

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



Année : 2018

N° : 143

Optimisation et validation de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* sur microplaques-CSB®

MEMOIRE

Du diplôme de Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Présenté et soutenu

Le 06 août 2018

Par : **M. Issakha NIANG**

MEMBRES DU JURY

Président : Mme Ndeye Coumba TOURE KANE

Professeur

Membres : Mme Halimatou DIOP NDIAYE
M. Makhtar CAMARA

Maître de Conférences Agrégé

Maître de Conférences Agrégé

Directeur mémoire : M. Cheikh Saad-Bouh BOYE

Professeur

Co-directeur : M. Abdoulaye SECK

Maître-Assistant

*Au nom d'Allah, le clément, le Miséricordieux
Louange à ALLAH Possesseur de la Majesté et de la Générosité
Que la paix soit sur notre Prophète MOUHAMED (PSL), sa
famille et ses compagnons.*

IN MEMORIUM

A mon Père

J'aurais tant aimé vivre ces moments avec vous.

Vous êtes et vous resterez à tout jamais dans nos cœurs.

Reposez en paix et qu'ALLAH Le Tout Puissant vous accorde son saint Paradis.

DEDICACES

Je dédie ce travail ...

A ma chère Mère *Fatimata Ba*

Femme courageuse, exemplaire et dévouée à la famille. Vos souffrances et vos prières n'ont pas été vaines. Je vous remercie de l'infinie tendresse que vous avez toujours eue à mon égard.

Que Dieu vous accorde longue vie et santé.

A mes chers tuteurs *Ousmane Amadou Ly* et son épouse *Aminata Thiello*

Aucun mot ne saurait traduire mon affection et ma reconnaissance à votre égard. Vous avez toujours été pour moi un père et une mère exemplaires depuis mon jeune âge.

Jamais à un seul instant votre amour et votre affection ne m'ont fait défaut.

Vous n'avez jamais cessé de m'exhorter au travail, ma réussite a toujours été votre principal souci. Ce travail est le fruit de vos innombrables sacrifices.

Je vous souhaite longue vie et une meilleure santé. Je vous aime !

A mon beau-frère *Tidiane Mamadou Dia* et son épouse *Ramatoulaye Niang*

Merci pour votre soutien et votre affection. Je vous suis très reconnaissant.

Que le Bon DIEU vous garde et vous accorde une bonne santé.

A mes frères et sœurs, neveux, nièces, toute ma famille sans oublié mes ami(e)s.

Merci pour vos conseils, soutiens et encouragements.

REMERCIEMENTS

Sincères remerciements

- A notre Directeur de mémoire, **Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE** pour l'opportunité qu'il nous a offert de travailler à ses côtés.
- A notre Co-directeur de mémoire **Dr Abdoulaye SECK** pour sa disponibilité d'encadrer ce travail et son soutien lors de la rédaction.
- Au **Dr Sokhna FALL** pour votre gentillesse, votre disponibilité et tout ce sacrifice que vous avez fait pour le bon déroulement de ce travail.
Toute ma profonde gratitude.
- A tout le personnel du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide le Dantec : **Amadou DIOP, Abdoulaye DIOP, Thiané DIOP NDIR, Fatou Bintou GUEYE, Tonton Omar SAGNA, Michel DIOP**, qui nous ont facilité le travail et participé à sa réussite.
- Au Secrétaire **Dior Dieng** pour sa gentillesse, sa disponibilité, son dévouement.
- A tous mes amis de promo, particulièrement **Amadou Kane, Oumalher, Ndeye Maguette Mbeye** pour les moments inoubliables.
- A toute ma famille, mes amis.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre Maître et Présidente du Jury

Madame Ndeye Coumba TOURE KANE, Professeur

Vous nous faites un grand honneur en présidant notre jury de mémoire, malgré vos multiples occupations.

Nous avons au cours de nos études, apprécié vos qualités de pédagogue, votre rigueur dans le travail, mais surtout votre générosité.

Veillez bien trouver ici la preuve de notre admiration.

A notre Maître et Juge

Madame Halimatou DIOP NDIAYE, Maître de Conférences Agrégé

Nous avons été touchés par la spontanéité et la simplicité avec laquelle, vous avez accepté de siéger dans notre jury de mémoire.

Votre disponibilité, votre sympathie ainsi que votre courtoisie sont connues de tous.

C'est une joie pour nous de vous compter parmi nos juges et de pouvoir profiter de vos compétences.

Veillez accepter nos sincères remerciements.

A notre Maître et Juge

Monsieur Makhtar CAMARA, Maître de Conférences Agrégé

Plus qu'un honneur, c'est une joie pour nous de vous compter parmi nos juges.

Vos qualités professionnelles, votre rigueur scientifique et votre ouverture font de vous un Maître qui attire la sympathie et le respect.

Recevez, l'expression de notre vive gratitude et de notre profond respect.

A notre Maître et Co-directeur de mémoire

Monsieur Abdoulaye SECK, Maître-Assistant

Vous nous avez initiés à la recherche dans la rigueur et vous avez conduit ce travail avec beaucoup d'intérêt.

Vous avez su nous mettre à l'aise dans votre service.

Votre disponibilité, générosité, rigueur et sympathie font de vous une personne que nous admirons.

Nous avons eu en face de nous, non seulement un Maître, mais aussi un ami.

Nous espérons ne pas vous avoir déçu.

A notre Maître et Directeur de mémoire

Monsieur Cheikh Saad-Bouh BOYE, Professeur

L'occasion nous est donnée ici de vous témoigner toute notre gratitude pour l'opportunité que vous nous avait offert de travailler à vos côtés.

Vous avez bien voulu nous confier ce travail. Nous sommes très sensibles à cette marque de confiance.

Par ailleurs, nous nous réjouissons d'avoir bénéficié de votre rigueur scientifique qui nous a permis de réaliser ce modeste travail.

Soyez assuré, cher Maître de notre attachement et de notre loyauté.

Liste des abréviations

ADH	: Arginine dihydrolase
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AKN	: Amikacine
AM₃	: Antibiotic Medium 3
AMC	: Acétyl-méthyl-carbinol
ARN	: Acide ribonucléique
ATCC	: American Type Culture Collection
BEA	: Bile-Esculine Agar
BHS	: Bouillon hypersalé
BMH	: Bouillon Mueller-Hinton
CaCl₂	: Chlorure de calcium
CA-SFM	: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CCI	: Concentration Critique Inférieure
CCS	: Concentration Critique Supérieure
CIP	: Ciprofloxacine
CMB	: Concentration Minimale Bactéricide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CRO	: Céftriaxone
E	: Erythromycine
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra-Acétique
Fc	: Fragment cristallisable
GM	: Gentamicine
I	: Intermédiaire
IgG	: Immunoglobine G
LAP	: Leucine aminopeptidase
LDC	: Lysine décarboxylase
MgCl₂	: Chlorure de magnésium
MH	: Mueller-Hinton
MLS	: Macrolides, Lincosamides et Streptogramines
NaCl	: Chlorure de sodium
NI	: Non interprétable
ODC	: Ornithine décarboxylase

ONPG	: Ortho-nitrophénol- β -D-galactopyranoside
ORL	: Oto-Rhino-Laryngologie
PEN	: Pénicilline
PYRA	: Pyrrolidonyl-arylamidase
R	: Résistant
S	: Sensible
SCTS	: Syndrome de Choc Toxique Staphylococcique
ST	: Solution de Travail
TC	: Témoin Contrôle
TE	: Tétracycline
TNF	: Tumor Necrosis Factor

Liste des tableaux	Pages
Tableau I : Tests biochimiques pour identifier <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i>	11
Tableau II : Composition des différents bouillons Mueller-Hinton	19
Tableau III : Concentrations critiques des antibiotiques testés.....	19
Tableau IV : Profil de sensibilité de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 par antibiogramme standard...	23
Tableau V : Profil de sensibilité de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 sur milieu BMH + glucose.....	23
Tableau VI : Profil de sensibilité de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 sur milieu BMH + pyruvate....	24
Tableau VII : Profil de sensibilité de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 sur milieu BMH + glucose + pyruvate	24
Tableau VIII : Profil de sensibilité de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 sur microplaques CSB contenant le milieu BMH + glucose.....	25
Tableau IX : Profil de sensibilité d' <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 par antibiogramme standard...	26
Tableau X : Profil de sensibilité d' <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose.....	26
Tableau XI : Profil de sensibilité d' <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 sur milieu BMH + pyruvate...	27
Tableau XII : Profil de sensibilité d' <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose + pyruvate	27
Tableau XIII : Profil de sensibilité d' <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose..	28
Tableau XIV : Table de contingence entre la microméthode et la méthode d'antibiogramme standard pour <i>S. aureus</i> ATCC 29213 sur milieu BMH + glucose, après 6 h d'incubation.....	29
Tableau XV : Table de contingence entre la microméthode et la méthode d'antibiogramme standard pour <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose, après 6 h d'incubation	29

Liste des figures	Pages
Figure 1 : Aspect de <i>S. aureus</i> sur gélose au sang avec présence d'une β -hémolyse	3
Figure 2 : Composantes antigéniques de <i>S. aureus</i>	4
Figure 3 : Structure du noyau bêta-lactame.....	13
Figure 4 : Structure chimique des aminosides	14
Figure 5 : Structure de base de la famille des cyclines	15
Figure 6 : Structure de base de la famille des quinolones	15
Figure 7 : Structure chimique des polypeptides	16
Figure 8 : Structure de base de la famille des sulfamides	16
Figure 9 : Sensibilité intermédiaire d' <i>E. faecalis</i> à l'amikacine sur bouillon MH	21
Figure 10 : Microplaques CSB [®] contenant l'inoculum avant incubation	21
Figure 11 : Profil de sensibilité aux antibiotiques d' <i>E. faecalis</i> sur Microplaque CSB [®]	22

