

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide Ribonucléique
AN	: Amikacine
AM	: Ampicilline
ATCC	: American Type Culture Collection
BMR	: Bactéries Multirésistantes
CA²⁺	: Ion Calcium
CASFM	: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
C₁G	: Céphalosporines de Première Génération
C₂G	: Céphalosporines de Deuxième Génération
CAZ	: Ceftazidime
CCI(c)	: Concentration Critique Inferieure
CCS(C)	: Concentration Critique Supérieure
CIP	: Ciprofloxacin
CL	: Colistine
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CRO	: Ceftriaxone

CTX	: Cefotaxime
Cv	: Coefficient de variation
E	: Erythromycine
E-Test	: Epsilometer test
EUCAST	: European Committee on antimicrobial susceptibility Testing
GM	: Gentamicine
HALD	: Hôpital Aristide Le Dantec
IMP	: Imipénème
LVX	: Lévofoxacine
m	: Moyenne
Mg²⁺	: Ion Magnesium
MH	: Mueller Hinton
PEN	: Pénicilline G
S	: Ecart Type
SARM	: <i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méthicilline
TE	: Tétracycline
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop
UFC	: Unité Formant Colonie
V	: Variance
VR	: Valeurs de Référence

Table des matières

INTRODUCTION	4
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I RAPPELS SUR LES ANTIBIOTIQUES	6
I.1 Définition.....	6
I.2 Classification	6
I.3 Mécanismes d'action	8
I.4 Résistance aux antibiotiques.....	9
II METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....	11
II.1 Méthodes de diffusion en milieu solide.....	11
II.2 Techniques de dilutions	13
II.3 Méthodes automatiques	16
III NOTIONS DE LA VALIDATION.....	17
III.1 Exactitude ou justesse	17
III.2 Fidélité	17
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL	21
I RAPPEL DES OBJECTIFS.....	22
II CADRE DE L'ETUDE.....	22
III SOUCHES BACTERIENNES.....	22
IV MATERIELS UTILISES	23
IV.1 Matériels pour l'antibiogramme standard.....	23
IV.2 Matériels pour la détermination de la CMI.....	24
V METHODES.....	24
V.1 Technique de diffusion sur gélose: préparation des disques d'antibiotiques	24
V.2 Technique de dilution : préparation de test pour l'étude de la CMI.....	27

VI	RESULTATS	30
VI.1	METHODE DE DIFFUSION SUR GELOSE.....	30
VI.2	METHODE DE DILUTION.....	33
VII	DISCUSSION	35
	CONCLUSION.....	37
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	38
	RESUME	39

Liste des tables

Table I : Mécanismes d'action des antibiotiques .	9
Table II : Liste des solvants et diluants pour chaque antibiotique.....	25
Table III : Concentrations finales des antibiotiques et charge des disques.	26
Table IV : Résultats pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213.	30
Table V : Résultats pour <i>E. coli</i> ATCC 25922.	31
Table VI : Résultats pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	32
Table VII : Résultats antibiogramme pour <i>E. faecalis</i> ATCC 29212.....	32
Table VIII : Résultats CMI pour <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.	33
Table IX : Résultats CMI pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	34

Listes des figures

Figure 1 : Antibiogramme standard	12
Figure 2 : Technique diffusion par bandelette E-test.....	13
Figure 3 : Technique de dilution en milieu liquide par Micro-méthode	14
Figure 4 : Appareil de Steers	15
Figure 5 : Détermination de la CMI en milieu solide.....	15
Figure 6 : Automate Vitek 2 (Biomérieux®).....	16
Figure 7 : Fidélité et exactitude d'une Technique	18
Figure 8 : Microplaque.....	28

INTRODUCTION

Depuis les années 1940, l'antibiothérapie a complètement révolutionné la médecine avec une réduction significative de la mortalité associée aux maladies infectieuses. Malheureusement, la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement. L'antibiorésistance constitue un phénomène naturel, mais le mésusage des antibiotiques chez l'homme et l'animal accélère ce processus. De même, plus de 50% des antibiotiques prescrits seraient inappropriés, favorisant ainsi le développement de cette résistance [1,6]. D'où la recommandation de l'OMS d'utiliser de manière rationnelle les antibiotiques pour limiter la propagation de bactéries résistantes en administrant une molécule active à la dose adéquate.

Ainsi, la détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries était primordiale. A ce jour, il existe plusieurs méthodes pour étudier la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques.

La méthode de diffusion en milieu solide et celle de dilution en milieu liquide étaient classiquement utilisées. La première technique permet de mesurer les diamètres des zones d'inhibition et la seconde permet de déterminer la CMI afin de catégoriser la souche (sensible, intermédiaire ou résistante) vis-à-vis des antibiotiques [10].

Les structures de santé sont souvent confrontées à des ruptures de réactifs, en particulier les disques d'antibiotiques pour la réalisation des antibiogrammes. De plus les bandelettes E-test permettant de réaliser la CMI sur gélose coûtent chères et ne sont pas accessibles à nos laboratoires à ressources limitées.

De ce fait, les laboratoires étaient confrontés à des problèmes pour réaliser les antibiogrammes des souches isolées en routine.

C'était dans ce contexte que nous avons mené ce travail dont l'objectif général était de produire des disques imprégnés d'antibiotiques et des solutions d'antibiotiques pour valider les techniques de diffusion en milieux solide et liquide.

Les objectifs spécifiques étaient :

- De préparer des disques imprégnés d'antibiotiques pour la réalisation de l'antibiogramme de manière artisanale
- De déterminer la CMI avec des solutions déshydratées d'antibiotiques
- De valider les techniques de diffusion en milieux solide et liquide

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I RAPPELS SUR LES ANTIBIOTIQUES

I.1 Définition

Les antibiotiques sont des substances naturelles, synthétiques ou semi synthétiques qui à faibles concentrations, agissent sur d'autres bactéries sans être toxiques pour autant pour les cellules humaines. Ceci s'explique par une très grande spécificité d'action sur certains sites cellulaires. Le premier antibiotique isolé, la pénicilline G, a été découverte fortuitement en 1928 à partir d'une moisissure dans une culture de laboratoire, par Sir Alexander Fleming et utilisée comme médicament en 1941. Des lors, de nombreux antibiotiques furent découverts et le rôle de l'industrie pharmaceutique devint de plus en plus important, tant dans les phases initiales de découverte de nouvelles molécules que dans les développements en laboratoire. L'antibiotique agit soit par effet bactéricide (bactérie tuée), soit par effet bactériostatique (croissance inhibée) [12].

I.2 Classification

On distingue plusieurs familles d'antibiotiques. Ces familles se différencient par leur structure chimique, leur spectre d'activité et leur mode d'action [13].

I.2.1 Famille des bêta-lactamines

Les bêta-lactamines sont bactéricides et peu toxiques. Elles représentent à elle seule environ 50% des antibiotiques disponibles sur le marché [4].

