnent schématiquement selon deux principes :

- Ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité ;
- Ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou de plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'un indice propre à chaque machine.

Dans tous les cas, l'antibiogramme reste un test permettant de collecter en routine des données sur l'aptitude de bactéries à croître en présence d'antibiotiques dans des conditions précises de milieu, d'inoculum et de temps.

➤ **Méthode utilisant deux concentrations critiques**

Les concentrations en antibiotiques qu'il est possible d'obtenir dans l'organisme se définissent par une zone des taux thérapeutiques délimitée par deux valeurs critiques exprimées en g/ml.

- La concentration critique inférieure (CCI) correspond au taux sanguin moyen obtenu aux posologies habituelles.
- La concentration critique supérieure (CCS) correspond au taux sanguin maximal obtenu par l'administration de fortes doses. Certains systèmes utilisent ces concentrations critiques pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Ces méthodes sont à l'origine des premiers appareils automatiques. Avec elles, on peut interpréter directement les résultats de l'antibiogramme. En effet, lorsque la croissance est étudiée par mesure d'une activité enzymatique, on utilise les concentrations critiques supérieure et inférieure fixées par les Comités Nationaux d'Antibiogramme.

Le résultat obtenu est logique :

- La croissance en présence de la plus forte concentration d'antibiotique est le fait de souches résistantes ;
- La croissance en présence de la plus faible concentration seulement est caractéristique des souches intermédiaires ;
- L'inhibition de la croissance aux deux concentrations d'antibiotiques est spécifique des souches sensibles.

La croissance est décelée par photométrie et / ou néphélométrie. La lecture se fait à l'œil nu pour certaines méthodes.

Il existe différents systèmes, les plus utilisés sont les systèmes ABAC, ATB-API et les CSB.

Seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées par ces méthodes.

➤ **Méthode utilisant une concentration critique**

Ces méthodes étudient la croissance de la bactérie en présence d'une seule concentration d'antibiotique adaptée pour discriminer les bactéries sensibles des résistantes. Cette concentration n'est pas liée aux concentrations critiques.

L'inoculum bactérien est de 10^6 bactéries /ml.

➤ **Système effectuant une analyse cinétique de la croissance :**

L'analyse cinétique de la croissance bactérienne a été la base du premier système d'antibiogramme automatique qui a été commercialisé. Le principe du fonctionnement ne diffère cependant pas fondamentalement des systèmes utilisant une concentration. Ces systèmes donnent des réponses précoces et permettent quelquefois l'estimation de la CMI.

- Soit en utilisant plusieurs concentrations d'antibiotiques
- Soit en utilisant un calcul spécifique (propre à chaque fabricant).

➤ **Dilution en bouillon :**

Les méthodes de dilution en bouillon MH pour la détermination de la CMI peuvent être réalisées en plaques de microtitration. Cette micro méthode est plus adaptée pour la pratique de l'antibiogramme grâce à une automatisation possible.

Les systèmes pour l'antibiogramme ont trouvé leur place dans les laboratoires de microbiologie.

Leurs performances sont comparables à celles des technologies conventionnelles. Certains permettent aussi l'obtention rapide de résultats, ce qui assure aux biologistes un suivi plus fiable de leurs patients.

Avantages et inconvénients

➤ **Avantages**

Ces micro méthodes d'étude de la sensibilité présentent plusieurs avantages. Les évaluations récentes des divers systèmes d'antibiogramme automatiques montrent que la concordance avec la CMI (méthode de référence) existe dans plus de 85% des cas. Ce pourcentage de concordance peut varier selon le système. Ces miro méthodes ont permis de réduire (en tout cas pour certains) les délais de réponse.

➤ **Inconvénients**

Les micro méthodes présentent néanmoins des inconvénients :

- Seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées par ces méthodes ;
- Aucun système actuellement disponible ne mérite au sens strict le qualificatif d'automatique, c'est à dire ne réalise de façon automatique l'ensemble des phases de la détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques ;
- Le nombre d'antibiotique testé par antibiogramme est limité par le nombre de cupules des plaques.
-

V- PROCEDURES DE VALIDATION ET DEFINITIONS DE QUELQUES PARAMETRES DE VALIDATION [17]

La définition des critères de qualité destinés à valider une technique de dosage a fait l'objet du travail d'un groupe d'experts.

Sur la base des données expérimentales provenant de l'application du protocole de validation de techniques et de l'exploitation des résultats de différents programmes de contrôle de qualité intra et inter laboratoires, des limites acceptables sont proposées.

Ces limites sont destinées à juger de la qualité d'une technique de dosage et à la valider en fonction de sa reproductibilité et de sa justesse.

Pour chaque analyste, sont rapportés le domaine de mesure, les valeurs applicables à titre indicatif, les trois niveaux de concentration des préparations de contrôle à utiliser pour l'évaluation ainsi que l'intervalle des valeurs dans lequel elles peuvent être choisies et les limites de répétabilité et de reproductibilité exprimées en termes de CV en pourcentage.

Le respect des règles d'assurance qualité des laboratoires oblige à la validation des techniques en préalable et à le justifier. Il s'agit d'un pré-requis indispensable dans le cadre de l'accréditation des laboratoires. Cette opération s'effectue en deux étapes : l'évaluation des performances de la technique suivie de leur validation pour vérifier leur conformité à des normes. Ces exigences sont réglementaires, mais le référentiel permettant de définir les qualités souhaitables d'une technique d'analyse n'existe pas.

Le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale indique que c'est aux biologistes qu'incombe le choix des méthodes optimisées utilisées dans un grand nombre de laboratoires et recommandées par les sociétés scientifiques nationales ou internationales de biologie ou dans le cas échéant validées par lui-même à condition qu'elles permettent, dans la mesure du possible, le transfert des résultats et que des procédures opératoires doivent être techniquement validées afin d'assurer la qualité des résultats.

La commission de validation de techniques de la SFBC avait proposé en 1986 un protocole de validation accompagné de normes d'acceptabilité établies pour une vingtaine d'analyses.

Ce protocole a été largement utilisé et a permis un dialogue fructueux entre les différents partenaires de la biologie médicale : biologistes entre eux, biologistes et industriels, biologistes et cliniciens, biologistes et partenaires administratifs. Il est apparu très vite que le nombre d'analyses décrits dans ce document était insuffisant. C'est pourquoi les initiateurs du premier projet ont souhaité rassembler un groupe de travail, sous l'égide de la SFBC, pour réactualiser et proposer des critères de validation dans un domaine plus étendu. Ce document permet la définition des normes d'acceptabilité (limites de reproductibilité, de justesse et exactitude pour une centaine d'analyses et des niveaux de concentration pertinents choisis pour correspondre le plus souvent à des niveaux de décision médicale différents.

Les paramètres de la validation sont :

- linéarité et domaine d'utilisation ;
- droite de régression;
- limite de détection ;
- précision ;
- exactitude ;
- sensibilité.

V-1- LINEARITE OU DOMAINE D'ANALYSE

Evaluation de la limite haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyte observé et la dilution effectuée.

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons.

Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé. Il faut analyser chaque dilution en triple, répéter l'essai, le cas échéant, dans d'autres conditions de temps.

V-2- LIMITE DE DETECTION

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée, avec une probabilité connue, d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est égale à k fois l'écart type de précision, mesuré sur le blanc. Si le nombre de valeur = 30, la valeur de 3 est retenue pour k.

$$\mathbf{LD = S \times k}$$

LD = limite de détection

S = écart-type

K = facteur dépendant du nombre de mesures effectuées

V-3- PRECISIONS

C'est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart-type ou par le coefficient de variation calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un certain nombre d'échantillons identiques sur le même lot homogène du produit à analyser.

V-4- DROITE DE REGRESSION

La droite de régression est la droite qui minimise la somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et les valeurs théoriques. Elle est aussi appelée la droite des moindres carrés.

Pour faire la prédiction, il s'agit simplement de substituer la valeur donnée à x dans l'équation de régression et de calculer la valeur de y. L'équation est donnée par la formule : $y = ax + b$ où a et b sont des constantes pouvant être calculé à partir des formules suivantes :

$$a = \frac{N \Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)}{N \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{\Sigma y}{N} - a \frac{\Sigma x}{N}$$

Le coefficient de corrélation sera une mesure de la corrélation entre deux séries de données. Il nous permettra d'estimer la fiabilité de notre droite.

La valeur du coefficient de corrélation reflète une bonne linéarité entre les deux variables x et y qui ont permis de calculer cette dernière par la formule suivante :

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

efficient de corrélation ; x_i = données observées
a = pente de la droite ; **b** = ordonnée à l'origine
N = nombre de paires (x ; y)
 utilisées pour calculer la droite de
 concordance ;
n = concentration inocula ; **C** = concordance des caractères

V-5- SPECIFICITE

C'est l'aptitude d'une méthode à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon.

La sélectivité (ou l'absence de la sélectivité) peut s'exprimer par l'erreur systématique constatée dans les résultats obtenus avec l'analyte en présence des concentrations escomptées des autres constituants, par comparaison des résultats obtenus en l'absence de ces substances.

V-6- SENSIBILITE

C'est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage. On doit éviter de donner à ce terme un sens plus général englobant la limite de détection et/ou de dosage.

V-7- EXACTITUDE ET JUSTESSE

Evaluation de l'exactitude d'une méthode B par rapport à une méthode A reconnue pour sa fiabilité (technique de référence), avec des spécimens de contrôle.

L'exactitude d'une méthode est le degré de concordance entre les résultats obtenus et la vraie valeur de la grandeur mesurée.

Remarque

Toutes ces caractéristiques ne sont pas toujours applicables à toutes les méthodes d'essai ni à tous les produits à analyser.

Dans tous les cas, chacune des caractéristiques de performance applicable à la méthode analytique doit faire l'objet d'une évaluation fondée sur des données expérimentales.

I- MATERIELS ET MILIEUX

I-1- MATERIELS

I-1-1-Cadre d'étude

Ce travail a été effectué à l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec et au laboratoire de bactériologie virologie fondamentale et appliquée de l'UCAD II.

I-1-2-Souches bactériennes

Cette étude a porté uniquement sur des souches qui ont déjà été identifiées et conservées au laboratoire, dont

La souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC29213
et des souches de contrôle :

- Une souche de *Staphylococcus epidermidis*
- Une souche de *Streptococcus pyogenes* ou Streptocoque du groupe A
- Une souche d'*Enterococcus faecalis* ou Streptocoque du groupe D

I-1-3-Matériel pour l'identification

- Boîtes de pétri en matière plastique
- Pipettes pasteur
- Bec bunsen
- Etuve
- Anse calibrée
- Microscope optique
- Micropipettes
- Microplaques
- Embouts stériles
- Becher rempli d'eau de javel
- Lames porte-objet
- Lamelles
- Four à micro-ondes
- Agitateur magnétique
- Papier buvard
- Dessiccateur sous vide à air renouvelé

I-1-4- Matériel pour l'étude de la croissance

- Etuve capable de maintenir une température de $36 \pm 2^\circ \text{C}$
- Boîtes de pétri en matière plastique
- Embouts stériles
- Micropipettes
- Autoclave
- Bain-marie
- Spectrophotomètre
- Appareillage pour le comptage des colonies muni d'un système d'éclairage
- Densitomètre

I-1-5- Matériels pour l'étude de la sensibilité

- Boîtes de pétri
- Ecouillons stériles
- Tubes à hémolyse
- Eau physiologique stérile
- Pince
- Microplaques
- Disques d'antibiotiques :
 - Erythromycine
 - Chloramphénicol
 - Ciprofloxacine
 - Doxycycline
 - Amikacine
 - Amoxicilline
 - Pénicilline G
 - Tétracycline

I-1-6- Matériel pour la conservation des souches

- Tubes nunc
- Portoirs
- Tubes stériles à vis
- Anse de platine

I-2- MILIEUX

- Gélose Mueller Hinton
- Gélose Chapman
- Gélose au sang
- Bouillon trypticase soja
- Bouillon glucosé tamponné (BGT)

I-3- CONTROLE DE QUALITE DES TESTS EFFECTUES

Chaque lot de milieu préparé est soumis à un contrôle de stérilité et d'efficacité sur le plan bactériologique.