Table des matières	Pages
Introduction.....	1
Première partie : Revue bibliographique.....	2
I. Généralités sur les cocci à Gram positif.....	2
I.1. Les staphylocoques.....	2
I.1.1. Historique	2
I.1.2. Taxonomie	2
I.1.3. Habitat	2
I.1.4. Caractères bactériologiques.....	3
I.1.4.1. Caractères morphologiques	3
I.1.4.2. Caractères cultureux.....	3
I.1.4.3. Caractères biochimiques.....	4
I.1.4.4. Caractères antigéniques	4
I.1.5. Substances élaborées	6
I.1.5.1. Enzymes staphylococciques.....	6
I.1.5.2. Toxines staphylococciques.....	7
I.1.6. Pouvoir pathogène.....	8
I.2. Les entérocoques.....	9
I.2.1. Historique	9
I.2.2. Taxonomie	9
I.2.3. Habitat	9
I.2.4. Caractères bactériologiques	10
I.2.4.1. Caractères morphologiques	10
I.2.4.2. Caractères cultureux.....	10
I.2.4.3. Caractères biochimiques	11
I.2.4.4. Caractères antigéniques.....	11
I.2.5. Pouvoir pathogène	12
II. Rappels sur les antibiotiques.....	13
II.1. Définition	13
II.2. Classification	13
II.2.1. Les β -lactamines.....	13
II.2.2. Les aminosides	14

II.2.3. Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS)	15
II.2.4. Les cyclines	15
II.2.5. Les phénicolés	15
II.2.6. Les quinolones	15
II.2.7. Les polypeptides	16
II.2.8. Les sulfamides	16
II.2.9. Les glycopeptides	16
Deuxième partie : Travail expérimental	17
I. Objectif de l'étude	17
II. Cadre d'étude	17
III. Souches bactériennes étudiées	17
IV. Matériel	17
IV.1. Matériel pour le réisolement	17
IV.2. Matériel pour la conservation	17
IV.3. Matériel pour l'étude de la sensibilité	17
IV.4. Milieux de culture et réactifs	18
V. Méthodologie	19
V.1. Préparation des milieux de culture	19
V.2. Préparation des microplaques	19
V.3. Contrôle de qualité	20
V.4. Détermination de la sensibilité par antibiogramme standard	20
V.5. Macrométhode d'étude <i>in vitro</i> de la sensibilité	21
V.6. Microméthode d'étude <i>in vitro</i> de la sensibilité	21
V.7. Validation de la méthode	22
VI. Résultats	23
VI.1. Profils de sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
VI.1.1. Résultats obtenus avec l'ABG standard	23
VI.1.2. Résultats obtenus avec la macrométhode	23
VI.1.3. Résultats obtenus sur microplaques CSB [®]	25
VI.2. Profils de sensibilité d' <i>Enterococcus faecalis</i>	26
VI.2.1. Résultats obtenus avec la méthode d'antibiogramme standard	26
VI.2.2. Résultats obtenus avec la macrométhode	26

VI.2.3. Résultats obtenus sur microplaques CSB [®]	28
VI.3. Corrélation entre la microméthode et la méthode standard.....	29
VII. Discussion	30
Conclusion.....	33
Références bibliographiques	34
Annexe	37

INTRODUCTION

Les cocci à Gram positif occupent une place importante en pathologie humaine par le nombre et la gravité des infections qu'ils provoquent [1, 8].

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 [26].

Les entérocoques sont des commensaux du tube digestif, responsables d'infections urinaires et d'endocardites [14].

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

L'utilisation rationnelle des antibiotiques en clinique humaine repose sur l'étude *in vitro* de la sensibilité des bactéries pathogènes vis-à-vis aux différentes molécules d'antibiotiques. Ceci permettra aux cliniciens d'avoir le choix d'une antibiothérapie de première intention adaptée aux données épidémiologiques locales. Le délai d'obtention du profil de sensibilité aux antibiotiques après isolement et identification de la bactérie est important dans la prise en charge du patient par le clinicien pour l'instauration d'une antibiothérapie adaptée.

Plusieurs méthodes d'études *in vitro* de la sensibilité sont actuellement disponibles dans le marché. Mais ces méthodes sont très coûteuses pour beaucoup de laboratoires des structures sanitaires des pays en développement.

C'est dans ce cadre, que l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie et virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec a mis en place des microplaques-CSB[®] d'étude de la sensibilité, simples, fiables, peu coûteuses et pour un délai de lecture de la sensibilité des bactéries en 8 h.

L'objectif de notre travail était d'étudier la réduction du délai de lecture de 8 h à 6 h pour déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* et d'*Enterococcus faecalis* sur microplaques-CSB[®] en testant trois milieux de culture.

PREMIERE PARTIE :
revue bibliographique

I. Généralités sur les cocci à Gram positif

I.1. Les staphylocoques

I.1.1. Historique [1, 13]

En 1878, Koch souligne le rôle pathogène des bactéries se présentant sous forme de cocci à Gram positif.

Ces cocci sont ensuite isolés puis identifiés d'un pus par Louis Pasteur en 1880.

Ils sont baptisés sous le nom de staphylocoque par Ogston en 1883.

En 1884, ils sont classés en fonction de la pigmentation des colonies par Rosenbach, en *Staphylococcus aureus*, du latin « Orange » et *Staphylococcus albus*, du latin « Blanche ».

I.1.2. Taxonomie [11]

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Staphylococcaceae* au sein de laquelle sont classés les genres :

- *Staphylococcus*,
- *Gemella*,
- *Micrococcus*,
- *Salinicoccus*.

Les espèces les plus rencontrées dans les milieux hospitaliers sont *S. aureus*, *S. saprophyticus* et *S. epidermidis*.

I.1.3. Habitat

Les staphylocoques sont des bactéries très répandues dans la nature (air, eau, sol). Leur réservoir naturel est l'homme et les animaux à sang chaud [1, 10].

Les espèces à coagulase négative représentent les principaux commensaux de la peau et sont en général des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales.

S. aureus est une bactérie ubiquitaire [16], elle s'est adaptée à diverses niches écologiques, et des biotypes ont été décrits chez les différentes espèces animales [13].

I.1.4. Caractères bactériologiques

I.1.4.1. Caractères morphologiques [1, 13, 26]

Les staphylocoques se présentent sous forme de cocci à Gram positif qui mesurent entre 0,5 et 1,2 μm , groupés en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes.

Le mode de groupement en amas (plus caractéristique après culture sur milieu gélosé) s'explique par le mode de division cellulaire des staphylocoques. Ils sont immobiles, non sporulés, généralement non capsulés.

I.1.4.2. Caractères cultureux

Les staphylocoques sont des bactéries aéro-anaérobie facultatives. La culture peut être obtenue sur milieux ordinaires mais aussi, sur milieu Chapman à 7,5% de NaCl.

La température de croissance est comprise entre 30°C et 45°C avec un optimum à 37°C. Le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum de 7,5 [10].

En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt [13].

Sur gélose, les colonies de staphylocoque sont arrondies, mesurant 1 à 2 mm de diamètre, humides, opaques, luisantes et crémeuses, à surface lisse et brillante et aux bords réguliers.

Toutes les espèces produisent un pigment insoluble dans l'eau dont la couleur peut varier de la blanche porcelaine (*S. epidermidis*) au jaune doré (*S. aureus*) [1, 13].

En milieu gélosé au sang, on peut observer une zone claire dite d'hémolyse bêta autour des colonies, due aux hémolysines produites par certaines espèces de staphylocoque, en particulier *S. aureus* [8, 13].

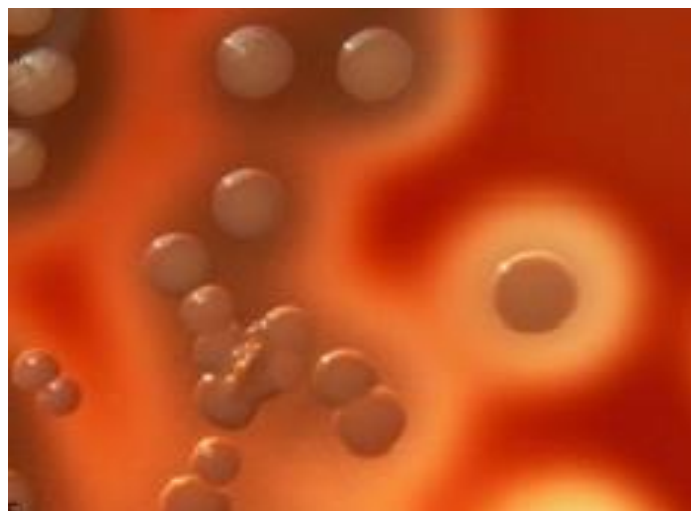


Figure 1 : Aspect de *S. aureus* sur gélose au sang avec présence d'une hémolyse bêta.

(www.bacteriainphotos.com)

I.1.4.3. Caractères biochimiques [8, 13, 26]

Les staphylocoques sont catalase positive et sont dépourvues d'oxydase en dehors de *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. caseolyticus*. Elles possèdent une enzyme (coagulase) coagulant le plasma qui permet l'identification de 99 % des souches de *S. aureus*.

S. aureus est habituellement capable de fermenter le mannitol, et possède une DNase thermostable, qui est une enzyme non toxique. Elle est un facteur de destruction des noyaux cellulaires, cette DNase est spécifique de *S. aureus*. Les staphylocoques possèdent également une uréase, d'une acétoïne, de décarboxylase, de la β -galactosidase et du nitrate réductase.

I.1.4.4. Caractères antigéniques [1, 18]

Il existe trois groupes d'antigènes somatiques chez *S. aureus* :

- Les antigènes pariétaux caractéristiques de l'espèce (le peptidoglycane, la protéine A et les acides téichoïques) ;
- Les antigènes pariétaux de type ;
- Les antigènes de surface.