Cette famille comprend :

- Les pénicillines : ce sont les premiers antibiotiques qui ont été découverts. Elles étaient souvent utilisées dans le traitement des infections respiratoires, de l'appareil digestif ou urinaire, des voies génitales, des gencives et des dents.
- Les céphalosporines : elles ont un mécanisme d'action proche des pénicillines et il existe plusieurs générations. Elles sont utilisées le plus souvent pour dans le traitement des infections respiratoires et celles de l'appareil urinaire.
- Les carbapénèmes : ils sont utilisés le plus souvent en milieu hospitalier contre les bactéries ayant acquis une résistance aux céphalosporines [13].

I.2.2 Famille des cyclines

Ce sont des antibiotiques qui agissent sur plusieurs germes notamment les bactéries intracellulaires (ex : *Chlamydia* et *Mycoplasma*) en inhibant la synthèse de leurs protéines. Elles sont utilisées dans le traitement des infections respiratoires, génitales et contre l'acné. Elles peuvent être responsables d'allergie grave et sont contre indiquées à partir du 4^{ème} mois de la grossesse [13].

I.2.3 Famille des aminosides

Ils sont très efficaces contre les staphylocoques alors que les streptocoques montrent une résistance naturelle vis-à-vis de cette famille. Cette famille est utilisée dans les infections urinaires et rénales par voie injectable, mais peut être toxique pour l'oreille interne ou les reins en cas de surdose ou d'insuffisance rénale préexistante [13].

I.2.4 Famille des macrolides

Les macrolides sont divisés en trois générations et agissent le plus souvent sur les bactéries à Gram positif. Ils altèrent la synthèse protéique des bactéries et sont bactériostatiques. Ils sont utilisés dans le traitement des infections respiratoires, génitales et buccales [13].

I.2.5 Famille des fluoroquinolones

Cette famille est divisée en quatre générations. Elles empêchent la réplication de l'ADN et sont utilisées dans le traitement des infections respiratoires, génitales, urinaires et intestinales [13].

I.2.6 Famille des glycopeptides

Les glycopeptides, en monothérapie ou en association, sont les antibiotiques de référence pour le traitement des endocardites à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). Le traitement des infections sévères nécessitent des posologies élevées [13].

I.3 Mécanismes d'action

Les antibiotiques doivent avoir une cible spécifique aux cellules procaryotes pour être sans danger pour le patient.

Les mécanismes utilisés par les antibiotiques sont les suivants :

- *Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne* : la plupart des antibiotiques agissant sur la paroi des bactéries sont en réalité des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, polymère formant la paroi des bactéries. Ils cassent alors cette paroi pour tuer la bactérie. Parmi ces antibiotiques, il y'a les β -lactamines, les glycopeptides et les fosfomycines.
- *Attaque des membranes bactériennes* : la polymyxine B et la colistine sont deux antibiotiques qui agissent sur la membrane, en perturbant la synthèse de celle-ci. Ils sont actifs sur les bacilles à gram négatif.
- *Inhibition de la synthèse protéique* : elle concerne les tétracyclines, les aminosides, le chloramphénicol, les macrolides, l'acide fusidique, le linézolide. Ces derniers se fixent sur des constituants spécifiques du ribosome bactérien empêchant ou gênant ainsi la traduction des ARNm donc arrêt de la synthèse de nouvelles protéines.
- *Perturbation de la synthèse des acides nucléiques (ARN et ADN) ou de leurs fonctionnements* : les rifampicines, les sulfamides, les quinolones et le triméthoprim inhibent la synthèse ou même le fonctionnement des acides nucléiques de différentes manières selon les familles d'antibiotiques :
 - inhibition de la réplication de l'ADN
 - inhibition de la transcription / ARN polymérase
 - diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques
- *Inhibition d'une voie métabolique* : elle doit être essentielle chez la bactérie, mais absente chez l'hôte. Un analogue chimique compétitif pour une réaction enzymatique bactérienne était souvent utilisé [8].

Table I: Mécanismes d'action des antibiotiques [11].

Mécanismes d'action	Familles d'antibiotiques
Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, daptomycines, monobactames, glycopeptides.
Inhibition de la synthèse protéique	Tétracyclines, aminoglycosides, oxazolidonones, streptogramines, ketolides, macrolides, lincosamides.
Inhibition de la synthèse de l'ADN	Fluoroquinolones
Inhibition compétitive de la synthèse de l'acide folique (folates)	Sulfonamides, trimethoprim
Inhibition de la synthèse de l'ARN	Rifampine

I.4 Résistance aux antibiotiques

Il existe deux types de résistance bactérienne : la résistance naturelle et la résistance acquise.

I.4.1 Résistance naturelle

La résistance naturelle d'une espèce ou d'un genre est :

- une caractéristique propre, concernant l'ensemble des souches de l'espèce ou du genre portée par un chromosome donc toujours transmissible à la descendance : c'est la transmission verticale,
- un caractère permettant de définir le phénotype sauvage ou sensible de l'espèce,
- une aide à l'identification d'une espèce : *K. pneumoniae* est naturellement résistante aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline et pipéracilline) par production d'une bêta-lactamase chromosomique de classe A [9].

I.4.2 Résistance acquise

Lorsque les bactéries sont soumises à des traitements antibiotiques, elles finissent par développer des résistances contre des antibiotiques auxquels elles étaient auparavant sensibles : on parle de résistance acquise.

Ces résistances sont dues, soit à la mutation du patrimoine génétique de la bactérie, soit par acquisition par la bactérie d'un plasmide, matériel porteur de gènes de résistance provenant d'une autre bactérie.

Ce dernier mode de résistance acquise est le plus fréquent, il représente plus de 80% des résistances acquises [12].

Les bactéries sont dites multirésistantes (BMR) aux antibiotiques lorsque du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisable en thérapeutique (résistance à plus de 3 familles différentes) [3].

Les mécanismes d'acquisition de la résistance sont:

- *Le « camouflage » des cellules cibles* : les cellules cibles bactériennes voient leur structure modifiée, ce qui les rend insensibles à l'action de l'antibiotique.
- *La « multiplication » des cellules cibles* : les molécules cibles gagnent la faculté de se multiplier si intensément que les antibiotiques ne parviennent plus à les neutraliser toutes.
- *Le « système bypass » ou déviation de secours* : la bactérie met en place une voie métabolique qui remplace la réaction bloquée par l'antibiotique.
- *L'« altération » des membranes bactériennes* : la perméabilité des canaux membranaires par lesquels l'antibiotique pénètre dans la bactérie est altérée.
- *L'« altération » de la cible* : la bactérie met en place un leurre, c'était-à-dire une molécule qui se substitue à celle classiquement reconnue par l'antibiotique, qui ne la reconnaît alors pas.

- L' « *inactivation* » *enzymatique* : la bactérie synthétise des enzymes qui inactivent l'antibiotique. C'était le mode de résistance le plus répandu.
- L' « *excrétion* » *active* : une fois entré dans la cellule bactérienne, l'antibiotique subit l'effet d'une pompe membranaire qui le rejette tel quel dans le milieu extérieur [14].

Parmi les résistances acquises, on peut citer comme exemple le taux de résistance élevé de *E. coli* aux céphalosporines et fluoroquinolones de troisième génération, deux familles d'antibiotiques antibactériens essentiels et largement utilisés en thérapie [5].

II METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

II.1 Méthodes de diffusion en milieu solide

II.1.1 Méthode des disques (antibiogramme standard)

Elle consiste à ensemencer sur la gélose la souche à tester. Des disques de papiers buvards imprégnés d'antibiotiques à une certaine concentration étaient déposés sur la gélose. Les boîtes étaient incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h en aérobiose ou en anaérobiose (selon la bactérie). La croissance bactérienne ainsi que des zones d'inhibition de la croissance étaient visibles (Cf. **figure 1**).

Les diamètres d'inhibition étaient mesurés grâce à un pied à coulisse.

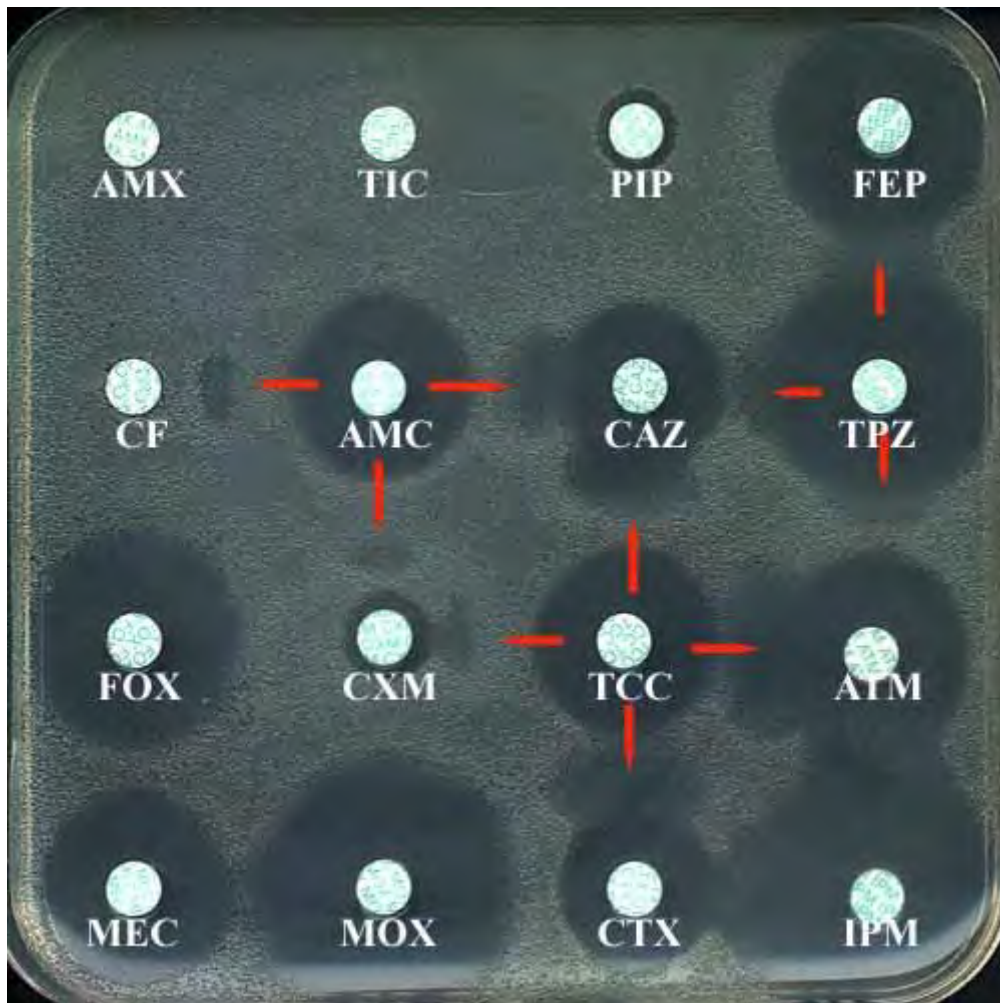


Figure 1: Antibigramme standard

www.microbes-edu.org/mecanisme/Pheno1/salmonell.html

II.1.2 La méthode Epsilonometer test (E-test)

Le système E-test est une bandelette non poreuse calibrée par un gradient pré établi de concentration d'antibiotiques comportant 15 dilutions pour déterminer la CMI en $\mu\text{g/ml}$. Dès que la bandelette était appliquée à la surface de la gélose, il se produit une diffusion de l'antibiotique sur la gélose. Après incubation, on observe une zone d'inhibition en forme d'ellipse répartie symétriquement de chaque côté de la bandelette. Le point d'intersection entre la bandelette et l'extrémité inférieure de la zone d'inhibition indique la CMI de la souche (Cf. figure 2) [14].

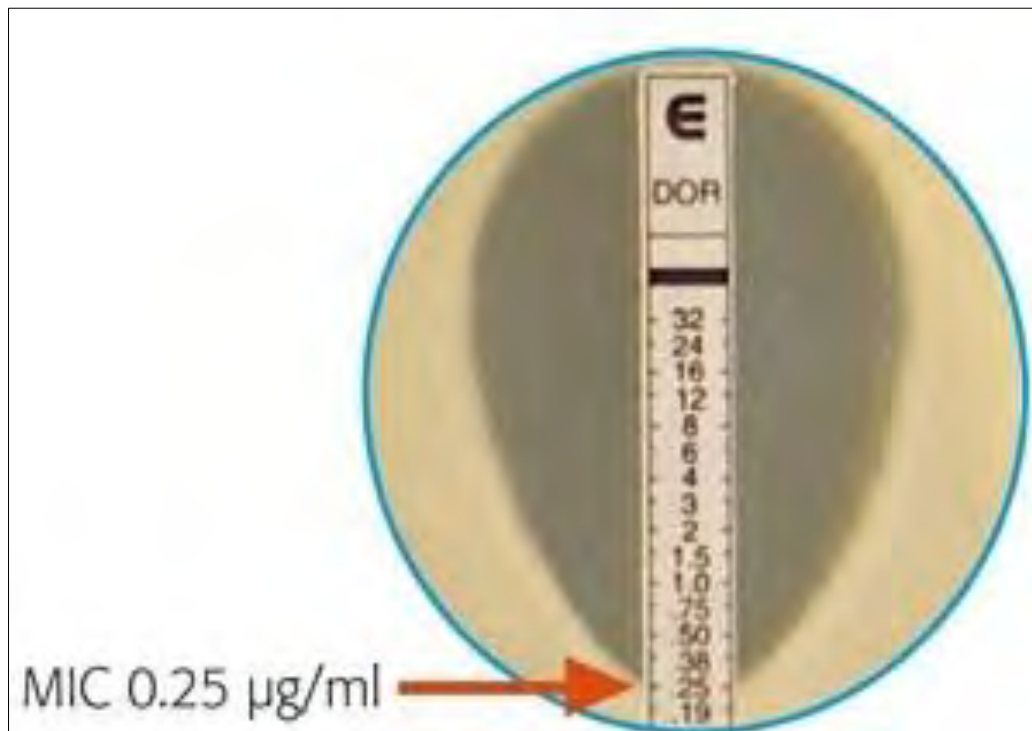


Figure 2: Technique diffusion par bandelette E-test.

www.microbeonline.com/e-test-epsilometer-test-principle-purpose-procedure-results-and-interpretations

II.2 Techniques de dilution

II.2.1 Dilution en milieu liquide

Cette technique permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice avec deux variantes : la macrodilution et la microdilution.