I-3-1- Contrôle de stérilité des milieux d'enrichissement et d'isolement

- *Milieux liquides*

Un millilitre de chaque milieu préparé est mis dans un tube à hémolyse stérile qui est incubé à l'étuve à 37° C pendant 24h à 48h.

Les milieux sont considérés stériles en l'absence de trouble et de virage de l'indicateur.

- *Milieux solides*

Chaque boîte contenant de la gélose préparée est placée à l'étuve à 37° Pendant 24h à 48h.

Les milieux sont considérés stériles en l'absence d'apparition de colonies ou de virage de l'indicateur coloré.

I-3-2- Contrôle de qualité des microplaques de sensibilité

- Stérilité

Avant son utilisation, le milieu d'étude de la sensibilité est incubé sans inoculum pendant 24h à 37° C.

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

- Efficacité

Elle se traduit par la capacité du milieu à changer de coloration après test avec la souche de référence (*S.aureus* ATCC29213)

I-3-3- Contrôle des appareils

- L'étuve

La température de l'étuve était toujours à 37° C.

- Le densitomètre

Avant toute mesure, l'appareil devait être étalonné avec de l'eau distillée.

I-3-4- Contrôle des paramètres dynamiques

La température de travail était maintenue à 37° C aussi bien pour l'incubation de l'inoculum que des milieuxensemencés mais également des microplaques de sensibilité déjàensemencées.

Le pH de chaque milieu était vérifié et il correspondait aux normes attendues pour le milieu en question. Le contrôle du pH se faisait après la préparation de chaque lot de milieu. Il était réalisé à l'aide d'un pH-mètre.

II- METHODES

II-1- IDENTIFICATION

Les souches que nous avons utilisé étaient des souches déjà identifiées et conservées à -20° C.

Nous avons procédé à une identification sommaire de ces bactéries à étudier.

II-1-1- Identification des souches de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et de *Staphylococcus epidermidis*

Les souches ont été isolées sur de la gélose Chapman et incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h.

- *Examen macroscopique*

Après incubation, *Staphylococcus aureus* a donné sur la gélose Chapman des colonies luisantes et bombées plus ou moins pigmentées en jaune or d'où l'appellation de *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque «doré».

Staphylococcus epidermidis a donné sur Chapman des colonies opaques lisses, jaunes ou blanches.

- *Examen microscopique*

A partir d'une colonie nous avons confectionné un frottis que nous avons ensuite coloré au Gram.

L'examen microscopique à l'objectif 100 avec immersion, montrait des coques à Gram positif parfois regroupé en «amas» ou en grappes de raisin.

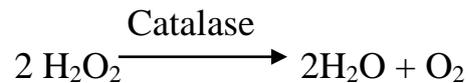
Pour *Staphylococcus epidermidis* nous avons observé des diplocoques Gram positifs en « amas » ou « grappes de raisin ».

- *Test à la catalase*

. Principe

L'eau oxygénée produite par certaines déshydrogénases de la chaîne respiratoire est toxique pour la bactérie. C'est la catalase qui va permettre la détoxification de cette eau oxygénée.

La catalase décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage.



. Technique

Ce test a consisté à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à mettre en contact une colonie isolée.

. Lecture

Catalase positive : apparition de bulles d'oxygène

Catalase négative : l'aspect reste inchangé

. Résultat

Staphylococcus aureus a montré une catalase positive, pareil résultat pour *Staphylococcus epidermidis*.

II-1-2- Identification de *Streptococcus pyogenes* et d'*Enterococcus faecalis*

Dans le but d'obtenir des colonies isolées, les souches ont été ensemencées sur de la gélose au sang, puis incubées à l'étuve à 37° C sous CO₂ pendant 24h.

- Examen macroscopique

Le streptocoque du groupe A a présenté de petites colonies transparentes entourées d'une zone d'hémolyse β.

Enterococcus faecalis ou Streptocoque du groupe D a présenté de petites colonies translucides.

- Examen microscopique

Nous avons confectionné un frottis à partir d'une colonie que nous avons coloré au Gram.

L'observation microscopique à l'objectif 100 à immersion des streptocoques montrait des cocci à Gram positif regroupés en chaînettes plus ou moins longues, immobiles non sporulés, non capsulés.

Pour *Enterococcus faecalis* nous avons observé des cocci Gram positif.

- **Test à la catalase** (idem pour les staphylocoques)

Le streptocoque du groupe A ne possédait pas de catalase. Il en a été de même pour *Enterococcus faecalis*.

- **La coagulase**

Ce test met en évidence la coagulase libérée dans le milieu de culture. Parmi les cocci Gram positif, seules les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent une coagulation du plasma de lapin.

· Technique

Elle consistait à préparer un inoculum à partir d'une souche isolée sur Chapman puis on ajoutait du sérum de lapin. L'incubation se faisait à 37° C à l'étuve pendant 3h.-24h

· Lecture

Coagulase positif : le milieu prend en masse

Coagulase négatif : le milieu ne prend pas en masse

· Résultat

Streptococcus pyogenes était coagulase négative, de même que *Enterococcus faecalis*.

- **Test d'agglutination par pastorex Streptococcus**

· Principe

C'est un test d'agglutination antigène- anticorps. Il permet de déterminer les groupes des streptocoques.

· Technique

Dans un tube à hémolyse, nous mettions 400µl du liquide d'extraction puis une colonie, le tout était incubé à 37° C pendant 10mm puis typé par les latex antistreptocoques A, B, C, D, G, F en plus des témoins.

Ainsi nous avons pu déterminer le groupe du streptocoque.

· Résultat

Pour *streptocoque pyogènes*, l'antigène A a agglutiné avec le latex antistreptocoque A.

Pour *Enterococcus faecalis*, l'antigène D a agglutiné avec le latex antistreptocoque D.

II-2- DETERMINATION DE L'INOCULUM PAR L'ETUDE DE LA CROISSANCE

II-2-1- Les Staphylocoques

- Préparation de l'inoculum

A partir de colonies isolées sur de la gélose Chapman (1 à 2 colonies), nous avons préparé une suspension bactérienne dans du bouillon glucose tamponné (10ml) puis incubé pendant 3 heures.

A partir de t_0 nous avons prélevé toutes les 30mn 1,5ml de la suspension bactérienne dont nous avons déterminé la concentration par le dénombrement bactérien sur boîte de pétri, et ce pendant 3heures de temps.

Au total, nous avons sept (7) points à étudier : t_0 , $t_1=30mn$, $t_2=1h$, $t_3= 1h30$, $t_4=2h$, $t_5=2h30$, $t_6=3h$

- Dénombrement bactérien sur boîtes de pétri

· Principe

La technique de la mesure de la croissance d'une population bactérienne par dénombrement sur boîte de pétri consiste à ensemercer à des intervalles de temps réguliers des boîtes de pétri par une dilution appropriée d'un échantillon de la suspension bactérienne : la dilution est calculée pour obtenir entre 30 et 300 colonies sur chaque boîte, ces deux bornes étant considérées comme donnant le moins d'erreurs sur dénombrement final.

Cette étape est suivie d'une culture de 24h à 48h à 37° C au terme de laquelle les colonies sont dénombrées.

Les intervalles de temps entre les prélèvements (toutes les 30mn) ont été choisis pour avoir un maximum de points dans la phase exponentielle de la croissance.

- Technique

Nous avons effectué la technique de l'ensemencement par étalement qui se faisait comme suit :

A chaque espace de temps 100 μ l de suspension étaient prélevés et dilués à une concentration convenable dans 900 μ l d'eau physiologique. Les derniers 100 μ l étaient directement déposés sur la gélose MH, puis dispersés grâce à un étaleur stérile. Lorsque la gélose devenait sèche, les boîtes étaient placées à l'étuve pendant 24h à 37° C. Pour chaque inoculum nous ensemencions 2 boîtes de pétri.

- Expression des résultats

Les résultats sont obtenus en faisant la moyenne du dénombrement de chaque boîte de pétri exprimés en UFC/ml.

II-2-2- Les Streptocoques

- *Préparation de l'inoculum*

A partir de colonies isolées sur de la gélose au sang ordinaire (1 à 2 colonies), nous avons préparé une suspension bactérienne dans du bouillon trypticase soja (10ml) que nous avons incubé pendant 5 heures.

- *Dénombrement bactérien*

A partir de t_0 nous avons prélevé toutes les heures 1,5ml de la suspension bactérienne dont nous avons déterminé la concentration par le dénombrement bactérien sur boîte de pétri, et ce pendant 5h de temps.

Au total nous avons 6 points à étudier : t_0 , $t_1=1h$, $t_2=2h$, $t_3=3h$, $t_4=4h$, $t_5=5h$.

Pour les streptocoques l'ensemencement s'effectuait par étalement des 100 derniers μ l sur de la gélose au sang.

- *Résultat du dénombrement*

Les résultats étaient obtenus en faisant la moyenne du dénombrement de chaque boîte exprimés en UFC/ml.

II-3- ETUDE DE LA SENSIBILITE AVEC LES MICROPLAQUES

Avec les inocula prélevés aux différents intervalles de temps nous avons ensemencé les plaques de sensibilité. Ainsi 5 plaques ont été ensemencées pour la souche de *Staphylococcus aureus*, 5 pour *Staphylococcus epidermidis*, 4 pour *Streptococcus pyogenes*, et 4 pour *Enterococcus faecalis*.

Nous les incubions à 37° C et, nous avons pu procéder à la lecture des plaques toutes les 4 heures pendant 12 heures puis après 24 heures et prévoir le temps au bout duquel nous avons obtenu une meilleure sensibilité des souches aux antibiotiques testés.

a) Principe

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques consistait à ajouter au milieu (inoculum) deux concentrations critiques d'un antibiotique donné. Après une incubation à l'étuve à 37° C, la croissance bactérienne était décelée grâce au virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

b) Mode opératoire

- **Préparation des plaques**

- *Préparation des solutions d'antibiotiques :*

Solution de stock

Principe

Il est basé sur la préparation d'une solution mère 200 fois plus concentrée que la concentration critique supérieure de l'antibiotique dans le solvant considéré.

Pour la préparation, les masses à peser dépendent de l'activité des antibiotiques.

L'activité d'un antibiotique est la quantité de principe actif en g contenu dans 1mg de produit.

$$\text{Quantité à peser (mg)} = \frac{V \text{ (ml)} \times C \text{ (mg/ml)}}{\text{Activité (g/mg)}}$$

Solution de travail :

- **CCS** : Concentration critique supérieure

La solution mère contient la quantité requise de produit pour obtenir, par une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ avec le diluant approprié et une dilution ultérieure au $1/2$ par le milieu utilisé dans la cupule, la CCS.