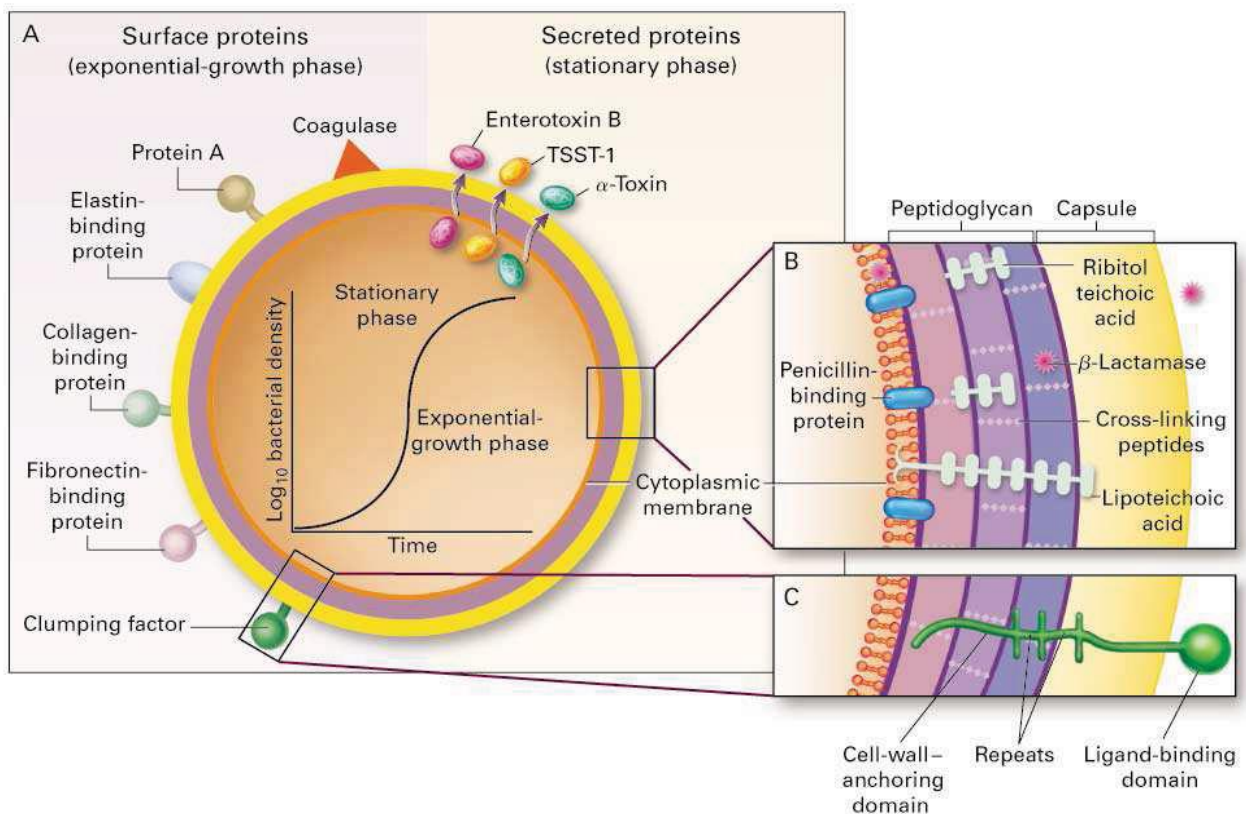


Figure 2 : Composantes antigéniques de *S. aureus* [18]

A : Protéines de surface et protéines sécrétées en fonction de la phase de croissance.

B : Organisation de la paroi bactérienne et de la capsule.

C : Détail de l'organisation du « clumping factor ».

- **Les antigènes pariétaux**

- **Le peptidoglycane**

Le peptidoglycane est constitué d'un enchaînement linéaire de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique. Il possède une activité adjuvante et mitogène sur les lymphocytes B et pourrait induire les cellules immunosuppressives. Il est reconnu comme étant responsable d'effets toxiques semblables à ceux observés avec l'endotoxine.

- **La protéine A**

Elle est une holoprotéine élaborée par 90 % des souches de *S. aureus* d'origine humaine, mais également par toutes les souches coagulase négative possédant une thermonucléase.

Sa structure est subdivisée en deux régions fonctionnellement distinctes dont la région N-terminale qui se fixe sur les IgG au niveau de leur fraction Fc. Cette propriété lui permet d'interférer avec le système immunitaire, ce qui explique son utilisation en thérapeutique pour réduire le taux des complexes immuns circulants.

Elle active le complément, déclenche la réaction inflammatoire et induit l'hypersensibilité retardée et immédiate. Elle est mitogène et cytotoxique.

- **Les acides teichoïques**

Ce sont des polymères linéaires de ribitol ou de glycérol, unis par des liaisons phosphodiester et substitués. Les acides glycérols teichoïques sont retrouvés chez tous les staphylocoques à l'exception de *S. aureus* et *S. saprophyticus* chez lesquels on retrouve l'acide ribitol teichoïque.

- **Les antigènes pariétaux de type**

Toutes les souches de staphylocoque possèdent des antigènes pariétaux de type ; ce sont ces antigènes qui sont recherchés lors des réactions d'agglutination.

- **Les antigènes de surface ou antigènes capsulaires**

Les souches de *S. aureus* peuvent posséder soit une vraie capsule, soit une pseudocapsule ou microcapsule. La capsule vraie, visible en microscopie optique après coloration négative par l'encre de Chine est retrouvée chez certaines souches.

La pseudocapsule qui est une fine couche polysaccharidique externe dénommée "Slime" n'est pas visible en microscopie optique. Il s'agit d'une substance amorphe entourant la bactérie, lui conférant une propriété d'adhésion aux surfaces extérieures. Elle se distingue de la capsule tant sur le plan morphologique que sur le plan chimique.

Cette capsule lorsqu'elle est présente peut empêcher la phagocytose.

I.1.5. Substances élaborées

Les staphylocoques, particulièrement *S. aureus* produisent une grande variété de protéines antigéniques dans le milieu extra cellulaire. Ces protéines sont douées soit d'une activité toxique, soit d'une activité enzymatique et contribuent à la pathogénicité des staphylocoques.

I.1.5.1. Enzymes staphylococciques [7, 15]

- Coagulase libre

C'est une exo-enzyme provoquant la coagulation du plasma de l'homme ou de lapin prélevé sur tube contenant du citrate, d'oxalate, d'héparine ou d'EDTA. L'action de cette coagulase est indépendante du calcium et du fibrinogène mais nécessite la présence d'un facteur appelé « coagulase-reacting-factor » qui est une globuline voisine de la prothrombine.

La coagulase libre est produite par *S. aureus*, mais également par d'autres espèces (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* et *S. schleiferi*).

- Coagulase liée ou « clumping factor »

C'est une enzyme fixée à la surface des germes. Elle se lie au fibrinogène et est responsable de l'agrégation sur lame des staphylocoques en présence de sérum.

Ce facteur d'affinité pour le fibrinogène peut être mis en évidence par contact de la souche à étudier avec des hématies de mouton ou des particules de latex recouvertes de fibrinogène. Une agglutination apparaissant en quelques secondes, est trouvée chez 98 % des souches de *S. aureus*.

Ce clumping factor ne dégrade pas le fibrinogène en fibrine. Cependant, ce test peut être positif pour certaines espèces de staphylocoque coagulase négative (*S. lugdunensis* et *S. schleiferi*).

- La fibrinolysine ou staphylokinase

Substance thermolabile et antigénique, la fibrinolysine métabolise le plasminogène en plasmine. Elle provoque la dislocation des caillots et pourrait jouer un rôle dans la formation d'emboles septiques.

- Autres enzymes

D'autres enzymes sont aussi produites par les staphylocoques : lipases, estérases, phosphatases, protéases, hyaluronidase, nucléase, lysozyme, β -lactamase.

I.1.5.2. Toxines staphylococciques [1, 7]

- **Les hémolysines ou staphylolysines**

Les hémolysines ont une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les globules rouges et les plaquettes. Quatre hémolysines différentes ont été identifiées chez les staphylocoques :

- **L'alpha-hémolysine ou alpha-toxine**

Elle est la principale hémolysine des souches retrouvées chez l'homme. Elle est produite par 80 à 90 % des souches de *S. aureus*, elle est active sur les hématies de lapin à 37°C et inactive sur les hématies humaines. L'alpha-toxine est de nature protéique, thermostable, antigénique, induisant la formation d'anticorps neutralisants.

- **Bêta-hémolysine ou bêta-toxine**

Elle est thermolabile et est observée surtout chez les souches animales. Elle est active sur les hématies de mouton.

- **Gamma-hémolysine ou gamma-toxine**

La gamma-hémolysine est constituée de deux protéines agissant en synergie. Elle présente une activité antigénique chez l'homme.

La gamma-toxine est active sur les hématies de lapin, de mouton, d'homme mais inactive sur les hématies de cheval. Elle est cependant inhibée par l'agar, certains polymères sulfatés, le cholestérol et bien d'autres lipides.

- **Delta-hémolysine ou delta-toxine**

La delta-toxine est active sur les hématies de lapin, de cheval, d'homme et de cobaye, elle est produite par la plupart des souches humaines. Cependant, elle est inhibée par le sérum sanguin, le fibrinogène et les globulines.

- **La leucocidine de Panton Valentine**

La leucocidine est constituée de 2 composants F et S qui agissent en synergie sur la membrane cellulaire. Elle agit sur les polynucléaires et les macrophages chez lesquels, elle provoque la perte de mobilité, la dégranulation, la destruction nucléaire et la lyse cellulaire.

La leucocidine est antigénique et joue un rôle important dans la formation du pus.

- **L'exfoliatine ou épidermolysine**

Il existe deux types d'exfoliatine : le type A, le plus fréquent, qui est d'origine chromosomique et le type B, qui est d'origine plasmidique. Elles sont responsables de différentes formes de staphylococcies cutanées bulleuses dont la forme typique est le syndrome de "la peau ébouillantée".

- **Les entérotoxines**

Les entérotoxines sont constituées de 8 sérotypes différents : A, B, C, C1, C2, C3, D, E. Ce sont des protéines thermostables, responsables d'intoxications alimentaires (diarrhées, vomissements, douleurs abdominales) qui apparaissent 1 à 6 heures après l'ingestion.