La dilution en milieu liquide consiste à mettre un inoculum bactérien en contact avec une gamme de concentrations d'antibiotiques.

Après une incubation de 24h à 37°C en aérobiose ou anaérobiose (selon la bactérie), la CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber 99 % de l'inoculum (Cf. Figure 3) [14].

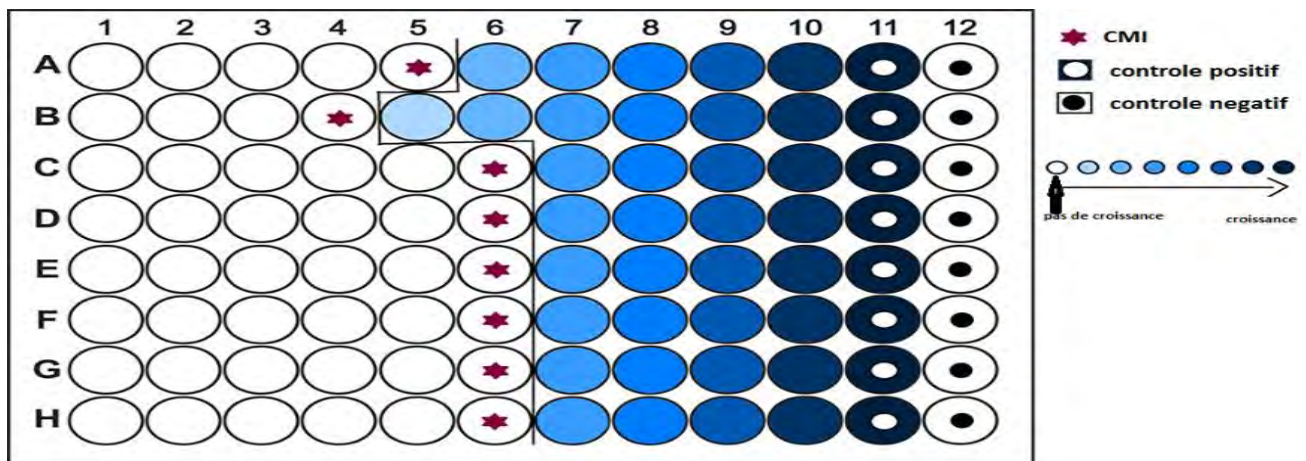


Figure 3: Technique de dilution en milieu liquide par Micro-méthode

www.emerypharma.com/services/minimum-inhibitory-concentration-testing/

II.2.2 Dilution en milieu solide

Une gamme de concentration (variant selon une progression géométrique de base de 2) d'un antibiotique était préparée. Les différentes concentrations de l'antibiotique étaient incorporées dans de la gélose coulée en boîtes de pétri, réalisant une gamme de concentrations croissantes.

Les inocula bactériens étaient préparés et distribués dans des microcupules métalliques. Les tiges métalliques de l'appareil Steers plongent dans chaque microcupule, puis par un mouvement de translation les différents inocula étaient déposés sous le même volume (de l'ordre du microlitre) à la surface du milieu gélosé.

Après avoirensemencé la série de boîtes de Pétri, celles-ci étaient incubées dans une étuve pendant 24h à 37°C en aérobiose ou anaérobiose (selon la bactérie).

La CMI va correspondre à la plus petite concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne (Cf. Figures 4 et 5) [14].



Figure 4: Appareil de Steers

www.researchgate.net/figure/Utilisation-de-lappareil-de-Steers-en-milieu-solide_fig9_306199887

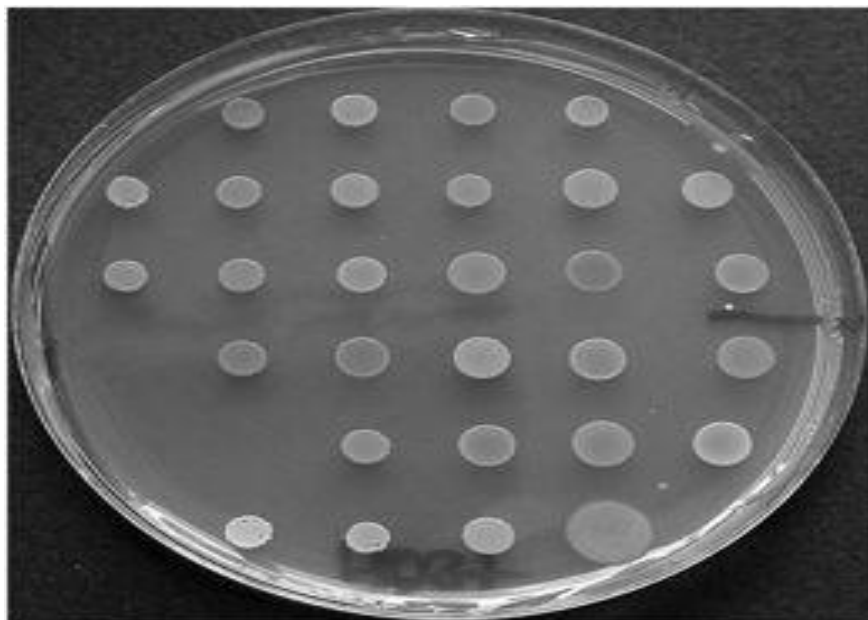


Figure 5: Détermination de la CMI en milieu solide

www.studyblue.com/notes/hh/minimum-inhibitory-concentration-mic/13943233847782801

II.3 Méthodes automatiques

Ce sont des automates qui utilisent des cartes qui contiennent des concentrations définies d'antibiotiques et de milieu de culture.

Après inoculation et incubation, l'appareil détecte directement la CMI après 4h d'incubation. Les résultats sont visualisés au niveau de l'écran .

Cette méthode demande peu de manipulation et permet de gagner du temps.

Beaucoup d'automates sont vendus sur le marché. Ex : ALFRED 60AST, BD Phoenix™, VITEK® 2 (Cf. Figure 6) etc.



Figure 6: Automate Vitek 2 (Biomérieux®)

www.biomerieuxuniversity.com/vitek-2-id-test-card-setup.html

III NOTIONS DE VALIDATION D'UNE TECHNIQUE

La validation est une opération destinée à démontrer qu'une procédure, un procédé ou une activité conduit aux résultats escomptés.

Pour affirmer qu'une technique était valide, elle doit remplir les critères d'exactitude et de fidélité [3].