- **CCI** : Concentration critique inférieure

Elle a été obtenue pour chaque antibiotique en faisant une dilution de la CCS. Pour les antibiotiques choisis, les concentrations à préparer sont répertoriées dans les tableaux suivants :

Pour les antibiotiques choisis, les concentrations à préparer sont répertoriées dans le tableau suivant :

Tableau IV : Préparation des solutions d'antibiotiques pour l'étude de la sensibilité des *Staphylocoques* et *Streptocoques*

Antibiotiques	CCI (g/ml)	CCS (µg/ml)	Conc SM g/l	Vol SM (ml)	Masse à peser (mg)	Solvants diluants	Dilutions CCS / CCI	Cons ST CCS (µg/ml)	Cons ST CCI (µg/ml)	Vol à déshydrater µl
Pénicilline G	0,25	16	3,2	1	3,2	Eau distillée	1/64	32	0,5	80
Ciprofloxacine	1	2	0,4	1	0,4	Eau distillée	1/2	4	2	80
Erythromycine	0,5	1	2	1	2	Eau distillée	1/2	8	2	80
Doxycycline	16	32	6,4	1	6,4	Eau distillée	1/2	64	32	80
Amikacine	4	32	6,4	1	6,4	Eau distillée	1/8	64	8	80
Chloramphénicol	8	16	3,2	1	3,2	Méthanol-eau distillée	1/2	32	16	80
Amoxicilline	4	32	6,4	1	6,4	Tampon phosphate 0,1 M (pH6) eau distillée	1/8	64	8	80

➤ **Déshydratation des plaques**

Après rinçage à l'eau savonneuse, les plaques sont trempées dans l'alcool 70°C pendant 24 heures. Les plaques sont ensuite séchées et stérilisées au four à micro-onde.

Ce sont 80 µl du double de la CCS d'un antibiotique donné et 80 µl de la CCI qui sont distribuées dans les cupules supérieures et inférieures ou opposées.

Les plaques sont ensuite portées à l'étuve pendant 24 heures à 37°C.

Les plaques déshydratées et munies d'un support ont été scellées dans des sachets stériles avec un dessiccateur et gardées à l'abri de la poussière

• **Etude de la sensibilité**

➤ **Préparation du milieu d'étude :**

Nous avons préparé un bouillon AM₃ (Antibiotic Medium 3)

La formule par litre :

Glucose : 1g

Rouge de phénol : 20ml

Eau distillée p : 1000ml

pH 7,4± 0,2

Le bouillon contenant le glucose a été autoclavé à 120° C pendant 15mn. Le rouge de phénol a été ajouté au milieu autoclavé après été stérilisé par filtration.

➤ **L'inoculum**

Du fait du faible taux de l'inoculum aux temps T₀ et T₁, nous avons préféré travailler à partir de T₂=1h de croissance. Nous avons prélevé à chaque intervalle de temps 20µl du bouillon en culture. Ce dernier a été dilué dans 2ml de bouillon AM₃.

➤ **Inoculation de la plaque**

80µl de l'inoculum sont distribués dans chaque cupule.

Les plaques sont ensuite portées à l'étuve pendant 24h à 37° C.

Nous avons recouvert la plaque de papier buvard imbibé d'eau pour éviter la déshydratation du milieu.

NB : Les 2 dernières cupules de la plaque sont les témoins contrôles (TC) .Elles ne contiennent aucun antibiotique. Dans la première cupule nous avons mis 80µl de l'inoculum et dans la dernière 80µl du bouillon.

Ainsi après incubation, le témoin positif (première cupule) va virer : jaune et le témoin négatif garde la couleur du bouillon (rouge)

➤ **Lecture**

Il s'agira de vérifier la croissance ou l'absence de croissance dans les cupules.

Cette croissance nous a permis de catégoriser les souches sensibles, intermédiaires ou résistantes.

Bactérie sensible : absence de virage dans les 2 cupules (CCS et CCI rouges)

Bactérie résistante : virage au jaune dans les 2 cupules

Bactérie intermédiaire : virage seulement au niveau de la CCI, la CCS reste rouge.

Les résultats des plaques sont validés par les témoins positif et négatif.

II-4- ETUDE COMPARATIVE AVEC L'ANTIBIOGRAMME STANDARD OU DIFFUSION EN MILIEU GELOSE

- **Principe**

L'antibiogramme a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques.

Le résultat pratique est la classification du microorganisme dans la catégorie sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R) à chaque antibiotique.

- **Technique**

Des disques de papier buvard imprégné des antibiotiques à tester sont déposés à la surface du milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture.

Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

Pour chaque antibiotique, on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit le profil de sensibilité de la souche étudiée.

➤ Milieu utilisé

Gélose Mueller Hinton

➤ Ensemencement

Nous avons dilué l'inoculum au 1/100^{ème} avant de l'ensemencer par écouvillonnage.

➤ Incubation

A 37° C

➤ Lecture

Après 24h d'incubation

- **Résultats**

La zone d'inhibition est mesurée par le diamètre en mm.

Si le diamètre mesuré est inférieur au diamètre correspondant à la concentration critique supérieure la souche est Résistante.

Si le diamètre mesuré est supérieur au diamètre correspondant à la concentration critique inférieure, la souche est Sensible.

Si le diamètre mesuré est compris entre les diamètres correspondant aux deux concentrations critiques, la souche est de sensibilité intermédiaire.

- **Interprétation des résultats**

Nous avons comparé les profils de sensibilité en plaques avec ceux de l'antibiogramme standard, afin de déterminer l'inoculum qui donne en plaques un profil de sensibilité proche de celui obtenu avec l'antibiogramme standard et ceci dans un intervalle de temps très court.

I- ETUDE DE LA SENSIBILITE EN FONCTION DE L'INOCULUM ET DU TEMPS D'INCUBATION DE LA MICROPLAQUE CSB

I-1- STAPHYLOCOCCUS AUREUS

a) Résultat du dénombrement

Les résultats du dénombrement ont permis de déterminer la taille de l'inoculum, ils sont répertoriés dans le tableau

Tableau V : Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Temps (min)	N (UFC/ml)
0	$4,8 \cdot 10^4$
30	$4,8 \cdot 10^4$
60	$5.7 \cdot 10^5$
90	$2.2 \cdot 10^6$
120	$2.3 \cdot 10^7$
150	$8.8 \cdot 10^8$
180	$1.11 \cdot 10^{10}$

Nous avons observé entre T_0 et $T_1=30mn$ une absence de croissance de la bactérie, cette période correspondait donc au temps de latence de la bactérie. A $T_2=60mn$, elle commençait à se multiplier de façon exponentielle jusqu'à $T_6=180mn$.

b) Résultat des plaques de sensibilité micro- CSB Staph

Les plaquesensemencées à chaque intervalle de temps comme décrit dans le protocole ont donné, après lecture toutes les 4heures d'incubation, les résultats suivants.

En raison de la faiblesse de la taille de l'inoculum aux temps égaux à T_0 et $T_1=30mn$, nous avons préféré démarrer l'étude de la sensibilité à partir de $T_2=60mn$.

Tableau VI : Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus* avec l'inoculum de $5,710^5$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en Heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
PÉNICILLINE G	rouge							
	A		S		S		S	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
AMOXICILLINE	rouge							
	A		S		S		S	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ERYTHROMYCINE	rouge							
	A		S		S		S	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
DOXYCICLINE	rouge							
	A		S		S		S	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
CHLORAMPHENICOL	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
AMIKACINE	rouge							
	A		S		S		S	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
CIPROFLOXACINE	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

CCI : concentration critique inférieure

CCS : concentration critique supérieure

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge : Aberrant (A)

Dès les premières 4 heures, une lecture correcte n'était pas possible, même pour les témoins. Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu des résultats qui nous édifiaient sur le profil de sensibilité de l'espèce.

Elle a été sensible à tous les antibiotiques testés sauf au chloramphénicol et à la Ciprofloxacine pour lesquels nous avons noté un résultat intermédiaire.

Tableau VII : Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus* avec l'inoculum de $2,2 \times 10^6$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ANTIBIOTIQUES								
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge : résultat Aberrant (A)

Après 4 heures d'incubation, aucune lecture n'était possible.

Mais dès 8 heures d'incubation de la microplaque nous avons obtenu un profil de sensibilité similaire à celui de l'inoculum précédent.

Tableau VIII : Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus* avec l'inoculum de $2,310^7$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	ANTIBIOTIQUES							
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune
	A		A		A		A	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge : Aberrant (A)

Dès les premières 4 heures d'incubation, aucune lecture n'était possible.

Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu des résultats qui nous édifiaient sur le profil de sensibilité de l'espèce.

Contrairement aux deux premiers inocula, la souche est devenue sensible à la Ciprofloxacine, mais un résultat incohérent a été noté avec le chloramphénicol.

Tableau IX : Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus* avec l'inoculum de 8,810⁸ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	ANTIBIOTIQUES							
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge : Aberrant (A)

Une lecture cohérente était toujours impossible à 4 heures. Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu des résultats qui nous édifiaient sur le profil de sensibilité de l'espèce.

Elle a été sensible aux antibiotiques testés mais un résultat intermédiaire au chloramphénicol a été noté.

Tableau X : Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus* avec l'inoculum de $1,110^{10}$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure ANTIBIOTIQUES	4		8		12		24	
	PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI
rouge		rouge						
A		S		S		S		
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge : Aberrant (A)

Dès les premières 4 heures d'incubation, une lecture correcte était impossible.

Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu un résultat identique à celui de l'inoculum précédent alors que la population bactérienne a augmenté.

Tableau XI : Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus* avec la méthode de diffusion en milieu gélosé et le E-test

Ces résultats nous ont servi de référence. En les comparant avec ceux de la micro méthode, nous avons pu interpréter ces derniers en fonction de la concordance de leurs résultats.

Antibiotiques	<i>Staphylococcus aureus</i>
Pénicilline G	S
Amoxicilline	S
Erythromycine	S
Doxycycline	S
Chloramphénicol	S
Amikacine	S
Ciprofloxacine	S

Conditions d'interprétation des résultats de la microplaque de sensibilité Micro-CSB
[46]

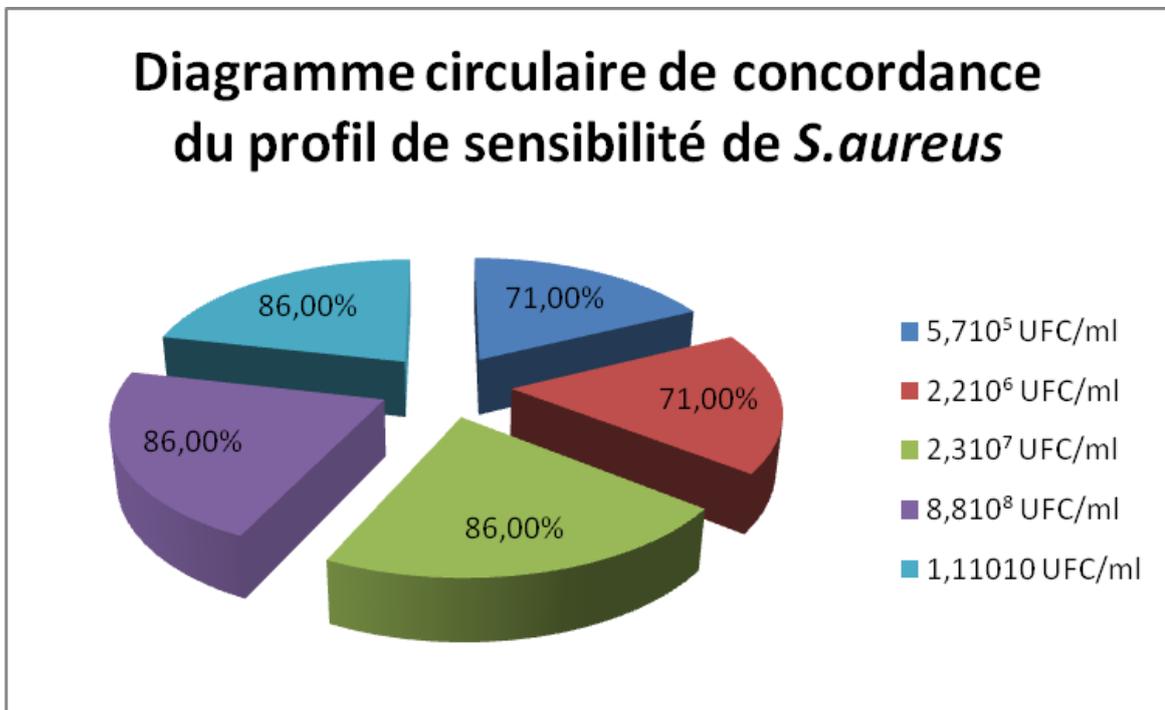
Les conditions d'interprétation des résultats de la plaque étaient les suivantes :

- 99,9 % : excellent résultat
- 99 % : très bon résultat
- 90 % : bon résultat
- 80 % : résultat acceptable,
- < 80 % : résultat inacceptable.