- **Toxine du syndrome de choc toxique staphylococcique (SCTS)**

Cette protéine, antigénique, entraîne la formation d'anticorps protecteurs présents chez 85 % des sujets adultes.

Cette toxine, comme les entérotoxines, a un effet pyrogène et est un super antigène qui entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires, ce qui entraîne la libération de plusieurs médiateurs (interleukine, interféron gamma, TNF alpha et bêta) responsables de la symptomatologie du choc staphylococcique.

- **Toxines pyrogènes**

Il existe deux toxines pyrogènes, mitogènes, aspécifiques et antigéniques d'un PM (poids moléculaire) de 12 kDa réparties en deux sérotypes A et B.

L'effet pyrogène est observé sur le lapin. Ces toxines sont impliquées dans les fièvres scarlatiniformes staphylococciques.

I.1.6. Pouvoir pathogène [1, 8]

Les staphylocoques sont responsables de nombreuses infections chez l'homme et les animaux. Ces infections sont regroupées sous le nom de staphylococcies. *S. aureus* est le germe le plus pathogène dans son genre et est responsable de la plupart des infections staphylococciques.

A l'exception des septicémies, ces staphylococcies sont très polymorphes, avec une évolution aiguë ou chronique et un pronostic bénin ou grave.

En fonction de leurs localisations, on peut noter des :

- toxi-infections alimentaires ;
- infections cutanées ou sous cutanées ;
- septicémies ;
- infections oto-rhino-laryngologiques et ophtalmologiques ;
- infections ostéo-articulaires ;
- infections uro-génitales ;
- abcès du poumon.

I.2. Les entérocoques

I.2.1. Historique [1, 19]

Les entérocoques ont été classés, pendant très longtemps au sein du genre *Streptococcus*.

Thiercelin en 1899 utilise pour la première fois, le terme d'entérocoque pour décrire un nouveau diplocoque à Gram positif isolé dans le tube digestif humain.

Andrewes et Horder en 1906 introduisent le nom de *Streptococcus faecalis*.

Schleifer en 1984 réalisa la séparation des deux genres *Streptococcus* et *Enterococcus*.

Les premières souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides (vancomycine, téicoplanine) ont été isolées en 1986.

I.2.2. Taxonomie [9, 20]

Les entérocoques appartiennent au genre *Enterococcus* et à la famille des *Streptococcaceae*.

En 1998, Monstein et al. ont proposé de subdiviser ce genre en groupes d'espèces :

- le groupe *E. avium*
- le groupe *E. cecorum*
- le groupe *E. dispar*
- le groupe *E. faecalis*
- le groupe *E. faecium*
- le groupe *E. gallinarum*
- le groupe *E. saccharolyticus*

Le genre *Enterococcus* comprend une trentaine d'espèces qui se retrouvent dans différents habitats et chez différents hôtes. On les retrouve souvent dans le tractus gastro-intestinal des humains et de plusieurs animaux. Les deux principales espèces sont *E. faecalis* et *E. faecium*.

I.2.3. Habitat [14, 19]

Les entérocoques sont de nature ubiquiste, leur capacité d'adaptation à des environnements inhospitaliers permet de les retrouver dans différentes eaux (usées, douces et de mer), dans le sol, sur les végétaux et dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux à sang chaud. Leur adaptabilité à différents écosystèmes a permis de retrouver trois clones d'*E. faecalis* et d'*E. casseliflavus* dans du lait, dans du fromage ou dans des matières fécales humaines. La plupart des espèces du genre *Enterococcus* font partie intégrante de la flore intestinale de nombreux animaux, leur concentration dans les matières fécales peut varier de 10^5 à 10^7 UFC/g. Les entérocoques les plus fréquemment isolés dans les fèces de l'homme sont *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans*.

I.2.4. Caractères bactériologiques

I.2.4.1. Caractères morphologiques

Ce sont des cocci à Gram positif, d'aspect ovoïde en diplocoques ou en courtes chaînettes, acapsulés et immobiles [25].

I.2.4.2. Caractères cultureux

- **Milieux de culture [1]**

Ce sont des bactéries non exigeantes qui peuvent pousser sur des géloses ordinaires. Leur culture est plus aisée et plus abondante que celle des streptocoques.

Elles présentent un trouble en bouillon et des colonies légèrement opalescentes de plus ou moins 1,5 mm sur gélose.

Sur gélose au sang, les colonies peuvent être non hémolytiques ou alpha-hémolytiques.

Sur milieu bile-esculine, les entérocoques se développent en hydrolysant l'esculine (halo noir).

Leur croissance est possible dans des conditions hostiles (NaCl 6,5 % ; bile ; 45°C).

Des milieux sélectifs contenant des antibiotiques (acide nalidixique ou colistine) permettent d'isoler les entérocoques dans un échantillon polymicrobien.

- **Conditions de culture [14, 19]**

E. faecalis se comporte en culture comme une bactérie aéro-anaérobie facultative et tolère l'oxygène. L'eau oxygénée, produite lors du métabolisme respiratoire est nuisible pour cette espèce dépourvue de catalase.

E. faecalis peut se multiplier à pH = 9,6 et à des températures comprises entre 10°C à 45°C et résister à un chauffage à 60°C durant 30 minutes.

I.2.4.3. Caractères biochimiques

Les entérocoques sont dépourvus de catalase et d'oxydase, ils produisent des enzymes comme la pyrrolidonyl-arylamidase (PYRA), la leucine aminopeptidase (LAP).

Les entérocoques hydrolysent l'esculine en esculetine et poussent sur milieu hypersalé à 6,5% de NaCl et sur gélose biliée à 40%.

E. faecalis et *E. faecium* (Tableau I) sont les entérocoques les plus fréquemment isolés des infections hospitalières.

Tableau I : Tests biochimiques pour identifier *E. faecalis* et *E. faecium* [1, 19]

Caractères	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
PYRA	+	+
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	-
Sorbose	-	-
ADH	+	+
Mobilité	-	-
Pigmentation	-	-
Tellurite*	+	-
Arabinose	-	+
Lactose	+	+
Raffinose	-	-
Ribose	+	+
Saccharose	+	D

* : Croissance en présence de 0,04 % de tellurite.

D : Réponse variable selon les souches.

I.2.4.4. Caractères antigéniques

Les entérocoques, comme la plupart des streptocoques, possèdent dans leur paroi un polysaccharide C dont la composition et les propriétés antigéniques permettent de définir des groupes sérologiques.

En effet, d'après Lancefield, les entérocoques possèdent l'antigène du groupe D.

I.2.5. Pouvoir pathogène [10, 25]

Les infections à entérocoque occupent une place très importante dans les infections nosocomiales.

E. faecalis et *E. faecium* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées en pathologies humaines et peuvent être à l'origine d'infections chez les patients fragilisés. Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes.

Les affections les plus courantes sont :

- les infections urinaires et les abcès abdominaux où on les retrouve seules ou en association avec les colibacilles ;
- les péritonites ;
- les infections secondaires des plaies chirurgicales surtout abdominales responsables d'abcès ;
- les endocardites lentes ou subaiguës (5 à 10 % surtout chez l'homme âgé) pouvant entraîner des bactériémies et des septicémies.

II. Rappels sur les antibiotiques

II.1. Définition [22, 26]

Un antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») est une molécule naturelle ou semi synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries.

Pour être efficace, l'antibiotique doit satisfaire à 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 synthétisées par cette bactérie.

Il existe 2 types d'antibiotiques :

- Antibiotiques bactériostatiques qui inhibent la croissance des bactéries ;
- Antibiotiques bactéricides qui détruisent les bactéries.

II.2. Classification [4, 13, 22]

II.2.1. Les β -lactamines

Leur structure chimique comprend un cycle β -lactame responsable de l'activité antibactérienne. On distingue 4 familles principales : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes. Elles bloquent la synthèse du peptidoglycane, qui est un constituant de la paroi des bactéries.

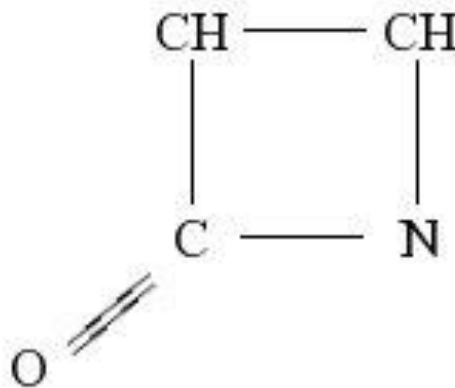


Figure 3 : Structure du noyau bêta-lactame [3].

- Les pénicillines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle thiazolidine. Dans cette sous famille, les groupes les plus importants sont : les pénicillines naturelles (les groupes G et V), les pénicillines du groupe M (exemple : cloxacilline), les aminopénicillines (exemple : amoxicilline), les carboxypénicillines (exemple : ticarcilline), les acyl-ureidopénicillines (exemple : pipéracilline) et les amidinopénicillines (exemple : pivmécillinam).

- Les céphalosporines

Elles sont constituées d'un cycle bêta-lactame accolé à un cycle dihydrothiazidique. Elles sont constituées de 5 générations : 1^{ère} génération (exemple : céfalotine), 2^{ème} génération (exemple : céfoxitine), 3^{ème} génération (exemple : céftriaxone), 4^{ème} génération (exemple : cefpirome) et 5^{ème} génération (exemple : ceftaroline).

- Les monobactames

Ils sont caractérisés par une structure monocyclique et la présence d'un groupement sulfonyle. Le chef de file est l'aztreonam.

- Les carbapénèmes

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre qui, à la différence des pénicillines, possèdent un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1, et une liaison insaturée en C₂-C₃. Elles comprennent actuellement 4 molécules : imipénème, méropénème, doripénème et ertapénème.