III.1 L'Exactitude ou justesse

L'exactitude d'une méthode était le degré de concordance entre les résultats obtenus et la vraie valeur de la grandeur mesurée (Cf. figure 7) [2].

$$\text{Exactitude} = \text{Valeur trouvée par procédure} / \text{valeur trouvée avec une procédure de référence.}$$

III.2 La Fidélité

C'est le degré de dispersion des résultats dans une série de mesures obtenue dans des conditions prescrites à partir de prises d'essais multiples provenant d'un même échantillon homogène (les résultats trouvés doivent être identiques entre eux, mais pas forcément exacts) La fidélité se réfère aux erreurs aléatoires (et non aux erreurs systématiques) (Cf. figure 7).

$$\text{Erreur totale} = \text{erreur aléatoire} + \text{erreur systématique (aléatoire} > \text{systématique)}$$

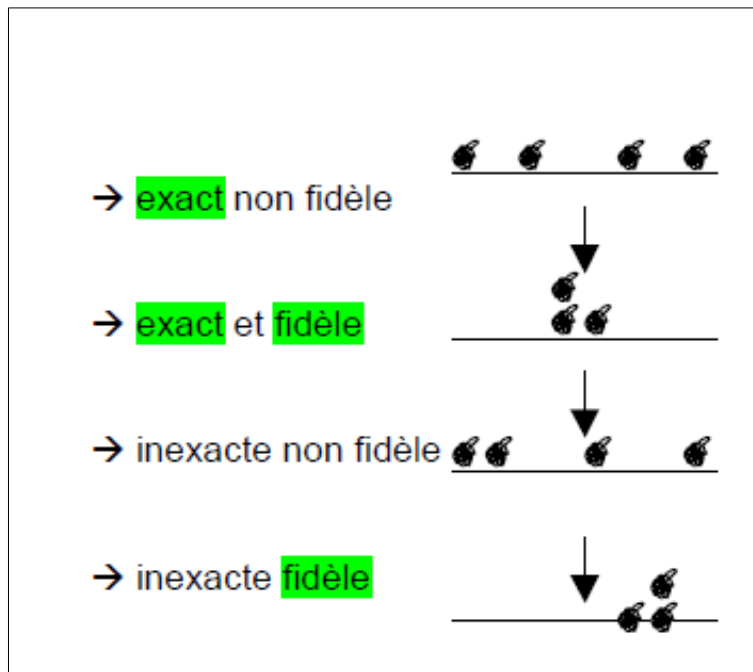


Figure 7: Fidélité et exactitude d'une Technique

www.pharmaetudes.com/ressources/cours%20internat/section1/14-validation-m%C3%A9thode%20analyse.pdf

Les résultats étaient exacts si la moyenne des valeurs était comprise dans la marge des valeurs exactes.

Elles étaient fidèles si les valeurs obtenues étaient presque les mêmes (pas de dispersion de valeurs).

La fidélité était déterminée par 3 tests : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité.

Nous avons aussi utilisé les formules ci-dessous pour calculer:

– La moyenne (m) :

$$m = \sum \frac{x_i}{n}$$

x_i =chaque valeur n =nombre total de valeur

– L'écart type (S) :

$$S = \sqrt{\frac{(x_i - m)^2}{n-1}}$$

– Coefficient de variation (CV) :

$$CV = \frac{S}{m}$$

Le CV était donné en pourcentage (%) [3].

III.2.1 La Répétabilité

C'était la fidélité dans les conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps.

Sur un échantillon donné, on teste n (n > 6) fois notre procédure.

Ces tests étaient réalisés :

- par un même opérateur
- dans le même laboratoire
- avec le même équipement
- pendant une période très courte

Le CV doit être compris entre (2 et 5 %) pour que la procédure soit considérée comme répétable [2].

III.2.2 La fidélité intermédiaire

Elle était aussi appelée variabilité intra-laboratoire. Pour la déterminer, la procédure était reprise n fois dans le même laboratoire :

- avec un analyste différent,
- avec le même équipement ou bien changer d'équipement,
- au même moment où on réalise répétabilité ou choisir un autre moment.

Comme pour la répétabilité, il faut déterminer la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation [2].

III.2.3 La Reproductibilité

Elle est aussi appelée la variabilité inter-laboratoire. La procédure était reprise n fois dans un laboratoire différent :

- avec des échantillons distincts, théoriquement identiques,
- avec un analyste différent,
- avec un équipement différent,
- réalisable au même moment de la détermination de la répétabilité ou bien choisir un autre moment.

Il faut déterminer m , S et CV .

Après avoir réalisé les 3 tests ci-dessus, il faut calculer les variances de chaque série de mesure, puis la variance intra-série (V) et l'écart type (s).

Variance intra-série (V) :

$$V = ((V_1(n_1-1) + V_2(n_2-1) + V_3(n_3-1)) / ((n_1-1) + (n_2-1) + (n_3-1)))$$

Avec V_1 = variance de la répétabilité

V_2 = variance de la fidélité intermédiaire

V_3 = variance de la reproductibilité

$$S = \sqrt{V}$$

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

I OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif général de cette était de produire des disques imprégnés d'antibiotiques et des solutions d'antibiotiques pour valider les techniques de diffusion en milieux solide et liquide. Les objectifs spécifiques étaient :

- De préparer des disques imprégnés d'antibiotiques pour la réalisation de l'antibiogramme de manière artisanale
- De déterminer la CMI avec des solutions déshydratées d'antibiotiques
- De valider les techniques de diffusion en milieux solide et liquide.

II CADRE DE L'ETUDE

Ce travail a été effectué au laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec (HALD) et au laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'UCAD II.

III SOUCHES BACTERIENNES

Nous avons suivi les recommandations de l'EUCAST pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur gélose et les directives du CLSI pour les tests de dilution en milieu liquide.

Notre travail avait porté sur des souches de référence de collection ATCC à savoir :

- Pour la méthode de dilution en milieu solide :
 - *Escherichia coli* ATCC 25922
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
 - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- Pour la méthode de dilution
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

IV MATERIELS UTILISES

IV.1 Matériels pour l'antibiogramme standard

- Papier buvard (référence : WhatmanTM Grade GB004 Blotting Paper, épaisseur : 1mm, haute qualité d'absorbance)
- Perforateur de bureau
- Flacon en verre stériles
- Dessiccateur
- Four
- Autoclave
- Gélose MH
- Eau distillée
- Balance de précision
- pH-mètre
- Plaque chauffante avec agitateur magnétique
- Boîtes de pétri ($\varnothing = 90\text{mm}$)
- Pipette électrique
- Pipette de 20 – 25 ml
- Tubes à hémolyse stériles (5 et 10 ml)
- Eau physiologique
- Anse de platine
- Densitomètre
- Ecouvillons en coton stériles
- Pied à coulisse
- Solutions mères d'antibiotiques : Amikacine, ampicilline, Aztréonam, Céfotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone, Ciprofloxacine, Erythromycine, Gentamycine, Lévofloxacine et Tétracycline

IV.2 Matériels pour la détermination de la CMI

- Bouillon MH ajusté au cation (Mg^{2+} et Ca^{2+})
- Micropipette de 10, 100, 1000 μ l
- Embouts stériles
- Solutions mères d'antibiotiques : Lévofoxacine, Aztréonam, Colistine, Ceftazidime, Ceftriaxone, Gentamycine, Amikacine, Ampicilline, Ciprofloxacine.
- Plaques de 96 puits avec couvercles

V METHODES

V.1 Technique de diffusion sur gélose: préparation des disques d'antibiotiques

V.1.1 Préparation des disques non imprégnés

Des disques de diamètre de 6 mm étaient obtenus en trouant la feuille de papier buvard avec un perforateur. Les disques étaient rangés dans un flacon en verre sec et stérile contenant un dessiccateur. Les disques étaient stérilisés en mettant le flacon à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

V.1.2 Préparation des solutions d'antibiotiques

Des solutions mères d'antibiotiques (Amikacine, Ampicilline, Aztréonam, Céfotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone, Ciprofloxacine, Erythromycine, Gentamycine, Lévofoxacine, Tétracycline, Pénicilline G et Imipénème) ont été préparées suivant les recommandations du CLSI (Cf. Tableau II). Chaque solution mère d'antibiotique était diluée pour obtenir une concentration finale désirée définie par le CASFM.