Etant donné que les bons résultats ont été obtenus dès 8 heures d'incubation, nous avons jugé intéressant de les comparer pour tous les inocula au profil de référence.

Tableau XII : Concordance des résultats de la micro méthode avec ceux de l'antibiogramme standard.

Inocula en UFC/ml	$5,710^5$	$2,210^6$	$2,310^7$	$8,810^8$	$1,110^{10}$
Concordance par rapport au profil de référence en %	71	71	86	86	86



Ce diagramme montre que de faibles inocula ($5,710^5$ et $2,210^6$ UFC/ml) ne permettaient pas d'apprécier la sensibilité de *S.aureus* par rapport à ces antibiotiques.

Par contre, les meilleurs profils ont été obtenus avec des inocula plus élevés.

I-2- STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

a) Résultats du dénombrement

Tableau XIII: Dénombrement de *Staphylococcus epidermidis*

Temps (min)	N (UFC/ml)
0	2,97 10 ⁴
30	3 10 ⁴
60	4 10 ⁴
90	8,5 10 ⁴
120	2,7 10 ⁶
150	7,3 10 ⁶
180	4,1 10 ⁷

Entre T₀ et T₁ nous avons observé presque une absence de croissance de la bactérie. Puis elle a commencé à croître faiblement.

Contrairement à *S.aureus* la croissance de *S.epidermidis* était beaucoup plus lente.

b) Résultat des plaques de sensibilité micro- CSB Staph

Les résultats obtenus après lecture toutes les 4 heures nous ont permis de dresser les tableaux suivants en fonction des différents inocula.

Tableau XIV: Profil de sensibilité de *Staphylococcus epidermidis* avec l'inoculum de 410⁴ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ANTIBIOTIQUES								
	PÉNICILLINE G	rouge						
		A	S	S	S	S	S	S
AMOXICILLINE	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
		A	S	S	S	S	S	S
	ERYTHROMYCINE	rouge						
DOXYCICLINE		A	S	S	S	S	S	S
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
		A	I	I	I	I	I	I
CHLORAMPHENICOL		A	I	I	I	I	I	I
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
		A	I	I	I	I	I	I
AMIKACINE		A	S	S	S	S	S	S
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
		A	S	S	S	S	S	S
CIPROFLOXACINE		A	I	I	I	I	I	I
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
		A	I	I	I	I	I	I
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

CCI : concentration critique inférieure

CCS : concentration critique supérieure

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge : Aberrant (A)

A 4 heures, une lecture correcte n'était pas possible. Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, l'espèce a été sensible aux antibiotiques testés sauf à la Doxycycline, au chloramphénicol et à la Ciprofloxacine pour lesquels elle a été intermédiaire.

Tableau XV : Profil de sensibilité de *Staphylococcus epidermidis* avec l'inoculum de 8,510⁴ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ANTIBIOTIQUES								
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge: résultat Aberrant (A)

Dès les premières 4 heures d'incubation, aucune lecture n'était possible, même pour les témoins. Mais dès 8 heures d'incubation de la microplaque nous avons obtenu des résultats qui nous édifiaient sur le profil de sensibilité de l'espèce.

Elle a été sensible aux antibiotiques utilisés à l'exception de la Doxycycline et de la Ciprofloxacine pour lesquelles nous avons noté un résultat intermédiaire.

Tableau XVI : Profil de sensibilité de *Staphylococcus epidermidis* avec l'inoculum de 2,710⁶ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	ANTIBIOTIQUES							
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge : Aberrant (A)

Une lecture cohérente était toujours impossible à 4 heures d'incubation.

Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu des résultats qui nous édifiaient sur le profil de sensibilité de l'espèce : sensible aux antibiotiques testés sauf à la Doxycycline pour laquelle elle a été intermédiaire.

Tableau XVII : Profil de sensibilité de *Staphylococcus epidermidis* avec l'inoculum de $7,3 \times 10^6$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	ANTIBIOTIQUES							
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge: Aberrant (A)

Après 4 heures d'incubation, une lecture correcte n'était pas possible. Mais dès 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu un profil de sensibilité similaire à l'inoculum précédent.

Tableau XVIII : Profil de sensibilité de *Staphylococcus epidermidis* avec l'inoculum de $4,110^7$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ANTIBIOTIQUES								
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI rouge et CCS rouge: Aberrant (A)

Dès les premières 4heures d'incubation, aucune lecture n'était pas possible.

Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu le même résultat que pour les deux inocula précédents, alors que la population bactérienne a considérablement augmenté.

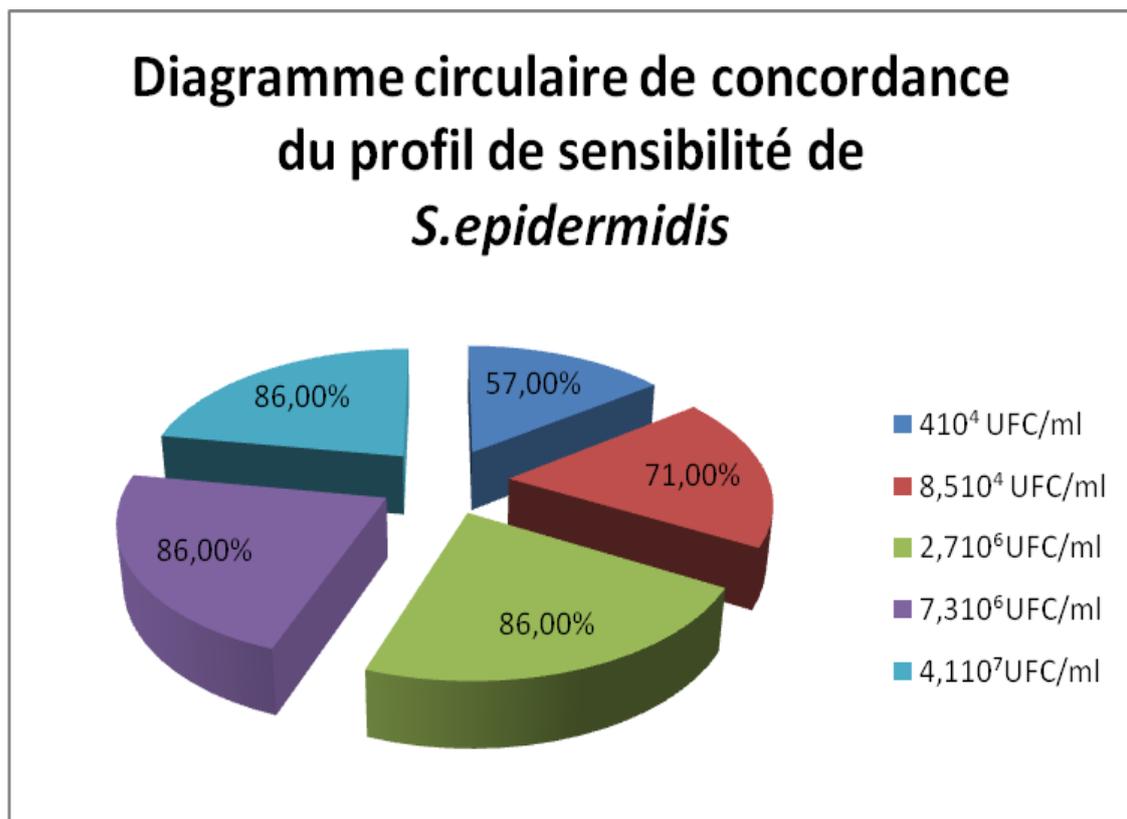
Tableau XIX : Profil de sensibilité de *Staphylococcus epidermidis* avec la méthode de diffusion en milieu gélosé et le E-test

Antibiotiques	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Pénicilline G	S
Amoxicilline	S
Erythromycine	S
Doxycycline	S
Chloramphénicol	S
Amikacine	S
Ciprofloxacine	S

Avec ces résultats qui nous ont servi de référence, nous avons fait une comparaison avec ceux de la micro méthode. Ainsi nous avons interprété ces derniers en fonction de la concordance de leurs résultats.

Tableau XX : Concordance des résultats de la micro méthode avec ceux de l'antibiogramme standard.

Inocula en UFC/ml	410^4	$8,510^4$	$2,710^6$	$7,310^6$	$4,110^7$
Concordance par rapport au profil de référence en %	57	71	86	86	86



Ce diagramme révèle que les inocula de 410^4 et de $8,510^4$ UFC/ml ne permettaient pas d'apprécier la sensibilité de *S. epidermidis* par rapport à ces antibiotiques. Par contre, de meilleurs résultats ont été obtenus avec des inocula plus élevés.

I-3- Streptococcus pyogenes

a) Résultats du dénombrement

D'après des expériences antérieures [47], nous avons constaté que les streptocoques croissaient plus lentement que les staphylocoques ; aussi avons-nous choisi d'augmenter les intervalles de mesure. Les mesures étaient effectuées toutes les heures et ceci pendant cinq heures de temps

Tableau XXI : Dénombrement de *Streptococcus pyogenes*

Temps (min)	N (UFC/ml)
0	3,5 10⁴
60	4 10⁴
120	7,2 10⁵
180	8,9 10⁶
240	2,06 10⁷
300	1,55 10⁸

Comparer aux deux espèces précédentes la croissance de *S.pyogenes* était beaucoup plus lente.

b) Résultat des plaques de sensibilité micro- CSB Strepto

Comme nous l'avons noté dans le protocole, 4 plaques de *S.pyogenes* ont été incubées à l'étuve et la lecture a été faite toutes les 4 heures. Ceci nous a permis d'avoir les résultats répertoriés dans les tableaux suivants.

Tableau XXII : Profil de sensibilité de *Sreptococcus pyogenes* avec un inoculum de $7,210^5$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ANTIBIOTIQUES								
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

CCI : concentration critique inférieure

CCS : concentration critique supérieure

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI et CCS rouge: Aberrant (A)

Une lecture cohérente était impossible à 4 heures, même pour les témoins.

Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu des résultats qui nous édifiaient sur le profil de sensibilité de l'espèce.

En effet l'espèce a été sensible aux antibiotiques testés sauf pour deux : intermédiaire à la Ciprofloxacine et résistante à l'Amoxicilline.

Tableau XXIII : Profil de sensibilité de *Streptococcus pyogenes* avec l'inoculum de $8,9 \times 10^6$ UFC/m

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ANTIBIOTIQUES								
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI et CCS rouge : résultat Aberrant (A)

A 4 heures d'incubation, une lecture correcte n'était pas possible.

Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque nous avons obtenu un profil de sensibilité similaire à l'inoculum précédent malgré l'augmentation de la taille de l'inoculum.

Tableau XXIV : Profil de sensibilité de *Streptococcus pyogenes* avec l'inoculum de $2,0610^7$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	ANTIBIOTIQUES							
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI et CCS rouge : Aberrant (A)

Dès les premières 4 heures d'incubation, une lecture correcte n'était pas possible.

Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu les résultats suivants : l'espèce a été sensible aux antibiotiques utilisés sauf à l'Amoxicilline qui a rencontré une résistante.

Tableau XXV : Profil de sensibilité de *Streptococcus pyogenes* avec l'inoculum de $1,55 \cdot 10^8$ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	ANTIBIOTIQUES							
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI et CCS rouge : Aberrant (A)

Nous avons noté un profil de sensibilité semblable à l'inoculum précédent malgré l'augmentation de la population bactérienne.

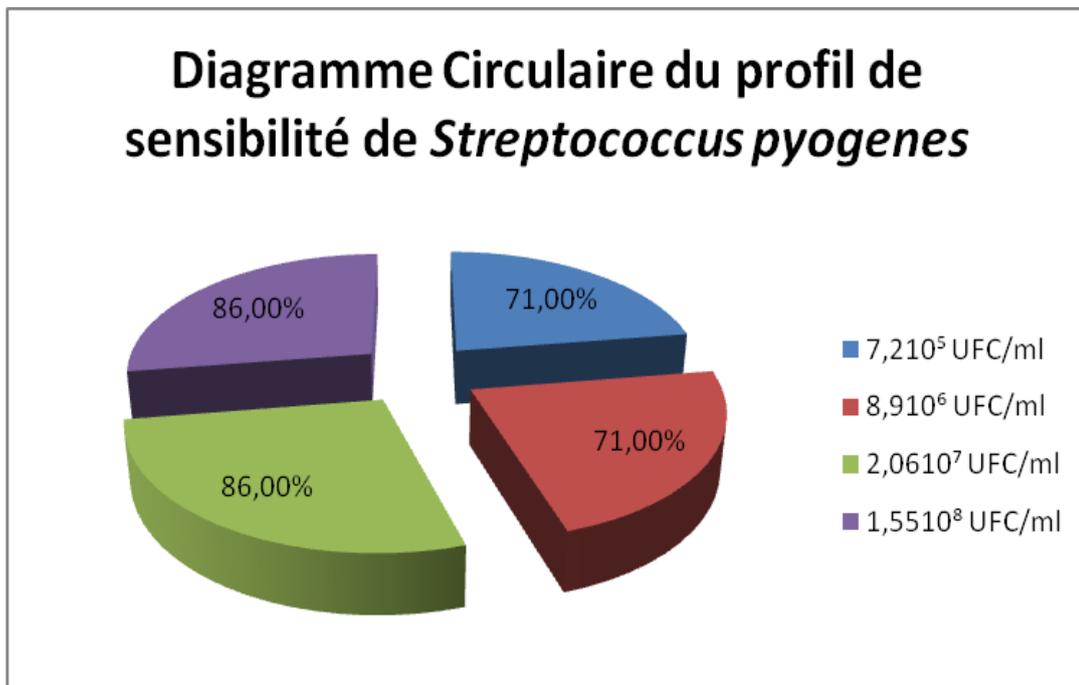
Tableau XXVI : Profil de sensibilité de *Streptococcus pyogenes* avec la méthode de diffusion en milieu gélosé et le E-test

Antibiotiques	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Pénicilline G	S
Amoxicilline	S
Erythromycine	S
Doxycycline	S
Chloramphénicol	S
Amikacine	S
Ciprofloxacine	S

Ces résultats nous ont servi de référence. Ainsi nous avons pu les comparer avec ceux de la micro méthode pour pouvoir interpréter ces derniers en fonction de la concordance de leurs résultats.

Tableau XXVII: Concordance des résultats de la micro méthode avec ceux de l'antibiogramme standard.

Inocula en UFC/ml	7,210 ⁵	8,910 ⁶	2,0610 ⁷	1,5510 ⁸
Concordance par rapport au profil de référence en %	71	71	86	86



Ce diagramme montre que les meilleurs profils ont été obtenus avec les inocula de $2,06 \times 10^7$ et de $1,55 \times 10^8$ UFC/ml. Par contre les inocula de $7,21 \times 10^5$ et de $8,91 \times 10^6$ UFC/ml ne permettaient pas d'apprécier la sensibilité de *S. pyogenes* aux antibiotiques. En somme la sensibilité était acceptable aux inocula de $2,06 \times 10^7$ et de $1,55 \times 10^8$ UFC/ml avec une concordance de 86%. Mais aux inocula de $7,21 \times 10^5$ et de $8,91 \times 10^6$ UFC/ml la sensibilité n'était pas acceptable.

I-4- Enterococcus faecalis

a) Résultats du dénombrement

Tableau XXVIII : Dénombrement d'*Enterococcus faecalis*

Temps (min)	N (UFC/ml)
0	2,8 10⁵
60	3,4 10⁵
120	2,01 10⁶
180	2,6 10⁷
240	3,07 10⁸
300	7,5 10⁹

Par rapport à la croissance de *S. pyogenes*, nous avons constaté que celle d'*Enterococcus faecalis* était beaucoup plus rapide.

b) Résultat des plaques de sensibilité micro- CSB Strepto

Après lecture toutes les 4 heures, nous avons pu obtenir les résultats qui ont été regroupés dans les tableaux suivants.

Tableau XXIX : Profil de sensibilité d'*Enterococcus faecalis* avec un inoculum de 2,0110⁶ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	ANTIBIOTIQUES							
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

CCI : concentration critique inférieure

CCS : concentration critique supérieure

TC : contrôle positif : couleur jaune

 Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI et CCS rouge : Aberrant (A)

Dès les premières 4 heures, une lecture correcte n'était pas possible. Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu des résultats qui nous édifiaient sur le profil de sensibilité de l'espèce.

Elle a été sensible à la pénicilline G, résistante à l'érythromycine et au chloramphénicol, intermédiaire à l'Amikacine.

Par contre nous avons noté quelques discordances pour certains antibiotiques : la souche était résistante à l'Amoxicilline et sensible à la Doxycycline et à la Ciprofloxacine.

Tableau XXX : Profil de sensibilité d'*Enterococcus faecalis* avec l'inoculum de 2,610⁷ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ANTIBIOTIQUES								
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge							
	A		S		S		S	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI et CCS rouge : résultat Aberrant (A)

A 4 heures d'incubation, aucune lecture n'était possible. Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque nous avons obtenu des résultats qui nous édifiaient sur le profil de sensibilité de l'espèce : sensible à la pénicilline G, résistante à l'érythromycine et au chloramphénicol, intermédiaire à l'Amikacine et la Ciprofloxacine.

Mais nous avons remarqué quelques discordances par rapport à certains antibiotiques : l'espèce a été résistante à l'Amoxicilline et sensible à la Doxycycline.

Tableau XXXI : Profil de sensibilité d'*Enterococcus faecalis* avec l'inoculum de 310⁸UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
ANTIBIOTIQUES								
	PÉNICILLINE G							
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune : Aberrant (A)

Une lecture cohérente était toujours impossible à 4 heures. Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu un profil de sensibilité identifiable au profil de référence sauf pour l'Amoxicilline pour laquelle espèce a été résistante.

Tableau XXXII : Profil de sensibilité d'*Enterococcus faecalis* avec l'inoculum de 7,510⁹ UFC/ml

Temps d'incubation de la plaque en heure	4		8		12		24	
	ANTIBIOTIQUES							
PÉNICILLINE G	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
	A		S		S		S	
AMOXICILLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
ERYTHROMYCINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
DOXYCICLINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CHLORAMPHENICOL	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
	A		R		R		R	
AMIKACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
CIPROFLOXACINE	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS	CCI	CCS
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge
	A		I		I		I	
TEMOIN CONTROL	CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
	rouge	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge	jaune	rouge

Légende :

TC : contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : couleur rouge

CCI et CCS : rouge : bactérie sensible (S)

CCI et CCS : jaune : bactérie résistante (R)

CCI jaune et CCS rouge : bactérie intermédiaire (I)

CCI rouge et CCS jaune ; CCI et CCS rouge : Aberrant (A)

A 4 heures d'incubation, une lecture correcte n'était pas possible.

Mais après 8 heures d'incubation de la microplaque, nous avons obtenu des résultats similaires à l'inoculum précédent.

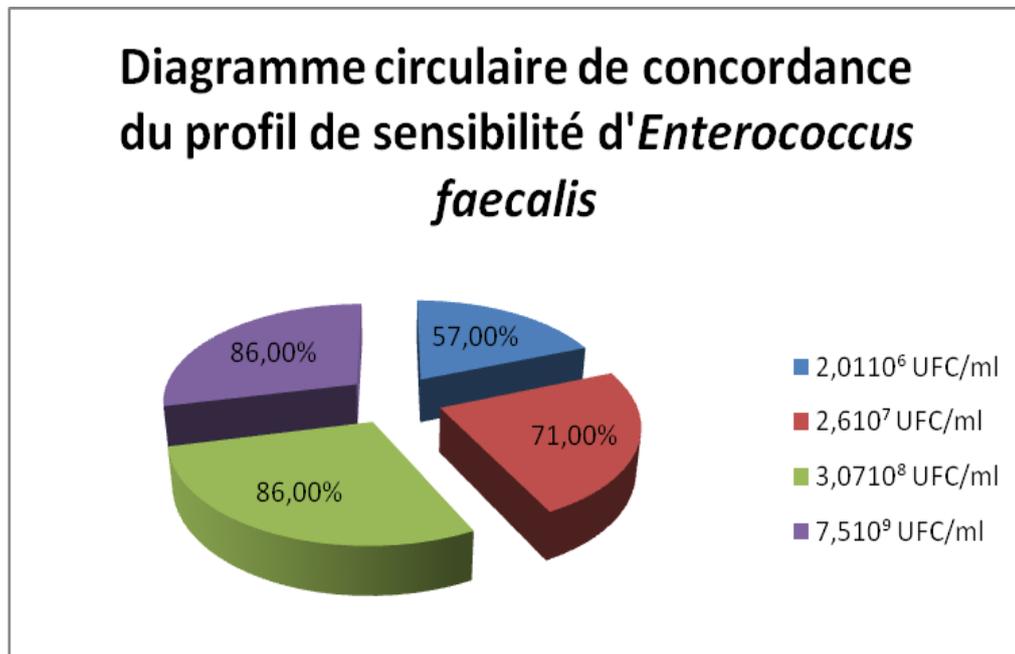
Tableau XXXIII : Profil de sensibilité *d'Enterococcus faecalis*

Antibiotiques	<i>Enterococcus faecalis</i>
Pénicilline G	S
Amoxicilline	S
Erythromycine	R
Doxycycline	I
Chloramphénicol	R
Amikacine	I
Ciprofloxacine	I

Avec ces résultats pris comme référence, nous avons fait comparaison avec ceux de la micro méthode. Ainsi nous avons interprété ces derniers en fonction de la concordance de leurs résultats.

Tableau XXXIV : Concordance des résultats de la micro méthode avec ceux de l'antibiogramme standard.

Inocula en UFC/ml	2,0110 ⁶	2,610 ⁷	3,0710 ⁸	7,510 ⁹
Concordance par rapport au profil de référence en %	57	71	86	86



Ce diagramme montre que de faibles inocula ne permettaient pas d'apprécier la sensibilité d'*Enterococcus faecalis* par rapport aux antibiotiques.

Cependant les inocula de 3,0710⁸ et de 7,510⁹ UFC/ml nous ont permis d'obtenir de bons profils.

II- VALIDATION DE LA METHODE

Etant donné que les meilleurs résultats ont été obtenus après 8h d'incubation des microplaques de sensibilité CSB et du fait de notre objectif fixé à savoir réduire le délai de lecture des plaques, nous avons exploré lors de la validation, les résultats obtenus au bout de 8h d'incubation.

II-1- TRAÇAGE DE LA DROITE DE REGRESSION

La droite de régression est la droite qui minimise la somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et les valeurs théoriques.