II.2.2. Les aminosides

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre possédant une structure aminoglycosidique. Les aminosides inhibent la synthèse protéique des bactéries en se fixant sur la sous-unité 30 S du ribosome. Les aminosides sont divisés en 3 générations : 1^{ère} génération (exemple : kanamycine), 2^{ème} génération (exemple : amikacine) et 3^{ème} génération (exemple : netilmicine).

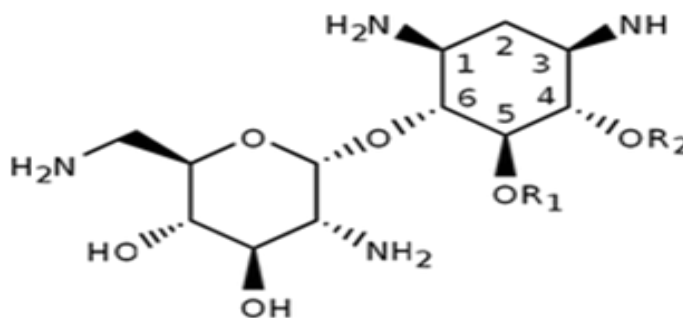


Figure 4 : Structure chimique des aminosides (<http://rover.ebay.com/rover>).

II.2.3. Macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)

Les macrolides (exemple : érythromycine), les lincosamides (exemple : lincomycine) et synergistines (exemple : pristinamycine) ont un spectre limité comprenant les bactéries à Gram positif, les cocci à Gram négatif, les mycoplasmes et les bacilles à Gram négatif anaérobies. Ils inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50 S du ribosome.

II.2.4. Les cyclines

Les principales molécules sont : la tétracycline, la minocycline et la doxycycline. Elles inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30s.

Les cyclines ont une activité bactériostatique à large spectre.

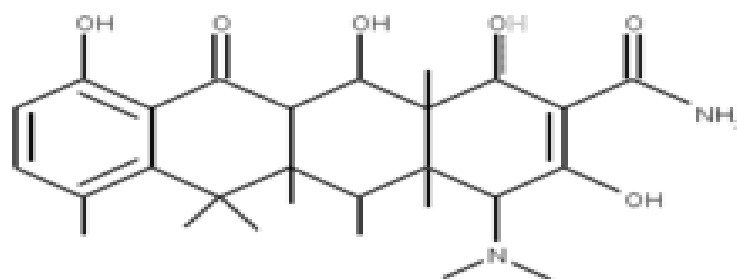


Figure 5 : Structure de base de la famille des cyclines (<http://tpe-antibiotiques.doomby.com/>).

II.2.5. Les phénicolés

Ce sont des bactériostatiques à large spectre dérivés de l'acide dichloro-acétique. Ils inhibent la synthèse protéique des bactéries en se fixant au niveau de la sous-unité 50 S des ribosomes et en empêchant la transpeptidation de l'ARN de transfert par inhibition de la polymérase responsable de cette réaction.

II.2.6. Les quinolones

Les quinolones de 1^{ère} génération ne sont pratiquement actives que sur les bacilles à Gram négatif, principalement les entérobactéries et ne sont indiquées que dans le traitement des infections urinaires (Exemple : acide nalidixique).

Les molécules les plus récentes ont une plus grande activité par leur spectre large et leur pharmacocinétique (ciprofloxacine, péfloxacin, norfloxacine, etc.). Les fluoroquinolones inhibent la synthèse des acides nucléiques par le blocage de l'ADN gyrase.

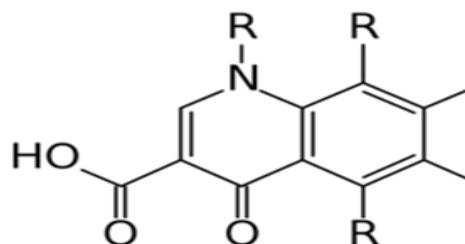


Figure 6 : Structure de base de la famille des quinolones (<http://tpe-antibiotiques.doomby.com/>).

II.2.7. Les polypeptides

Ce sont des antibiotiques bactéricides (colistine, polymyxine B). Les polypeptides agissent au niveau de la membrane cytoplasmique de certains bacilles à Gram négatif.

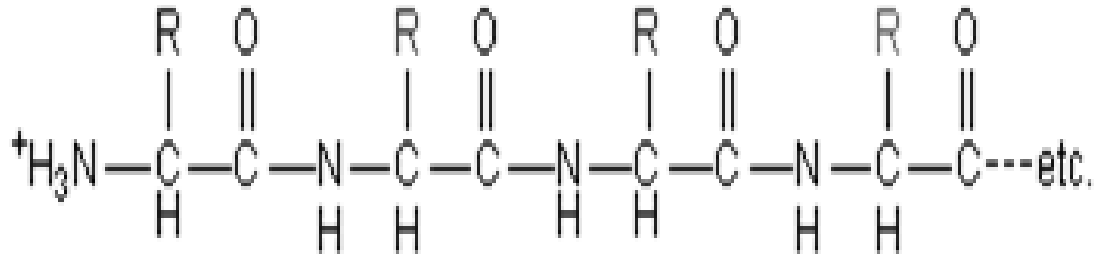


Figure 7 : Structure chimique des polypeptides (<http://tpe-antibiotiques.doomby.com/>).

II.2.8. Les sulfamides

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre (sulfadiazine, sulfaguanidine). Leur mode d'action est lié à une inhibition de la dihydroptéroate synthétase en raison d'une analogie structurale avec l'acide para-amino-benzoïque.

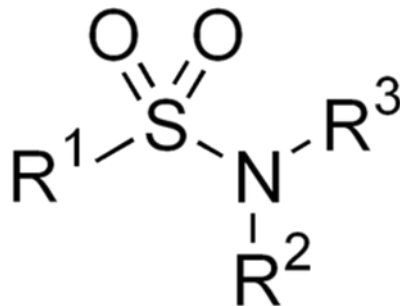


Figure 8 : Structure de base de la famille des sulfamides (<http://tpe-antibiotiques.doomby.com/>).

II.2.9. Les glycopeptides

Ce sont des antibiotiques à spectre étroit, actifs sur les bactéries à Gram positif (staphylocoques et entérocoques). Ils sont constitués par la vancomycine et la teicoplanine, et agissent au niveau de la paroi bactérienne en bloquant la polymérisation du peptidoglycane par un mécanisme complexe.

DEUXIEME PARTIE :
travail expérimental

I. Objectif de l'étude

L'objectif de notre travail est d'étudier la réduction du délai de lecture de 8 h à 6 h pour déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* et d'*Enterococcus faecalis* sur microplaques-CSB[®] en testant trois milieux de culture.

II. 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 Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'UCAD II.

III. Souches bactériennes étudiées

Cette étude a été réalisée sur deux souches de référence couramment utilisées au laboratoire :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

IV. Matériel

IV.1. Matériel pour le réisolement

- Boîtes de Pétri
- Anse de platine
- Four à micro-onde
- Etuve bactériologique

IV.2. Matériel pour la conservation

- Tubes nunc
- Portoirs
- Tubes stériles à vis
- Congélateur

IV.3. Matériel pour l'étude de la sensibilité

- Antibiotiques en poudre et en disque :
 - Pénicilline G
 - Amikacine
 - Ciprofloxacine
 - Tétracycline
 - Erythromycine
 - Gentamicine
- Boîtes de Pétri
- Eau physiologique stérile

- Eau distillée stérile
- Microplaques-CSB[®]
- Portoirs de tubes
- Tubes secs
- Anse de platine

IV.4. Milieux de culture et réactifs

- Gélose Mueller-Hinton
- Gélose Chapman
- Gélose Mueller-Hinton au sang
- Gélose BEA
- Bouillon hypersalé
- Bouillon Mueller-Hinton
- Solution de MgCl₂
- Solution de CaCl₂
- Glucose
- Pyruvate
- Rouge de phénol

V. Méthodologie

V.1. Préparation des milieux de culture

Trois types de bouillons Mueller-Hinton (BMH) ont été préparés (cf. annexe) selon les recommandations du fabricant et additionnés de glucose et/ou du pyruvate (Tableau II).

Tableau II : Composition des différents bouillons MH.

BMH + glucose	BMH + pyruvate	BMH + glucose + pyruvate
- Poudre de MH (2,2 g)	- Poudre de MH (2,2 g)	- Poudre de MH (2,2 g)
- Mg ²⁺ (125 µl)	- Mg ²⁺ (125 µl)	- Mg ²⁺ (125 µl)
- Ca ²⁺ (25 µl)	- Ca ²⁺ (25 µl)	- Ca ²⁺ (25 µl)
- Rouge de phénol (1 %)	- Rouge de phénol (1 %)	- Rouge de phénol (1 %)
- Glucose (1 g)	- Pyruvate (2 g)	- Glucose (0,5 g)
- Eau distillée (100 ml)	- Eau distillée (100 ml)	- Pyruvate (1 g)
		- Eau distillée (100 ml)

V.2. Préparation des microplaques

- **Préparation des solutions d'antibiotiques**

Les solutions d'antibiotiques étaient obtenues à partir d'une solution mère préparée par dissolution de l'antibiotique dans de l'eau distillée stérile.

Les concentrations critiques supérieure et inférieure des antibiotiques à tester étaient obtenues par dilution de leur solution mère (cf. Tableau III).

Tableau III : Concentrations critiques des antibiotiques testés.

Antibiotiques	CCI (µg/ml)	CCS (µg/ml)
Pénicilline G	0,5	32
Gentamicine	8	16
Amikacine	8	64
Erythromycine	2	8
Ciprofloxacine	2	4
Tétracycline	8	16

- **Déshydratation des microplaques**

Pour chaque antibiotique à tester, un volume de 100 µl de CCS et de CCI étaient distribués successivement dans les cupules supérieures et inférieures. Les microplaques étaient ensuite incubées à l'étuve pendant 24 heures à 40°C pour être déshydratées.

V. 3. Contrôle de qualité

- **Contrôle de stérilité des milieux**

Avant leur utilisation, les milieux BMH + glycose, BMH + pyruvate et BMH + glucose + pyruvate étaient incubés sans inoculum pendant 24 heures à 37°C.