Pour chaque antibiotique, il était défini un solvant et un diluant approprié.

Table II: Liste des solvants et diluants pour chaque antibiotique.

Antibiotiques	Solvants	Diluants
Amikacine	Eau distillée	Eau distillée
Ampicilline	pH 8 de [0,1mol/l]	pH 6 de [0,1mol/l]
Aztréonam	Solution saturée de bicarbonate	Eau distillée
Cefotaxime	Eau distillée	Eau distillée
Ceftazidime	Carbonate de sodium	Eau distillée
Ceftriaxone	Eau distillée	Eau distillée
Ciprofloxacine	Eau distillée	Eau distillée
Erythromycine	95% éthanol ou acide acétique glacial	Eau distillée
Gentamycine	Eau distillée	Eau distillée
Imipenème	pH 7 de [0,01mol/l]	pH 7 de [0,01mol/l]
Lévofloxacine	½ Eau distillé ; 0,1mol/l NaOH	Eau distillée

pH 6 (0,1 M) : 100 ml de KH_2PO_4 (0,1 M) + 11,2 ml de NaOH (0,1 M)

pH 7 (0,01 M) : 100 ml de KH_2PO_4 (0,01 M) + 58,2 ml de NaOH (0,01 M)

pH 8 (0,1 M) : 100ml KH_2PO_4 (0,1 M) + 93,4 ml de NaOH (0,1 M)

La préparation des solutions se faisait comme suit : l'activité spécifique de la substance était relevée et le volume à préparer défini (en général entre 5 et 10 ml). La masse de substance à peser était décrite par la formule ci-dessous.

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

La masse adéquate d'antibiotique était mesurée à l'aide d'une balance de précision et dissoute dans le solvant approprié. Des aliquotes de la solution étaient répartis dans des cryotubes, en reportant le nom de l'antibiotique, la concentration de la solution mère et la date de préparation. Les cryotubes étaient placés dans des portoirs puis conservés à -80°C au congélateur.

V.1.3 Imprégnation des disques

Les disques stériles ont été imbibés avec 20 µl de la solution finale pour chaque antibiotique à l'aide d'une micropipette dans une boîte de pétri (Cf. tableau III).

Un dessiccateur était ensuite mis dans chaque boîte de pétri. Les disques imprégnés étaient séchés à l'étuve à 37°C pendant 4h. Après séchage, ils étaient conservés au réfrigérateur entre +4 et +8° C.

Table III: Concentrations finales des antibiotiques et charge des disques.

Antibiotiques	Volume d'imprégnation (µl)	Charge du disque (µg)	Concentration finale (µg /µl)
Amikacine	20	30	1,5
Ampicilline	20	10	0,5
Aztréonam	20	30	1,5
Cefotaxime	20	5	0,25
Ceftazidime	20	10	0,5
Ceftriaxone	20	30	1,5
Ciprofloxacine	20	5	0,25
Erythromycine	20	15	0,75
Gentamycine	20	10	0,5
Lévofloxacine	20	5	0,25
Tétracycline	20	30	1,5

V.1.4 Validation des disques d'antibiotiques préparés

Pour valider la technique, les disques ont été utilisés dans des tests d'antibiogramme standard.

L'inoculum était préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues à partir d'une culture pure de 18-24 h, puis il a été ajusté à une turbidité de 0,5 Mac Farland. L'ensemencement a été fait par écouvillonnage sur le milieu gélosé de Mueller Hinton. Les disques d'antibiotiques ont été appliqués à la surface de la gélose et les boîtes étaient incubées à 37°C pendant 18 à 24 h en aérobie.

Les diamètres de la zone d'inhibition pour chaque antibiotique ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse permettant de catégoriser les souches (sensibles, intermédiaires ou résistantes) selon les recommandations du CA-SFM. Les souches testées étaient : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

V.2 Technique de dilution : préparation de test pour l'étude de la CMI

Les antibiotiques étaient déshydratés dans des microplaques de 96 puits. La plaque était constituée de 8 lignes numérotées de A à H, et de 12 colonnes numérotées de 1 à 12. Ainsi, la

plaque contenait 8 dilutions d'antibiotiques permettant de déterminer la CMI. Les colonnes 1 et 2 étaient utilisées pour les contrôles positif (croissance de bactéries) et négatif (stérilité du milieu) (cf. figure 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Ctrl (-)	Ctrl (+)	0.03 μg/ml	0.06 μg/ml	0.12 μg/ml	0.25 μg/ml	0.5 μg/ml	1 μg/ml	2 μg/ml	4 μg/ml	8 μg/ml	16 μg/ml	← ATB 1
B													← ATB 2
C													← ATB 3
D													← ATB 4
E													← ATB 5
F													← ATB 6
G													← ATB 7
H													← ATB 8

Figure 8: Microplaque

Une solution intermédiaire de 32 μg/ml était préparée pour chaque antibiotique à tester. Dans chaque ligne, un volume de 100 μl de diluant approprié de l'antibiotique était versé dans chaque puits de 3 à 12. Un volume de 100 μl de la solution intermédiaire était introduit dans le puits 12, puis des dilutions successives de raison 2 de l'antibiotique étaient réalisées du puits 12 jusqu'au puits 3.

V.2.1 Déshydratation des solutions d'antibiotiques

La déshydratation était réalisée à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

De l'éthanol a été utilisée pour désinfecter l'étuve. Les microplaques (les couvercles ouverts) étaient mises à l'étuve 37°C pendant 24 h. Après déshydratation, les plaques étaient scellées avec un dessiccateur à l'intérieur, puis conservées à -20°C.

V.2.2 Validation de la technique des antibiotiques déshydratés

Pour déterminer l'efficacité des antibiotiques déshydratés, une étude de la sensibilité des souches de référence (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) a été réalisée par la méthode de dilution en milieu liquide.

Les microplaques étaient ramenées à la température ambiante. Puis un volume de 180 µl de bouillon MH était distribué dans tous les puits. Un inoculum calibré à 0,5 McFarland (approximativement égale à $1-2 \cdot 10^8$ UFC/ml) était dilué au 1/20, comportant environ une concentration bactérienne de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml. Un volume de 20 µl de cette suspension bactérienne était distribué dans les puits (sauf ceux de la colonne 1). La charge bactérienne finale était de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml.

Le puits 1 correspond au contrôle négatif contenant uniquement le bouillon MH.

Le puits 2 correspond au contrôle positif contenant le bouillon MH et l'inoculum bactérien.

La plaque était incubée à 37°C à l'étuve pendant 18-24 heures. Après incubation, le premier puits où il n'y a pas de culture visible indique la CMI de la souche bactérienne après 18-24 h d'incubation à 37°C.

VI RESULTATS

VI.1 METHODE DE DIFFUSION SUR GELOSE

Pour valider les tests, nous avons utilisé des souches de référence ATCC suivant les recommandations de l'EUCAST.