Pour prédire cela, il suffit de substituer la valeur de x dans l'équation de la droite de régression et de calculer la valeur de y.

Expression des résultats : traçage de la droite de concordance :

Pour ce faire nous avons déterminé la droite la plus représentative de l'ensemble dont l'équation est de type $y' = ax_i + b$

- où a et b sont des constantes pouvant être calculées à partir des formules suivantes :

$$a = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y}{N} - a \frac{\sum x}{N}$$

- x et y sont des variables

Ce qui nous a permis de calculer le coefficient de corrélation r, par cette formule :

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

r = coefficient de corrélation ; x_i = données observées
 a = pente de la droite ; b = ordonnée à l'origine
 N = nombre de paires (x ; y) utilisées
pour calculer la droite de concordance
 n = concentration inoculum ; C = concordance du profil de sensibilité
par rapport à l'antibiogramme
Standard

Critères d'interprétation de r

$r = 0,2$ à $0,4$: Corrélation faible ou quasi absence de corrélation.
 $r = 0,4$ à $0,6$: Corrélation moyenne.
 $r = 0,6$ à $0,8$: Bonne corrélation.
 $r = 0,8$: Corrélation élevée.
 $r = 1$ où -1 : Corrélation parfaite

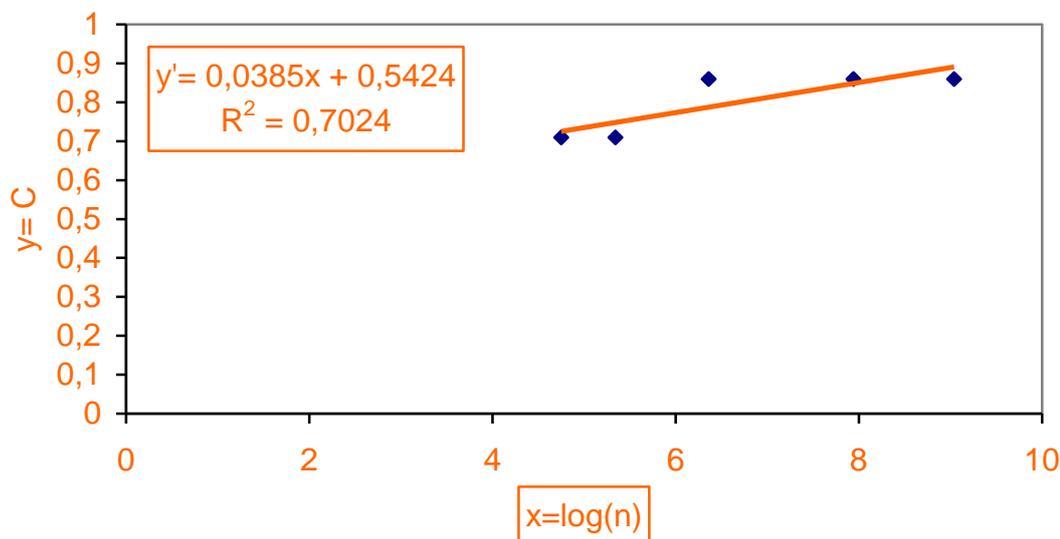
II-1-1- *Stapylococcus aureus*

En appliquant ces formules, nous avons pu dresser le tableau suivant et par conséquent tracer la droite de régression.

Tableau XXXV: Résultats de *S. aureus* à la 8^{ème} heure d'incubation des microplaques CSB staph.

Concentrations inocula (UFC/ml)	5,7.10⁴	2,2.10⁵	2,3.10⁶	8,8.10⁷	1,11.10⁹
Concordance des caractères (%)	71	71	86	86	86
x = log [n]	4,75	5,34	6,36	7,94	9,04
y =C	0,71	0,71	0,86	0,86	0,86
y'	0,72	0,74	0,78	0,85	0,89
a	0,0385				
b	0,5424				
r	0,83				

Figure 2 : Droite de régression de *S. aureus*



La droite de régression montre une bonne corrélation entre la taille de l'inoculum et la concordance du profil de sensibilité avec un coefficient de corrélation $r = 0,83$ et une équation de droite de type $y = 0,0385x + 0,5424$.

Cette corrélation est positive avec une valeur de $a > 0$.

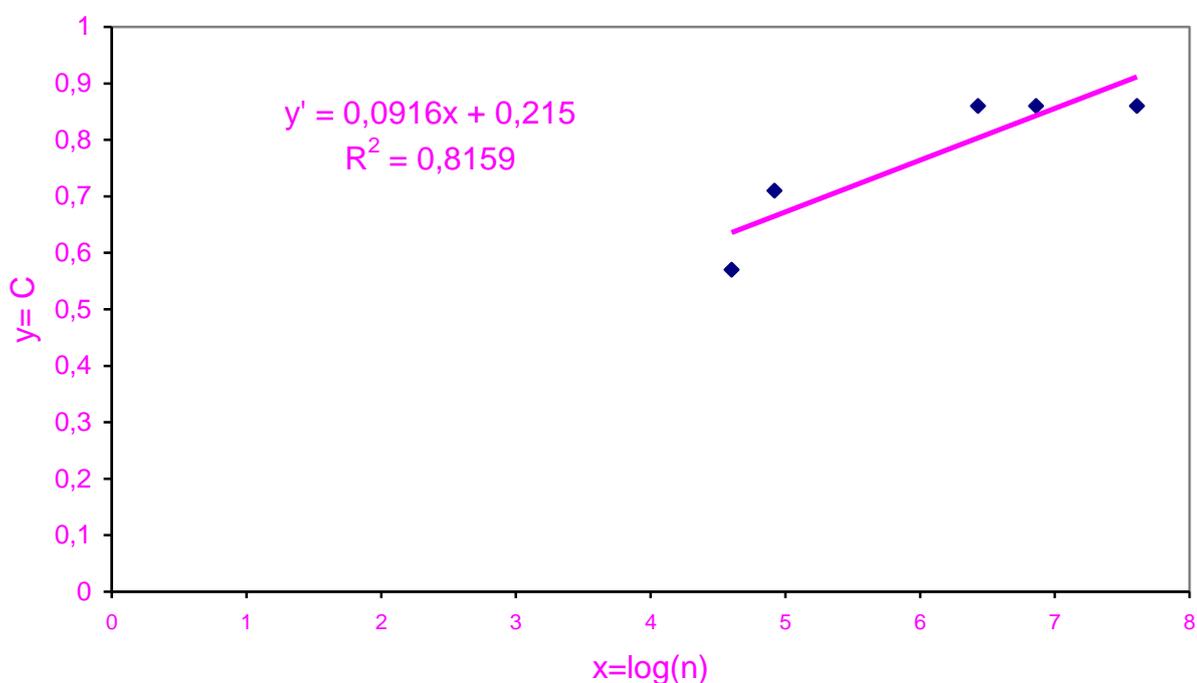
II-1-2- *Staphylococcus epidermidis*

Avec ces formules, nous avons pu dresser le tableau suivant et tracer la droite de régression.

Tableau XXXVI : Résultats de *S. epidermidis* à la 8^{ème} heure d'incubation des microplaques CSB staph.

Concentrations inocula (UFC/ml)	4.10 ⁴	8,5.10 ⁴	2,7.10 ⁶	7,3.10 ⁶	4,1.10 ⁷
Concordance des caractères (%)	57	71	86	86	86
x = log [n]	4,6	4,92	6,43	6,86	7,61
y=C	0,57	0,71	0,86	0,86	0,86
y'	0,63	0,66	0,80	0,84	0,91
a	0,0916				
b	0,215				
r	0,90				

Figure 3: Droite de régression de *S.epidermidis*



La valeur du coefficient de corrélation reflète une excellente corrélation entre les variables à savoir la taille de l'inoculum et la concordance du profil de sensibilité. La valeur de la pente (a) témoigne de la positivité de la corrélation.

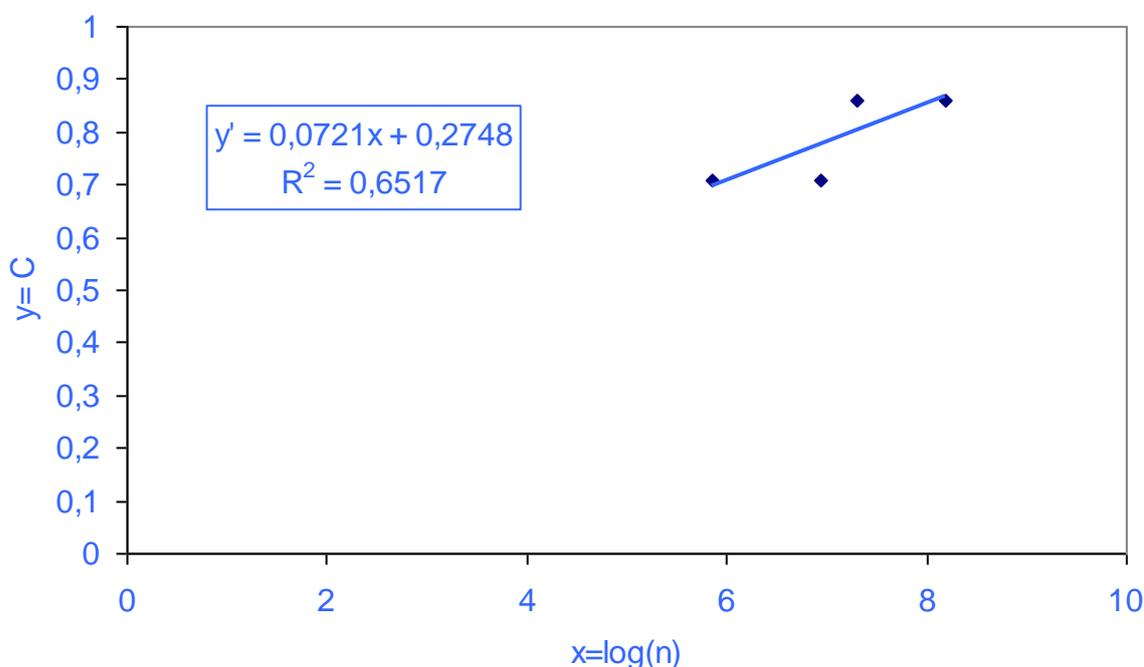
II-1-3- *Streptococcus pyogenes*

Ces formules nous ont permis de dresser ce tableau et par conséquent de tracer la droite de régression.

Tableau XXXVII : Résultats de *S. pyogenes* à la 8^{ème} heure d'incubation de la microplaque CSB strepto.

Concentrations inocula (UFC/ml)	$7,2 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^6$	$2,06 \cdot 10^7$	$1,55 \cdot 10^8$
Concordance des caractères (%)	71	71	86	86
$X = \log [n]$	5,85	6,94	7,31	8,19
$y = C$	0,71	0,71	0,86	0,86
y'	0,70	0,77	0,80	0,86
a	0,072			
b	0,275			
r	0,80			

Figure 4 : Droite de régression de *S.pyogenes*



La valeur du coefficient de corrélation traduit la bonne corrélation des 2 paramètres étudiés, avec une équation de droite de type $y = 0,0721x + 0,2748$ et une pente positive.