Les milieux étaient considérés comme stériles en absence de virage du rouge de phénol (indicateur coloré).

- **Contrôle d'efficacité des milieux**

Ce contrôle était réalisé sur chaque lot de bouillon MH préparé. Une souche de référence était ensemencée sur du bouillon MH incubé à 37°C pendant 24 heures. Ainsi, pour chaque microplaque, deux cupules témoins contrôles (TC) étaient utilisées en absence d'antibiotique dont l'un contient 100 µl de l'inoculum et l'autre 100 µl du bouillon nutritif. Les milieux étaient considérés comme efficaces en cas de changement de coloration.

- **Contrôle du pH**

Le pH de chaque milieu préparé était vérifié à l'aide d'un pH-mètre et devait être compris entre $7,4 \pm 0,2$.

V.4. Détermination de la sensibilité par ABG standard

Un inoculum a été préparé à partir d'une culture pure de 18 h à 24 h, dans 2 ml d'eau physiologique pour chaque souche testée. Cette suspension était ajustée à 0,5 Mac Farland à l'aide d'un densitomètre.

L'ensemencement était réalisé par écouvillonnage (méthode de Kirby Bauer). Les boîtes étaient ensuite séchées à température ambiante pendant 15 mn.

Les disques d'antibiotique étaient déposés à l'aide d'un distributeur de disques.

Les boîtes étaient ensuite incubées à 37°C à l'étuve pendant 18 à 24 h, pour mesurer ensuite les diamètres d'inhibition. L'interprétation des diamètres a été réalisée suivant les règles édictées par le CA-SFM (version 2016).

V.5. Macrométhode d'étude *in vitro* de la sensibilité

Cette méthode permettait d'observer les profils de sensibilité des souches au plan macroscopique. La macrométhode avait permis de tester les trois milieux de BMH dans le but de valider le milieu d'étude sur les microplaques.

Pour chaque souche, 1 ml de bouillon Mueller-Hinton et 100 µl de l'inoculum bactérien (1,5 McF pour *E. faecalis* et de 4 McF pour *S. aureus*) étaient distribués dans 2 tubes secs de concentrations critiques supérieure et inférieure de l'antibiotique à tester.

Les tubes étaient ensuite incubés dans l'étuve à 37°C. Un changement de l'indicateur coloré correspondant à une croissance bactérienne était recherché chaque 2 heures pendant une durée de 6 heures.

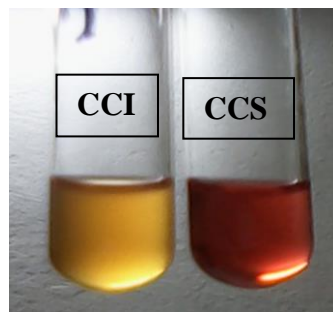


Figure 9 : Sensibilité intermédiaire d'*E. faecalis* à l'amikacine sur BMH.

V.6. Microméthode d'étude *in vitro* de la sensibilité

• Préparation de l'inoculum

La suspension était préparée en mettant quelques colonies de chaque souche à étudier dans 1 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension était ajustée de façon à obtenir 1,5 Mac Farland pour *E. faecalis* et 4 Mac Farland pour *S. aureus* avant d'être diluée au 10^{ème} à l'aide du BMH à tester pour obtenir l'inoculum final.

• Inoculation des microplaques

Un volume de 100 µl de l'inoculum bactérien était distribué dans chaque cupule. Deux cupules témoins contrôles (TC) étaient utilisées en absence d'antibiotique dont l'un contient 100 µl de l'inoculum (TC positif) et l'autre 100 µl du bouillon nutritif (TC négatif).

Les microplaques étaient ensuite incubées à l'étuve pendant 6 h à 37°C et placées sur du papier buvard imbibé d'eau pour éviter la déshydratation du milieu.

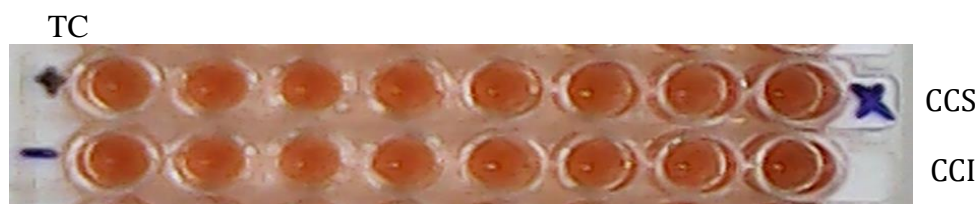


Figure 10 : Microplaques CSB[®] contenant l'inoculum avant incubation à l'étuve.

- **Lecture des microplaques**

La lecture était réalisée à l'œil nu au bout de chaque 2 h jusqu'à 6 h d'incubation ($T_1= 2$ h ; $T_2= 4$ h ; $T_3= 6$ h).

La souche était catégorisée en fonction de la présence ou d'absence de croissance :

- Sensible (S) : milieu rouge dans les cupules supérieure (CCS) et inférieure (CCI).
- Intermédiaire (I) : milieu jaune dans la cupule inférieure et rouge dans celle supérieure.
- Résistante (R) : milieu jaune dans les cupules supérieure et inférieure.

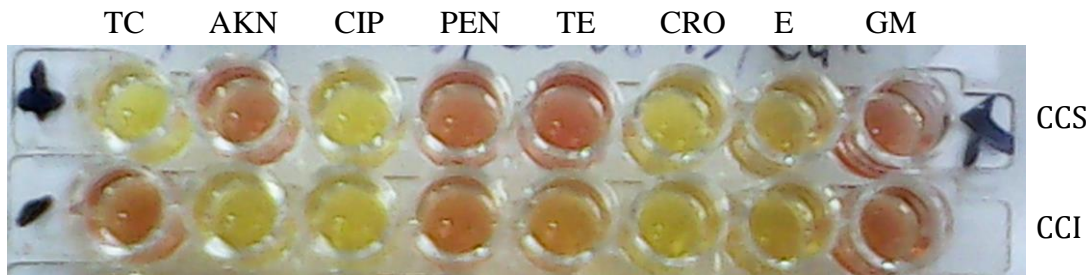


Figure 11 : Profil de sensibilité aux antibiotiques d'*E. faecalis* sur Microplaques CSB®.

V.7. La validation de la méthode

La validation a été réalisée par une corrélation entre les résultats obtenus avec la méthode d'antibiogramme standard et ceux obtenus avec la microméthode.

Pour cette étude, la corrélation était réalisée par le test exact de Fisher, à partir du logiciel "R". Le test exact de Fisher est un test statistique utilisé pour l'analyse des tables de contingence. C'est un test utilisé en général avec des faibles effectifs mais il est valide pour toutes les tailles d'échantillon.

Ainsi, pour chaque souche, nous avons établi une table de contingence entre la méthode d'antibiogramme standard et la microméthode à partir du coefficient attribué en fonction du profil obtenu (sensible = 1 ; intermédiaire = 0 ; résistant = -1).

VI. Résultats

VI.1. Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus*

VI.1.1. Résultats obtenus avec ABG standard

La souche de *S. aureus* était sensible à tous les antibiotiques testés par la méthode d'antibiogramme standard (Tableau IV).

Tableau IV : Profil de sensibilité de *S. aureus* ATCC 29213 par antibiogramme standard.

Antibiotiques	Diamètres obtenus (mm)	Limites acceptables CA-SFM 2016 (mm)	Profil
Amikacine	24	18 – 24	S
Ciprofloxacine	26	21 – 27	S
Erythromycine	26	23 – 29	S
Gentamicine	23	19 – 25	S
Pénicilline	16	12 – 18	S
Tétracycline	28	23 – 31	S

VI.1.2. Résultats obtenus avec la macrométhode

La souche de *S. aureus* était sensible à tous les antibiotiques testés. Le profil de sensibilité aux antibiotiques a été observé au bout de 6 h d'incubation avec le milieu BMH + glucose (Tableau V).

Tableau V : Profil de sensibilité de *S. aureus* ATCC 29213 sur milieu BMH + Glucose.

Antibiotiques	Durée d'incubation (h)		
	2	4	6
Pénicilline	NI	NI	S
Amikacine	NI	NI	S
Gentamicine	NI	NI	S
Erythromycine	NI	NI	S
Tétracycline	NI	NI	S
Ciprofloxacine	NI	NI	S
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	Rouge	Rouge

S : sensible ; NI : non interprétable

Le profil de sensibilité de *S. aureus* ATCC 29213 était impossible à déterminer par macrométhode, après 6 h d'incubation sur milieu BMH + pyruvate (Tableau VI).

Tableau VI : Profil de sensibilité de *S. aureus* ATCC 29213 sur milieu BMH + pyruvate.

Antibiotiques	Durée d'incubation (h)		
	2	4	6
Pénicilline	NI	NI	NI
Amikacine	NI	NI	NI
Gentamicine	NI	NI	NI
Erythromycine	NI	NI	NI
Tétracycline	NI	NI	NI
Ciprofloxacine	NI	NI	NI
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	Rouge	Rouge

NI : non interprétable

Le profil de sensibilité de *S. aureus* ATCC 29213 était impossible à déterminer par macrométhode, après 6 h d'incubation sur milieu BMH + glucose + pyruvate (Tableau VII).

Tableau VII : Profil de sensibilité de *S. aureus* ATCC 29213 sur milieu BMH + glucose + pyruvate.

Antibiotiques	Durée d'incubation (h)		
	2	4	6
Pénicilline	NI	NI	NI
Amikacine	NI	NI	NI
Gentamicine	NI	NI	NI
Erythromycine	NI	NI	NI
Tétracycline	NI	NI	NI
Ciprofloxacine	NI	NI	NI
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	Rouge	Rouge

NI : non interprétable

VI.1.3. Résultats obtenus sur microplaques-CSB[®]

La souche *S. aureus* ATCC 29213 était sensible aux 6 antibiotiques testés, au bout de 6 h d'incubation sur microplaques-CSB[®] contenant le milieu BMH + glucose (Tableau VIII).