VI.1.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

La moyenne calculée pour le LVX était 29,4 mm, valeur en dehors de l'intervalle des valeurs de référence. La valeur moyenne et le coefficient de variation des autres antibiotiques (GM, CIP, AN, TET et P) étaient compris dans les valeurs de référence (Cf. Tableau IV).

Table IV: Résultats pour S. aureus ATCC 29213.

ATB	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Valeurs de Référence	Moyenne	Ecart Type	CV
LVX	29,5	30,3	30,4	25,9	30	30,1	23-29	29,43	1,734	0,058
GM	23,3	23,4	22,8	22,9	21,9	23,6	19-25	23,02	0,611	0,026
CIP	24,3	24,6	23,2	22,2	24,1	24,8	21-27	23,9	0,966	0,04
AN	22,3	20	22,6	22,3	22,6	21,8	18-24	21,97	0,996	0,045
TET	27,6	28,6	26	27,4	28,2	28	23-31	27,67	0,908	0,032

VI.1.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

Les moyennes des valeurs de tous les antibiotiques testés sur la souche *E. coli* étaient comprises dans les valeurs de références (Cf. Tableau V).

Il y avait une bonne répétabilité avec des coefficients de variation inférieurs à 5% pour tous les antibiotiques sauf pour la ciprofloxacine dont le coefficient de variation était 0,057. La technique n'était pas valide pour cet antibiotique.

Table V: Résultats pour *E. coli* ATCC 25922.

ATB	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Valeurs de Référence	Moyenne	Ecart Type	CV
CAZ	24	23	23,5	25	25	23,5	23-29	24	0,836	0,034
GM	25	25	24,5	24	24	25	19-26	24,58	0,491	0,019
LVX	35	33	33	34	35,5	35	29-37	34,25	1,083	0,031
CIP	37	32	33	32	32,5	34	29-37	33,41	1,908	0,057
CRO	31	30	30	31	31	30	29-35	30,5	0,547	0,017
AM	16	17	16	17	16,5	15,5	15-22	16,33	0,605	0,037
AMI	22	23	23	24	21	6	19-26	19,83	6,853	0,345
CTX	28	27,5	28	27	28	25,5	25-31	27,33	0,983	0,035

VI.1.3 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pour *P. aeruginosa*, les valeurs de la moyenne des tests de chaque antibiotique étaient comprises dans les valeurs de référence : donc la technique était valide (Cf. Tableau VI).

Il y a une bonne répétabilité avec un coefficient de variation inférieur à 5% pour tous les antibiotiques.

Table VI: Résultats pour *P. aeruginosa* ATCC 27853.

ATB	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Valeurs de Référence	Moyenne	Ecart Type	CV
CAZ	23,5	23	23	22,5	22	24	21-27	23	0,707	0,03
LVX	24,5	24	25	25	25	25,5	19-26	24,83	0,516	0,02
CIP	30	31,5	30	30	33	32	25-33	31,08	1,281	0,041
AN	21	19	19,5	18,5	18,5	19,5	18-26	19,33	0,93	0,048
GM	18,5	19	18	18	18,5	19	17-23	18,5	0,447	0,024

VI.1.4 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Les valeurs de la moyenne d'Amikacine et Gentamicine étaient comprises dans les valeurs de référence et il y a une bonne répétabilité pour ces antibiotiques avec un coefficient de variation inférieur à 5%. Par contre, les moyennes des valeurs pour Ciprofloxacine et Lévofloxacine étaient inférieures aux intervalles de références (Cf. Tableau VII).

Table VII: Résultats antibiogramme pour *E. faecalis* ATCC 29212.

ATB	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Valeurs de Référence	Moyenne	Ecart Type	CV
AM	16	16	16,5	17	17	16	15-21	16,416	0,491	0,029
CIP	14	15	16,5	15	13	15,5	19-25	14,833	1,211	0,081
GM	14	13,5	14,5	14	13	13	12-18	13,666	0,605	0,044
LVX	18	18	19,5	17	18	18	19-25	18,083	0,801	0,044

VI.2 METHODE DE DILUTION

La détermination des CMI par la méthode de dilution a été réalisée sur la souche de *Pseudomonas aeruginosa* et la souche de *Staphylococcus aureus*.

VI.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Les moyennes des valeurs pour tous les antibiotiques testés étaient comprises dans les valeurs de référence. Il y'avait une bonne répétabilité avec des coefficients de variation inférieurs à 5% pour AN et CAZ. Pour les autres antibiotiques, les coefficients de variation étaient supérieurs à 5% (Cf. Tableau VIII).

Table VIII: Résultats CMI pour *P. aeruginosa* ATCC 27853.

ATB	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Valeurs de Référence	Moyenne	Ecart type	CV
LVX	2	2	1	2	2	2	0,5-4	1,83	0,41	0,22
AN	4	4	4	4	4	4	1-4	4,00	0,00	0
COL	2	2	1	1	2	1	0,5-4	1,50	0,55	0,37
CAZ	4	4	4	4	4	4	1-4	4,00	0,00	0
CRO	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25-1	0,42	0,13	0,31
GM	2	2	1	2	2	2	0,5-2	1,83	0,41	0,22

VI.2.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

La valeur de la moyenne pour la CIP était en dehors de l'intervalle des valeurs de référence. Pour les autres antibiotiques, les valeurs des moyennes étaient comprises dans les valeurs de référence mais leurs coefficients de variation étaient supérieurs à 5% (Cf. Tableau IX).

Table IX: Résultats CMI pour *S. aureus* ATCC 29213.

ATB	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Valeurs de Référence	Moyenne	Ecart type	CV
LVX	0,25	0,125	0,25	0,25	0,125	0,25	0,06-0,5	0,21	0,06	0,31
AM	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,5 - 2	0,54	0,25	0,45
AN	4	4	2	4	2	2	1-4	3,00	1,10	0,37
CIP	1	0,5	1	0,5	1	1	0,12-0,5	0,83	0,26	0,31
GM	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,12-1	0,42	0,13	0,31

VII DISCUSSION

Nous avons entrepris ce travail pour apporter notre contribution sur la surveillance de la résistance aux antibactériens qui est un problème majeur de santé publique, corrélée au manque de matériels au niveau des laboratoires suite aux moyens limités et aux ruptures récurrents de stock.

Cette étude était axée sur deux objectifs spécifiques dont la préparation de disques imprégnés d'antibiotiques pour l'étude de la résistance par la méthode de diffusion sur gélose et la détermination des CMI par la méthode de dilution.

La qualité des disques d'antibiotiques commercialisés dans nos pays à ressources limitées pose problèmes avec parfois des résultats non validés. D'où la nécessité de valider régulièrement la fidélité de ces disques au fur du temps avec l'utilisation de souches de références ATCC.

Les résultats obtenus avec les disques d'antibiotiques préparés ont été dans leur majorité validés avec l'utilisation de souches de référence [8].

Pour valider les disques d'antibiotiques, il faut nécessairement :

- déterminer la reproductibilité
- déterminer la fidélité intermédiaire
- déterminer la variance et l'écart type inter-série
- Déterminer la durée de validité des disques d'antibiotiques et leurs conditions de conservation optimales
- Elargir la gamme des antibiotiques testés dans différentes familles d'antibiotiques

La comparaison des disques préparés artisanalement pourrait se faire avec ceux commercialisés industriellement (BioRad, Biomerieux) qui sont validés et peuvent servir de contrôle standard.