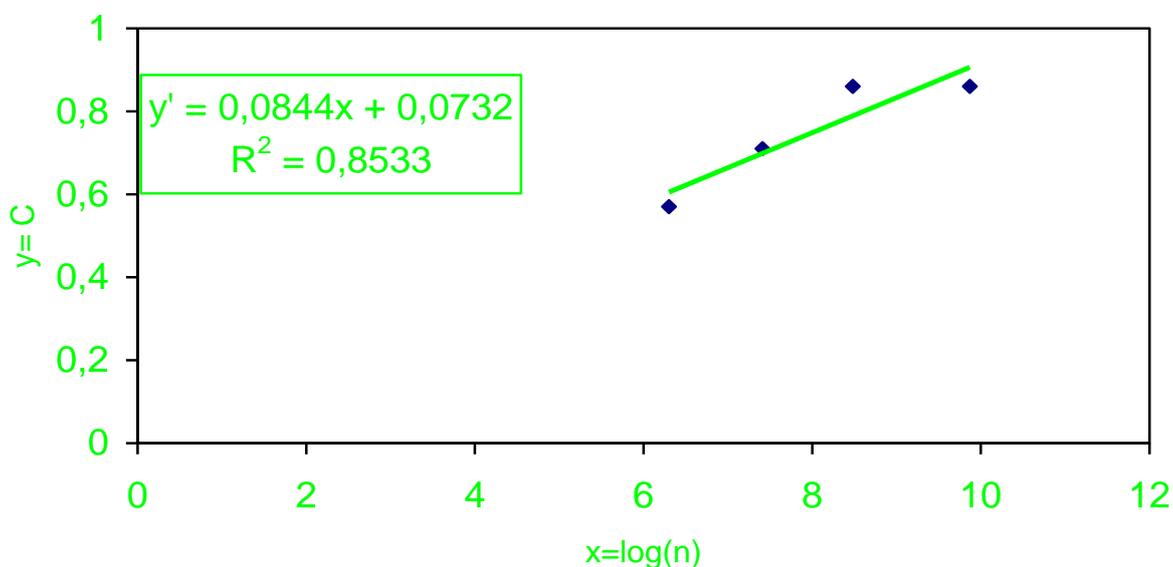
II-1-4- *Enterococcus faecalis*

Ainsi avec ces formules nous, avons pu dresser ce tableau et tracer la droite de régression.

Tableau XXXVIII : Résultats d'*Enterococcus faecalis* a la 8^{ème} heure d'incubation de la microplaque CSB

Concentrations inocula (UFC/ml)	$2,01.10^6$	$2,6.10^7$	3.710^8	$7,5.10^9$
Concordance des caractères (%)	57	71	86	86
$x = \log [n]$	6,3	7,41	8,48	9,87
$y = C$	0,57	0,71	0,86	0,86
y'	0,60	0,70	0,79	0,90
a	0,084			
b	0,0732			
r	0,92			

Figure 5 : Droite de régression de *E.faecalis*



La corrélation entre les 2 paramètres que sont la taille de l'inoculum et la concordance du profil de sensibilité est excellente et positive.

Pour l'ensemble des souches étudiées avec la micro méthode CSB, nous avons observé une bonne corrélation entre la taille de l'inoculum et les bons profils de sensibilité.

Le but de notre travail était de réduire le délai de lecture de la sensibilité de ces souches avec la micro méthode CSB- sensibilité

Ce qui a été possible avec un délai qui est passé de 24 h à 8 h. Nous avons trouvé intéressant de comparer les résultats de cette méthode avec ceux d'autres méthodes à savoir le E-test ou la méthode de diffusion en milieu gélosé pour jauger son efficacité et sa fiabilité.

1- Les souches bactériennes

Notre travail a porté sur des souches préalablement identifiées puis bien conservées à -20°C ou -70°C.

Il était important de nous assurer qu'il s'agissait bien des espèces bactériennes à étudier, d'où la nécessité d'avoir fait une identification sommaire de ces bactéries. Ceci nous a permis d'éviter les souillures qui risquaient de fausser nos résultats.

2- Effet inoculum par l'étude de la croissance

La technique de dénombrement sur boîte de petri est simple et fiable, de mise en œuvre facile et utilisée dans divers travaux antérieurs [15].

Et il est nécessaire de noter que l'effet inoculum a fait l'objet de plusieurs études antérieures à savoir celles de Sow Mame Fatou et de Diao Magatte.

C'est pourquoi nous avons jugé nécessaire de ne pas nous appesantir sur l'étude de la croissance par la méthode de dénombrement.

3- Etude de la sensibilité avec les microplaques CSB-Sensibilité

3-1- Inoculum bactérien

La préparation de l'inoculum bactérien constitue une étape importante dans l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

Le choix de travailler sur une souche pure et jeune était impératif et de standardiser la concentration finale de l'inoculum car comme l'a montré Niasse M F., il y a une variation importante de la sensibilité en fonction de l'inoculum.

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

Notre choix a porté sur le bouillon AM₃. Le glucose, constituant essentiel du milieu est un sucre utilisé pour la plupart des bactéries. Son utilisation par les microorganismes conduit à la production d'acide. Cette production a été mise en évidence par un indicateur coloré le rouge de phénol. Il a permis une lecture facile avec un virage franc (du rouge au jaune) en cas de croissance bactérienne.

La zone de virage du rouge de phénol doit correspondre aux variations du pH du milieu de 6,8 à 8,4.

3-2- Les antibiotiques

Les antibiotiques choisis doivent être stables et actifs au cours des tests.

Les concentrations critiques retenues pour ce ont permis une catégorisation clinique en sensible, intermédiaire et résistante. Les concentrations critiques utilisées sont celles tirées du logiciel whonet V.

Les poudres sont conservées selon les directives du fabricant, elles restent stables jusqu'à leur date de péremption.

Quand aux solutions mères, elles ont été conservées à -20°C pour une conservation à court terme.

Les recommandations de conservation à cette température sont pour une période de 6 semaines, pour l'ampicilline et l'amoxicilline, de 6 mois pour les autres antibiotiques ; et à -70°C pour une longue conservation.

3-3- Temps d'incubation des microplaques CSB-Sensibilité

Les plaques de sensibilité micro-CSB Staph et microCSB Strepto ont été validées par des études de stabilité, d'efficacité et de reproductibilité avant leur utilisation.

➤ Les Staphylocoques

Pour tous les inocula, la lecture après 4h d'incubation n'a rien donné. Ce n'était qu'au bout de 8h d'incubation de ces plaques que nous avons pu faire une lecture correcte de la sensibilité de ces germes.

Avec les inocula de $2,310^7$, $8,810^8$ et $1,110^{10}$ UFC/ml les pourcentages de concordance des résultats du profil de sensibilité obtenus étaient de 86% pour l'espèce de *Staphylococcus aureus*. Ceci en comparaison avec le profil de sensibilité de la méthode de diffusion en milieu gélosé ou le E-test, nous pouvons dire que l'étude de la sensibilité de *S.aureus* était acceptable après 8h d'incubation.

Cependant nous avons noté quelques discordances des résultats des plaques avec certains antibiotiques. En effet l'espèce était intermédiaire au chloramphénicol et à la ciprofloxacine pour les inocula de $5,710^5$ et de $2,210^6$ UFC/ml alors que le profil de sensibilité de la méthode de diffusion en milieu gélosé et le E-test révélait une espèce sensible. Mais pour les derniers inocula où la population bactérienne a augmenté, l'espèce était devenue sensible à la ciprofloxacine.

Nous avons noté aussi des résultats aberrants avec une plaque de sensibilité (le chloramphénicol avec une CCI rouge et une CCS jaune).

Pour l'espèce de *Staphylococcus epidermidis*, les pourcentages de concordance des résultats obtenus aux inocula de $2,710^6$, $7,310^6$ et $4,110^7$ UFC/ml étaient de 86%.

Mais nous avons eu des discordances avec les antibiotiques suivants : la Doxycycline, le chloramphénicol et la ciprofloxacine pour lesquels l'espèce a été intermédiaire.

En somme nous pouvons dire que l'étude de la sensibilité par la microméthode malgré les faibles discordances notées, permettait une bonne lecture de la sensibilité de *S.epidermidis* après 8h d'incubation.

Toutes ces discordances pourraient être expliquées par la présence d'ions dans le milieu utilisé et aux conditions de conservation des solutions mères d'antibiotiques.

La préparation des solutions de travail est très difficile et nécessite beaucoup de calculs pour obtenir la CCI et CCS et les dilutions adéquates ; ceci pourrait être sources d'erreurs de calcul. Certains substrats ou enzymes présents dans les milieux CSB peuvent induire des mutations.

➤ Les Streptocoques

Les pourcentages de concordance des résultats du profil de sensibilité de l'espèce de *Streptococcus pyogenes* en comparaison avec la méthode de diffusion en milieu gélosé et le E-test obtenus aux inocula de $2,0610^7$ et de $1,5510^8$ UFC/ml étaient de 86% ; malgré la discordance notée avec l'amoxicilline pour qui l'espèce était résistante alors qu'avec la méthode de diffusion en milieu gélosé et le E-test l'espèce était sensible.

De même avec *Enterococcus faecalis* les pourcentages de concordance des résultats obtenus aux inocula de $3,0710^8$ et de $7,510^9$ étaient de 86%.

Nous avons aussi noté une discordance : l'espèce était résistante à l'amoxicilline. Comme pour les Staphylocoques, toutes ces discordances ont la même explication.

Durant nos manipulations, nous avons remarqué que les cupules des plaques de sensibilité qui étaient jaunes après une incubation de 8h ont viré (du jaune au rose) avec un dépôt au fond de la cupule après 24h d'incubation.

Nous pourrions penser que les germes après une résistance aux antibiotiques, ils sont finis par alcaliser le milieu.

4- Validation

Pour valider notre méthode nous avons travaillé sur la droite de régression et le coefficient de corrélation. La droite de régression permet d'avoir la droite la plus représentative de l'ensemble des points.

La valeur du coefficient de corrélation reflète une bonne linéarité entre les deux variables x et y.

En se basant sur la valeur des pentes (a) trouvées pour les différentes droites, nous pouvons dire que la corrélation était positive entre les paramètres étudiés.

S.aureus a = 0,0385

S.epidermidis a = 0,0916

S.pyogenes a = 0,072

E.faecalis a = 0,084

La valeur des coefficients de corrélation trouvée permettait de dire que les corrélations étaient parfaites. Elle permettait également de conclure que la relation entre les deux variables était bien linéaire dans la mesure où le coefficient de corrélation r est proche de 1

S.aureus r = 0,83

S.epidermidis r = 0,90

S.pyogenes r = 0,80

E.faecalis r = 0,92

En pratique l'établissement de courbes de concordance présente ses propres exigences et difficultés.

Lorsque les données ne sont pas parfaitement alignées, ça ne signifie pas que la droite trouvée est à rejeter. La prise de données n'est jamais faite dans des conditions idéales. Nous devons considérer que des facteurs sont hors de notre contrôle, précision de l'appareil de mesure, température, etc., qui influence les résultats obtenus.

Par conséquent nous pouvons conclure, compte tenu des valeurs obtenues, que la méthode était fiable et valide.

Les infections bactériennes dues aux Staphylocoques et aux Streptocoques, si diverses dans leurs manifestations cliniques sont parmi les plus fréquentes.

Les Staphylocoques sont des commensaux ubiquitaires de la peau et des muqueuses et sont aussi responsables d'infections sévères locales systémiques.

Les Streptocoques sont fréquemment isolée des infections de la sphère ORL et cutanées.

Les entérocoques sont présent un peu partout dans l'organisme et principalement au niveau du tractus intestinal.

L'existence de souches multi résistantes et l'apparition de nouvelles résistances posent de sérieux problèmes pour le choix du traitement des infections causées par ces germes.

Aussi, la réalisation préalable d'un antibiogramme s'avère d'une grande importance avant tout traitement antibiotique.

De nombreuses méthodes d'étude in vitro de la sensibilité sont en effet actuellement disponibles (diffusion en milieu gélosé, le E-test, système effectuant une analyse cinétique de la croissance, dilution en bouillon), mais sont le plus souvent trop onéreuses pour les structures sanitaires de nos pays en voie de développement.