Tableau VIII : Profil de sensibilité de *S. aureus* ATCC 29213 sur microplaques-CSB[®] contenant le milieu BMH + glucose.

Antibiotiques	Durée d'incubation (h)		
	2	4	6
Pénicilline	NI	NI	S
Amikacine	NI	NI	S
Gentamicine	NI	NI	S
Erythromycine	NI	NI	S
Tétracycline	NI	NI	S
Ciprofloxacine	NI	NI	S
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	Rouge	Rouge

S : sensible ; NI : non interprétable.

VI.2. Profil de sensibilité d'*Enterococcus faecalis*

VI.2.1. Résultats obtenus avec la méthode d'antibiogramme standard

Le profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 déterminé par la méthode d'antibiogramme standard était différent en fonction des disques testés (Tableau IX).

Tableau IX : Profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 par antibiogramme standard.

Antibiotiques	Diamètres obtenus (mm)	Limites acceptables CA-SFM 2016 (mm)		Profil
		R <	S ≥	
Gentamicine	18	12 – 18		S
Ciprofloxacine	19	19 – 25		R
Diamètres critique CA-SFM 2016 (mm)				
		R <	S ≥	
Amikacine	19	18	24	I
Tétracycline	25	21	23	S
Pénicilline	22	12	18	S
Erythromycine	12	14	23	R

VI.2.2. Résultats obtenus avec la macrométhode

Le profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 était observé au bout de 6 h d'incubation sur milieu BMH + glucose (Tableau X).

Tableau X : Profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose.

Antibiotiques	Durée d'incubation (h)		
	2	4	6
Pénicilline	NI	NI	S
Amikacine	NI	NI	I
Gentamicine	NI	NI	S
Erythromycine	NI	NI	R
Tétracycline	NI	NI	S
Ciprofloxacine	NI	NI	R
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	Rouge	Rouge

S : sensible ; R : résistante ; I : intermédiaire ; NI : non interprétable.

L'étude du profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 était impossible par macrométhode, après 6 h d'incubation sur milieu BMH + pyruvate (Tableau XI).

Tableau XI : Profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 sur milieu BMH + pyruvate.

Antibiotiques	Durée d'incubation (h)		
	2	4	6
Pénicilline	NI	NI	NI
Amikacine	NI	NI	NI
Gentamicine	NI	NI	NI
Erythromycine	NI	NI	NI
Tétracycline	NI	NI	NI
Ciprofloxacine	NI	NI	NI
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	Rouge	Rouge

NI : non interprétable

L'étude du profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 était impossible à déterminer par macrométhode, après 6 h d'incubation sur milieu BMH + glucose + pyruvate (Tableau XII).

Tableau XII : Profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose + pyruvate

Antibiotiques	Durée d'incubation (h)		
	2	4	6
Pénicilline	NI	NI	NI
Amikacine	NI	NI	NI
Gentamicine	NI	NI	NI
Erythromycine	NI	NI	NI
Tétracycline	NI	NI	NI
Ciprofloxacine	NI	NI	NI
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	Rouge	Rouge

NI : non interprétable

VI.2.3. Résultats obtenus sur microplaques-CSB®

Le profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 était observé au bout de 6 h d'incubation, à 37°C sur microplaques-CSB® avec le milieu BMH + glucose (Tableau XIII).

Tableau XIII : Profil de sensibilité d'*E. faecalis* ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose.

Antibiotiques	Durée d'incubation (h)		
	2	4	6
Pénicilline	NI	NI	S
Amikacine	NI	NI	I
Gentamicine	NI	NI	S
Erythromycine	NI	NI	R
Tétracycline	NI	NI	S
Ciprofloxacine	NI	NI	R
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	Rouge	Rouge

S : sensible ; R : résistante ; I : intermédiaire ; NI : non interprétable.

VI.3. Corrélation entre la microméthode et la méthode d'antibiogramme standard

La corrélation était réalisée par le test exact de Fisher qui est un test statistique utilisé pour l'analyse des tables de contingence.

Les résultats obtenus avec les souches *S. aureus* ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose par la microméthode et la méthode d'antibiogramme standard avaient permis d'établir les tables de contingence (Tableaux XIV et XV) à partir du coefficient attribué en fonction du profil obtenu (sensible = 1 ; intermédiaire = 0 ; résistant = -1).

Tableau XIV : Table de contingence entre la microméthode et la méthode d'antibiogramme standard pour *S. aureus* ATCC 29213 sur milieu BMH + glucose, après 6 h d'incubation.

Antibiotiques	Méthode d'antibiogramme	Microméthode
Pénicilline G	1	1
Gentamicine	1	1
Amikacine	1	1
Erythromycine	1	1
Ciprofloxacine	1	1
Tétracycline	1	1

La p-value de concordance entre les deux techniques avec la souche *S. aureus* ATCC 29213 était égale à 1, car la souche présentait un profil de sensibilité homogène aux antibiotiques testés.

Tableau XV : Table de contingence entre la microméthode et la méthode d'antibiogramme standard pour *E. faecalis* ATCC 29212 sur milieu BMH + glucose, après 6 h d'incubation.

Antibiotiques	Méthode d'antibiogramme	Microméthode
Pénicilline G	1	1
Gentamicine	1	1
Amikacine	0	0
Erythromycine	-1	-1
Ciprofloxacine	-1	-1
Tétracycline	1	1

La souche *E. faecalis* ATCC 29212 présentait une corrélation statistiquement significative entre la microméthode et la méthode d'antibiogramme standard (p-value = 0,016).

VII. Discussions

L'objectif de notre travail était d'étudier la faisabilité de la réduction du délai de lecture de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques de *S. aureus* et *E. faecalis* sur microplaques CSB®.

Notre étude portait uniquement sur 2 souches de référence (*S. aureus* ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212), constituant ainsi un faible échantillonnage.

Notre choix pour le bouillon MH supplémenté en ions (Ca^{2+} et Mg^{2+}) pour mener cette étude reposait sur des recommandations faites par différents auteurs [2, 12], dans le cadre de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques en milieu liquide. Cette méthode utilisait un indicateur coloré (le rouge de phénol) pour détecter la croissance des bactéries assimilant le glucose contenu dans les cupules des microplaques, en présence d'une CCS et d'une CCI de chaque antibiotique à tester.

La préparation de l'inoculum bactérien constituait une étape importante dans l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Le choix de standardiser la concentration finale de l'inoculum était impératif comme l'a montré une étude antérieure [21]. En effet, il y a une variation importante de la sensibilité en fonction de l'inoculum.

Une gamme de dilution de la suspension bactérienne (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 et 4 McF) a été préparée avant d'être diluée au 10^{ème} à l'aide du BMH à tester pour obtenir l'inoculum final. Pour cette étude, des inocula de très forte densité (1,5 McF pour *E. faecalis* ATCC 29212 et 4 McF pour *S. aureus* ATCC 29212) ont été retenus pour obtenir des résultats fiables. En effet, une suspension de densité plus faible ne permettait pas une lecture des microplaques après 6 h d'incubation lors de notre étude.

L'effet inoculum avait fait l'objet de plusieurs études antérieures [5, 26].

Les antibiotiques étaient choisis selon les recommandations de CA-SFM/EUCAST (2016).

L'utilisation du glucose et/ou du pyruvate par les micro-organismes conduit à la production d'acide lactique qui peut être mise en évidence par l'indicateur coloré. Ainsi, la croissance bactérienne est décelée grâce au virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune. La zone de virage du rouge de phénol doit correspondre aux variations de pH du milieu compris entre 6,8 et 8,4.

L'assimilation du glucose par les bactéries étudiées (*S. aureus* et *E. faecalis*) passe d'abord par la glycolyse avec production du pyruvate. Ainsi, pour l'optimisation des microplaques, nous avons étudié trois milieux de culture distincts : BMH + glucose ; BMH + pyruvate et BMH + glucose + pyruvate.

Les résultats obtenus avec la macrométhode ont montré que seul le milieu BMH + glucose permettait de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches étudiées, après 6 h d'incubation.

Par contre, aucune lecture n'était possible, avec le milieu BMH + pyruvate après 6 h d'incubation pour les 2 souches étudiées. L'utilisation du milieu BMH + glucose + pyruvate ne permettait pas également, la détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques, après 6 h d'incubation.

Ceci pourrait s'expliquer par la non assimilation du pyruvate par les bactéries testées, retrouvé dans ces deux milieux de culture. L'absence de virage sur le milieu BMH + glucose + pyruvate, après 6 h d'incubation pourrait s'expliquer par la faible quantité de glucose, qui était inférieur au seuil de détection de la croissance bactérienne. En effet, un milieu contenant une faible quantité de glucose ne permettait pas de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches testées, après 6 h d'incubation.

C'est la raison pour laquelle, nous avons utilisé le milieu BMH + glucose, pour étudier la faisabilité de la réduction du délai de lecture du profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* et *E. faecalis*, après 6 h d'incubation sur microplaques-CSB®.

La microméthode d'étude de la sensibilité a été validée par deux études antérieures, avec des durées d'incubation qui étaient respectivement de 16 h et de 8 h [6, 17].

En 1985, Robert et al avaient montré une concordance de 96 à 99 % entre les tests de sensibilité par méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose et ceux effectués sur microplaques sur des souches de staphylocoques [24]. En 1986, il a été découvert un nouveau système de lecture rapide (ATB rapide) mais automatisé permettant de déterminer le profil de sensibilité des bactéries au bout de 4 à 5 heures d'incubation à 37°C [23].

Les résultats obtenus durant notre étude sur les microplaques étaient comparables à ceux observés par la macrométhode sur le milieu BMH + glucose.

Après 4 heures d'incubation, aucune lecture n'était possible, même pour les témoins. Ce qui correspondait à la « phase de latence » où la croissance bactérienne était nulle, il y avait une adaptation enzymatique des bactéries à l'environnement.