Les disques fabriqués artisanalement pourront être utilisés pour pallier à la rupture de stock dans les laboratoires de bactériologie pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques des germes isolés.

La technique de la microplaque a été validée depuis longtemps, notre seul apport était la déshydratation des antibiotiques dans les plaques. Ceci permet de faciliter l'utilisation des microplaques par le technicien qui va uniquement distribuer l'inoculum bactérien.

Les valeurs des moyennes des antibiotiques testés étaient dans l'intervalle des valeurs de référence. Cependant, il y' avait des coefficients de variation qui étaient supérieurs à 5%. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'écart entre les concentrations des antibiotiques dans les puits était relativement grand.

Et comme pour l'antibiogramme standard, il faudra terminer la validation en faisant les tests complémentaires que sont : la reproductibilité, la fidélité intermédiaire, le calcul de la variance et de l'écart type inter-série et la détermination de la durée de validité des microplaques. Cette technique pourrait être un atout pour la détermination de la CMI car elle est pratique et son cout est relativement faible.

CONCLUSION

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide le Dantec et au laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'UCAD II.

Pour la méthode de diffusion en milieu solide, les valeurs des moyennes et des coefficients de variation étaient comprises dans l'intervalle des valeurs de référence pour la plupart des antibiotiques.

Pour la méthode de la microplaque, les valeurs des moyennes étaient comprises dans l'intervalle des valeurs de référence mais il y a des antibiotiques dont les coefficients de variation étaient supérieurs à 5%.

Il faudra terminer la validation des deux techniques en faisant les tests complémentaires que sont : la reproductibilité, la fidélité intermédiaire, le calcul de la variance et de l'écart type inter-série et la détermination de la durée de validité des antibiotiques.

Pour une meilleure prise en charge des patients, l'étude de la diminution du délai de lecture en utilisant un inoculum plus lourd pourra être initiée afin de déterminer la CMI en 6H ou moins.

Références Bibliographiques

1. **Carle S.** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*, 2009; 42 : 7-14.
2. **Bakhoun I M N S.** Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. Thèse de pharmacie, DAKAR 2004, n^o8.
3. **Murphy S, Denman S, Bennett R.G. et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a long care facility. *J Am Geriatr Soc.* 1992 ; 40 : 213-7.
4. **Mouton Y, Bingen E et Deboscker Y.** les grandes familles d'antibiotiques. Antibiotiques, antirétroviraux, anti infectieux. *John Libbey Eurotext.* 2000;288: 45-47.
5. **Organisation Mondiale de la Santé.** Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale. *Rapport OMS* 2014.
6. **Organisation mondiale de la Santé.** Résistance aux antibiotiques. Rapport OMS Octobre 2017.
7. **Eze P M, Ajaegbu E E , Esimone C O et al.** Evaluation of the Paper Quality of Antibacterial discs Commercially Available in Nigeria. *Br J Pharm Res.* 2014;4(21): 2548-2562
8. **Levy S B.** The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am.* 1998, 278: 46-53.
9. **Poirel N.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(9):826-36.
10. **Sander P, Bruneau M et Soumet C.** La méthodologie d'étude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion et par dilution. *Nouv Prat Vet.* 2014;26 : 31-32
11. **Levy S B et Marshall B.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 2004, 10 : S122-129.
12. **Résistance aux antibiotiques.** (Consulté le 25 juin 2017).
<https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/resistance-aux-antibiotiques>
13. **Courvalin P.** La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull Aca Vet.* 2008, 161,1 : 7-12
<https://doi.org/10.4267/2042/47917>
14. **Plesiat P.** Biochimie de la résistance. Antibiogramme Ed Eska, 2ème édition 2006.

RESUME

Introduction et objectifs

Un antibiogramme était une méthode pour déterminer la sensibilité d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotiques. L'antibiogramme standard était la méthode la plus utilisée dans nos structures de santé, mais pour certains antibiotiques on utilise la méthode de dilution pour déterminer la CMI. Les structures de santé étaient souvent confrontées à des ruptures de réactifs, en particulier les disques d'antibiotiques pour la réalisation des antibiogrammes. De plus les bandelettes E-test permettant de réaliser la CMI sur gélose coûtent cher et n'étaient pas accessibles à nos structures à ressources limitées.

De ce fait, les laboratoires étaient confrontés à des problèmes pour réaliser les antibiogrammes des souches isolées.

C'était dans ce contexte que nous avons réalisés ce travail dont l'objectif principal était de valider les tests.

Les objectifs spécifiques étaient :

- Préparer des disques imprégnés d'antibiotiques pour la réalisation de l'antibiogramme standard de manière artisanale
- Détermination de la CMI avec des solutions déshydratées d'antibiotiques
- Validation de ces techniques.

Matériels

Pour l'antibiogramme standard : à part les matériels utilisés en routine dans les laboratoires d'analyses, on a utilisé du papier buvard, un perforateur, flacons en verre et des solutions mères d'antibiotiques.

Pour la méthode de dilution en milieu liquide : Bouillon MH ajusté au cation (Mg^{2+} et Ca^{2+}), Micropipette de 10, 100, 1000 μ l, Embouts stériles, Solutions mères d'antibiotiques, Plaques de 96 puits avec couvercles.

Méthodes

Pour l'antibiogramme standard : le papier buvard était perforé et les disques obtenus étaient stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn. Les disques stériles étaient inoculés avec 20 μ l d'une solution d'antibiotique. Ensuite ils étaient séchés à l'autoclave à 37°C pendant 4h et conservés au réfrigérateur entre 4 et 8°C.

Pour la méthode de dilution en milieu liquide : l'antibiotique était distribué dans la microplaque en faisant une dilution en cascade, on se retrouve ainsi d'antibiotiques. L'antibiotique était déshydraté en mettant la microplaque à l'étuve à 37°C pendant 24h. Les microplaques contenant les antibiotiques déshydratés étaient conservées au réfrigérateur entre 4 et 8°C.

Résultats

Pour déterminer l'efficacité de nos produits, on les a utilisés dans des tests : les disques étaient utilisés dans un antibiogramme standard et les antibiotiques déshydratés étaient utilisés dans une méthode de dilution en milieu liquide. Les souches de références utilisées étaient : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Les résultats obtenus montrent que les valeurs de la moyenne des tests de chaque antibiotique étaient comprises dans les valeurs de références : donc la technique était valide. En plus, on a une bonne répétabilité avec un coefficient de variation inférieure à 5%.

Conclusion

Le processus de validation des protocoles d'antibiogrammes a donné des résultats concluants. Ils peuvent être des alternatives aux techniques qui étaient utilisées en routine car ils ont l'avantage d'être bon marché et facile à mettre en place. Dans l'optique d'une amélioration, la modification de certains paramètres comme l'inoculum ou la concentration pourrait conduire à une diminution du temps de lecture et ainsi réduire la durée des analyses.

Mots clés : antibiogramme standard, dilution en milieu liquide, validation de techniques