C'est dans ce contexte que des études ont été menées au laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec depuis quelques années et ont permis la mise au point de micro méthodes d'étude de la sensibilité des bactéries : les micro-CSB Sensibilité.

Ces méthodes utilisent un indicateur coloré (le rouge de phénol) pour détecter la croissance des bactéries assimilant le glucose contenue dans les cupules des microplaques et ce, en présence de deux concentrations : une concentration critique supérieure (CCS) et une concentration critique inférieure (CCI).

Les plaques étaient incubées pendant 24h et la lecture était faite toutes les 4heures pour déceler une croissance bactérienne grâce au virage de l'indicateur coloré. Ceci avait permis de classer la souche dans les catégories :

- Sensible : si la croissance est inhibée aux deux concentrations critiques
- Résistante : s'il y a eu croissance bactérienne aux deux concentrations critiques de l'antibiotique
- Intermédiaire : s'il y a eu croissance au niveau de la concentration critique inférieure et une inhibition de cette croissance avec la concentration critique supérieure.

Des travaux antérieurs ont montré l'efficacité et la fiabilité de ces microplaques.

De plus, elles sont nettement de moindre coût par rapport aux autres méthodes. Mais elles étaient toujours à un délai de lecture de 24h.

Afin de contribuer à la réduction du temps d'incubation, nous avons proposé une technique donnant de bons résultats de sensibilité et ce par variation de la taille de l'inoculum.

Cette étude a eu lieu à Dakar entre octobre 2007 et juin 2008. Elle a porté sur quatre souches :

- *Staphylococcus aureus ATCC2913*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Enterococcus faecalis*

Nous avons étudié la croissance par la méthode du dénombrement sur boîte de pétri et testé le comportement de ces quatre souches vis-à-vis de sept antibiotiques :

- La pénicilline G
- L'amoxicilline
- L'erythromycine
- La doxycycline
- L'amikacine
- Le chloramphénicol
- La ciprofloxacine

Les résultats de notre étude du profil de sensibilité ont été comparés à ceux de l'antibiogramme standard ou diffusion en milieu gélosé et à ceux du E-test, afin de prouver la fiabilité des résultats de notre micro méthode.

L'étude a montré que la sensibilité de ces germes pourrait être déterminée avec la micro méthode CSB seulement après 8heures d'incubation et avec de bons résultats.

Néanmoins elle aurait pu être plus exhaustive avec une phase d'évaluation et cela fera l'objet d'autres recherches par :

- l'utilisation d'un grand nombre de souches
- La réalisation de la même étude pour les autres types de micro-CSB Sensibilité : Enterobactéries, Bacilles gram négatif non fermentaires

Une étroite collaboration entre pharmaciens, cliniciens et biologistes, la diffusion et l'échange d'informations ainsi que la confrontation des résultats sont indispensables pour un choix judicieux des traitements antibiotiques, ce qui permettrait de limiter l'émergence et la diffusion des souches multirésistantes et de préciser les molécules les plus actives.

- 1- ACAR T., SWIFT R., MCKIE J., QUENTIN CL.**
Sensibilité des bactéries aux antibiotiques: évaluation d'une méthode automatisée.
Path. Bio. , 1978, 26 (2) : 137-144.
- 2- AVRIL J.L. , DABENATH., DENIS F., MONTEIL H.**
Mycoplasma – ureaplasma
Bactériologie clinique.
Edition Ellipses, Paris, 1988, 39: 481-491.
- 3- BAC (British Society of Antimicrobial Chemotherapy)**
Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing
Disponible sur le site [http: // www bsac.org.uk/cliquer sur le lien Susceptibility Testing consulté le](http://www.bsac.org.uk/cliquer_sur_le_lien_Susceptibility_Testing_consulté_le).
- 4- BALLE. B.**
Micro méthode d'étude in vitro de la sensibilité aux antibiotiques de mycoplasmes urogénitaux.
Thèse pharm.,UCAD, Dakar, 1999 N°48.
- 5- BANNERMAN L.T, KLEEMAN K.T, and KLOSS W.E.**
Evaluation of the Vitek System Gram positive identification of coagulase negative Staphylococci.
J.clin. Microbiol. , 1993, 31(5) : 1322-1325.
- 6- BASSEL, MAKKAR A.R, REINER D., BALZER J.L and PINCUS D**
Rapid. Automated identification of gram positive cocci with the vitek O₂ system
Clin. Microbiol. Inf, 1997, 3 (suppl.2) : 53.
- 7- BERCHE P., GAILLARD J.L, SIMONET M.**
Mesure de l'activité antibactérienne des antibiotiques
Bactériologie : Bactéries des infections humaines
Paris, Medecine- Science, Flammarion 1988 ; 593-600.

8- BREAND S.

Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température où de pH

Thèse Lyon, Université de Claude Bernard N° 0089, 1998.

9- BURNICHON N. et TEXIER A.

DES bactériologie : Semestre été 2003

Exposé du 20 juin 2003.

10- CHABBERT

Techniques en bactériologie, vol 3 : sérologie bactérienne, antibiotiques en bactériologie médicale

Flammarion Médecine- Science, Paris, 1972.

11- Comité d'expertise de la Standardisation biologique.

1977 28^{ème} rapport série des rapports techniques N°610, OMS, Genève.

12- COURVALIN P.

Interpretative reading of antimicrobial Susceptibility tests.

ASM News, 1992, 58.

13- COURVALIN P., GOLDSTEIN F., PHILIPPON A., SIROT J.

Fiches techniques d'étude pratique des antibiotiques n°4

1^{ère} Edition, Paris, Mpc vit, 1985 : 177- 188.

14- CORVAGLIA A. R.

Rôle des résidus d'antibiotiques dans les environnements hydriques sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aéromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*.

Thèse Dr ès sciences n°3796, mention biologique 2006.

15- Delignette M. L.

Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes

Thèse Lyon n°118, 1995.

16- DIAO M.

L'effet inoculum dans l'étude de la sensibilité in vitro des Staphylocoques aux antibiotiques

Thèse pharm., UCAD, Dakar, 2007, n°97.

17- Diop A.

Validation de méthodes de contrôle microbiologique de différents médicaments antiseptiques

Thèse pharm., UCAD, Dakar, 2003, n°44 : 57-61.

18- DRAME B.

Micro méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries, intérêts thérapeutiques et diagnostiques

Thèse pharm., UCAD : 2001, N°86.

19- DRUGEON H.B, COURTIEU A.L

Techniques semi-automatisées où automatisées

Eds bactériologie médicale : Techniques usuelles,

Paris, SIMEP, 1987,245-247.

20- DUVAL J.

Classification et Mécanisme d'action des agents antibactériens.

Eds bactériologie médicale,

Paris, Médecine- sciences, flammariion, 1989,273-296.

21- ESKA

Précis de bactériologie clinique

2000, 40 : 806p.

22- FERRON A.

Bactériologie médicale

Editions C. et R. 1984, (3,14,15) : 32-166.

23- FLEURETTE J.

Staphylocoques et Microcoques dans le Minor L. VERON
Bactériologie médicale 2^e tirage, 1984 ; 30 : 509-526.

24- FLEURETTE J.

Staphylocoques et Microcoques dans le Minor L. VERON.
Bactério-Med. Flam. Med. Science, 1^{er} éd. 1982: 773-792.

25- HORODNICEAU T.

Streptococaceae
Bactériologie médicale, 1984; 31: 529-548.

26- JAWETZ E., Melnick J. L., Adelberg E. A.

The Growth, Survival & Death of Micro- organisms.
Review of Medical Microbiology, 1987; 5: 66-70.

27- Kenneth Todar University Wisconsin Madison

Department of Bactérial Population,
Rev. 2002: 1-7.

28- KLOSS W. E., and BANNERMANT L.

Update on clinical significance of coagulase negative Staphylococci
J. clin Microbial, Rev. 1994; 7(1) 117-140.

29- KLOSS W. E. and LAMBE JR D. W.

Staphylococcus
In Manual of clinical Microbiology, 4th éd., 1981: 222-235.

30- KLOSS W. E. and WOLFSHOHL J. F.

Identification of *Staphylococcus* species with the api Staph. Ident. System
J. clin Microbial, 1982; 16 (3) : 509-516.

31- KONATE B.

Micro méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des Staphylocoques, Enterocoques et Streptocoques.

Intérêt et application dans le diagnostic rapide des infections microbiennes.

Thèse pharm., UCAD, Dakar, 2004, N°54.

32- KOSEKI S., YAMAMOTO K.

Modeling the bacterial survival / death interface induced by high pressure processing

Food Microbiol. 2007 May 1, 1116(1) : 136-143.

33- MARCHAL N., BOUDON J. L., RICHARD C. L.

Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.

DOINS Editeurs, 1987.

34- MARMONIER A. A.

Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques.

Dans Carbonelles B. et coll. Bactériologie médicale techniques usuelles

Paris, SIMEP, 1987 :227-237.

35- Meekin M.C et al. 1992

Predictive Microbiology : Theory and Application International journal of food.

Microbiology, 1997 oct-Dec: 541-9.

36- Microméthodes d'identification et étude de la sensibilité des Staphylocoques, Enterocoques et Streptocoques.

Intérêt et Application dans le diagnostic rapide infections microbiennes

Thèse pharm., UCAD, Dakar, 2001 n°100 : 3-32.

37- MONZER H., FOUAD D., DANIEL I.

Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques

Etude sur 4ans (1998-2001) dans le nord Liban.

38- MUSSO D.

Sensibilité des Staphylocoques aux antibiotiques et traitement des Staphylococcies

Medit. Med., 1993, 9 : 22-24.

39- NIASSE M.F.

Etude de l'effet inoculum sur la variation de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

Thèse pharm., UCAD, Dakar, 1993, n°17.

40- NNOCHIRI E.

An Introduction to medical Microbiology

Medical Microbiology in the Tropics, 1975 ; 1 : 10-15.

41- POTEL G., BARON D.

Infections à Staphylocoques

EMS, Mal. Infection, 8001 A 10, 1990: 18p.

42- Pr Avril J.L. – Pr MONTEIL H.

Bactériol. Clinique

3^e édition, 2000 [1, 2] : 6-39.

43-SARR T.

Algorithme d'identification des Staphylocoques à coagulase négative et des Streptocoques non groupables

Thèse pharm., UCAD, Dakar n°27, 2004.

44-SECK K.

Micro méthode d'étude in vitro de la sensibilité aux antibiotiques des Mycoplasmes des Staphylocoques et des Entérobactéries

Thèse pharm., UCAD, Dakar, 2004 n°54.

45-SIROT J.

Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques in vitro
In L. LEMINOR et VERON :
bactériologie médicale, 2^{ème} éd., Flammarion, Paris, 1990.

46-SOUSSY C.J.

Antibiotiques, Generalités. In : J FRENEY, F. RENAUD, W. HANSEN et C. ROLLET
Précis de bactériologie cliniques, éditions ESKA, Paris, 2000.

47-SOW M. F.

Utilisation des méthodes biométriques pour la validation de l'identification des cocci à Gram positif
Thèse pharm., UCAD, Dakar, 2007, n°48.

48-Standards Unit, Evaluation and Standards Laboratory Specialist and Reference Microbiology Divion.

Identification of *Staphylococcus* Species, *Micrococcus* Species and *Stomatococcus* Species
BSOPID 7: 4-5.

49-VASSAUT A., MOLLARD J.F., NAUDIN C., DUMONT G., AZZEDINE M.C., BAILLY M. et coll.

Definition et description d'une technique de validation (document C)
Ann. Biol. Clin, 1986, 44 : 746-55.

50-VERON M.

Croissance et nutrition bactériennes
Bactériologie médicale, 1984 ; 2 : 22-28.