Après 6 heures d'incubation des microplaques, nous avons obtenu le profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche *S. aureus* ATCC 29213 testée sur milieu BMH + glucose. Cette dernière était sensible à tous les antibiotiques étudiés. Elle présentait une excellente corrélation vis-à-vis des résultats obtenus avec l'antibiogramme standard. Cependant, la p-value n'avait pas pu être déterminée, car la souche était sensible aux différents antibiotiques testés (souche sauvage). Pour déterminer cette valeur (p-value), il est préférable de tester une souche présentant des profils de sensibilité variables aux différents antibiotiques testés (sensible, résistant et intermédiaire).

La souche *E. faecalis* ATCC 29212 présentait une bonne corrélation des résultats obtenus avec les deux techniques (microméthode et antibiogramme standard), avec p-value = 0,016.

Une étude avait montré que le profil de sensibilité des Cocci à Gram positif pouvait être déterminé sur des microplaques contenant du bouillon AM₃ (Antibiotic Medium 3) après 8 h d'incubation [6].

Les microplaques présentent néanmoins des limites, seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées par cette méthode. De plus, le nombre d'antibiotiques à tester est limité par le nombre de cupules présentes dans la microplaque. En effet, pour chaque antibiotique, il faut deux cupules (CCS et CCI).

Malgré ces limites, les microplaques présentent néanmoins des avantages. Leur coût est peu élevé. Elles nécessitent de petites quantités de réactifs. Enfin, la lecture des résultats est facile à l'œil nu, avec une interprétation directe des résultats.

CONCLUSION

L'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie et virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec a mis en place des microplaques-CSB® d'étude de la sensibilité, simples, fiables, peu coûteuses et pour un délai de lecture de la sensibilité des bactéries en 8 h.

Cette étude avait pour objectif, d'étudier la réduction du délai de lecture de 8 h à 6 h, du profil de sensibilité aux antibiotiques de *S. aureus* et *E. faecalis* sur microplaques-CSB®. Plusieurs milieux de culture ont été étudiés, afin de valider la méthode appropriée avec l'utilisation de souches de référence. L'étude portait sur 2 souches de référence (*S. aureus* ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212), à tester sur 3 milieux distincts (BMH + glucose ; BMH + pyruvate et BMH + glucose + pyruvate). Six antibiotiques, Pénicilline, Amikacine, Gentamicine, Erythromycine, Tétracycline et Ciprofloxacine ont été utilisés.

Les résultats avaient montré que seul le milieu BMH + glucose permettait de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches étudiées, après 6 h d'incubation avec la macrométhode.

Ainsi, l'étude sur les microplaques-CSB® a été réalisée avec le milieu BMH + glucose, en comparant les profils de résistance obtenus à ceux de l'antibiogramme standard, afin de corréler les résultats des deux méthodes.

Les résultats obtenus sur les deux souches de référence avaient montré une excellente corrélation entre la microméthode et la méthode d'antibiogramme standard, après 6 h d'incubation, avec une p-value = 0,016 pour la souche *E. faecalis*.

Les résultats sont encourageants, mais l'étude devrait être réalisée sur une large gamme de souches bactériennes (non exigeantes) et d'antibiotiques pour mieux corréler les profils de sensibilité obtenus sur microplaque, en comparaison avec ceux de l'antibiogramme standard.

Dans l'avenir, la prise en charge d'une infection bactérienne devrait s'améliorer, avec la disponibilité du profil de sensibilité du germe en cause, 6 h après isolement et identification de l'espèce bactérienne.

Recommandations :

- Cette étude pourrait être améliorée en utilisant une large gamme d'espèces bactériennes, d'antibiotiques et de réactifs (glucose, pyruvate, citrate, fumarate).
- Réévaluer l'effet du pyruvate dans le métabolisme glucidique des bactéries fermentaires et tous les facteurs qui y interviennent.
- Réévaluer la quantité seuil de glucose nécessaire, pour une détection de la croissance bactérienne à 6 h d'incubation sur microplaque.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H.** Bactériologie Clinique. 3^{ème} édition. Paris: ellipses; 2003.
2. **Baker CN, Hollis DG, Thornsberry C.** Antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a modified Mueller-Hinton broth. *J Clin Microbiol.* 1985 Aug; 22(2): 212–215.
3. **Bentley R, Bennett JW.** What is an antibiotic? Revisited. *Adv Appl Microbiol.* 2003; 52: 303–331.
4. **Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J.** L'Antibiogramme. 1^{ère} édition. Paris: Mpc-Videom; 1985.
5. **Diao M.** L'effet inoculum dans l'étude de la sensibilité *in vitro* des Staphylocoques aux antibiotiques. Thèse pharmacie. Dakar (Sénégal) UCAD. 2007; N°97.
6. **Diatta E.** Etude de l'effet inoculum et du temps d'incubation sur la sensibilité *in vitro* des cocci à Gram positif aux antibiotiques. Thèse pharmacie. Dakar (Sénégal) UCAD. 2008; N°101.
7. **EL Kouri D, Pottier MA, Trewick D, et al.** Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. Elsevier, Paris: *Encycl Med Chir.* 1998.
8. **Francis PT.** Les staphylocoques : abcès et autres maladies. In Assous MV, Bourhy H, Basse-Guérineau AL, Dhote R et Paugam A. Microbiologie et Pathologie Infectieuse. 2^{ème} édition. Paris: 1993; p 187–197.
9. **Galvez AA, Dauphin RD, Destain J, Campos D, Thonart P.** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2012; 16(1): 67–76.
10. **Garnier F, Denis F.** Identification et systématique bactérienne : cocci à Gram positif. In Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E et Quentin R. Bactériologie médicale. Elsevier Masson. Paris: 2007; p 251–286.
11. **Götz F, Bannerman T, and Schleider KH.** The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, et Stackebrandt E. Prokaryotes. 3rd edition. New York: 2006; p 4–75.
12. **Hansen SL, Freedy PK.** Concurrent Comparability of Automated Systems and Commercially Prepared Microdilution Trays for Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol.* 1983 May; 17(5): 878–886.
13. **Hart T, Shears P.** Bactéries et infections bactériennes. In Atlas de poche de microbiologie. 1^{ère} édition. Paris: Flammarion Médecine-sciences. 1997; p 71–226.

14. **Kayser F.** Safety aspects of enterococci from the medical point of view.
Int J Food Microbiol. 2003; 88: 255–262.
15. **Kloss WE, Bannerman TL.** Update on clinical significance of coagulase negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7: 117–140.
16. **Kloss WE, Schleifer KH.** Genus IV *Staphylococcus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore. 1986; p 1013–1035.
17. **Konaté B.** Microméthodes d'identification et étude de la sensibilité des staphylocoques, entérocoques et streptocoques : intérêt et application dans le diagnostic rapide des infections microbiennes. Thèse pharmacie. Dakar, UCAD. 2001; N°100.
18. **Lowy FD.** *Staphylococcus aureus* infections. *N Eng J Med.* 1998; 339: 520–532
19. **Manero A and Blanch A.** Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(10): 4425–4430.
20. **Monstein H, Quednau M, Samuelsson A, Ahrné S, et al.** Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology.* 1998 May; 144(Pt, 5): 1171–1179.
21. **Niasse MF.** Etude de l'effet inoculum sur la variation de la sensibilité des germes aux antibiotiques. Thèse pharmacie. Dakar (Sénégal), UCAD. 1993; N°17.
22. **Rabaud C, May T.** Glycopeptides. *Encycl Med Chir.* Maladies infectieuses. 2007; 8-004-L-10.
23. **Robert J, Gayral JP, Carret G, Flandrois JP, et al.** Rapid ATB. A new system of antibiotic testing in 4 hours. Description and parameters of variation. *Pathol Biol.* 1986; 34(5): 600–603.
24. **Robert J, Le Noc P, Carret G, Couix C, et al.** Evaluation of the Rapid-ATB system for testing the sensitivity of staphylococci to antibiotics. Comparison with the agar dilution reference method. *Pathol Biol.* 1985; 33(9): 906–910.
25. **Schlegel L et Bouvet A.** *Streptococcaceae* : *Streptococcus*, *Abiotrophia*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* et autres genres apparentés. In Freney J, Renaud F, Hansen W et Rollet C. Précis de bactériologie cliniques. 2^{ème} édition. ESKA/LACASSAGNE. 2007; p 835–890.
26. **Soussy CJ.** Antibiotiques, généralités. In Freney J, Renaud F, Hansen W et Rollet C. Précis de bactériologie cliniques. 2^{ème} édition. ESKA/LACASSAGNE. 2007; p 557–581.

Annexe

• Préparation du milieu BMH + glucose

- ☞ Mettre 22 g de poudre de MH dans 1000 ml d'eau distillée
- ☞ Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- ☞ Ajouter les ions Mg^{2+} (1,25 ml) et les ions Ca^{2+} (2,5 ml)
- ☞ Mettre le tout dans un flacon de 1 litre, bien homogénéiser.
- ☞ Mettre 10 g de glucose
- ☞ Ajuster le pH à pH final : $7,4 \pm 0,2$
- ☞ Mettre le rouge de phénol (1%)
- ☞ Mettre à l'autoclave à $121^{\circ}C$ pendant 15 minutes.
- ☞ Après stérilisation conserver à $+4^{\circ}C$.

• Préparation du milieu BMH + pyruvate

- ☞ Mettre 22 g de poudre de MH dans 1000 ml d'eau distillée
- ☞ Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- ☞ Ajouter les ions Mg^{2+} (1,25 ml) et les ions Ca^{2+} (2,5 ml)
- ☞ Mettre le tout dans un flacon de 1 litre, bien homogénéiser.
- ☞ Mettre 20 g de pyruvate
- ☞ Ajuster le pH à pH final : $7,4 \pm 0,2$
- ☞ Mettre le rouge de phénol (1%)
- ☞ Mettre à l'autoclave à $121^{\circ}C$ pendant 15 minutes.
- ☞ Après stérilisation conserver à $+4^{\circ}C$.

• Préparation du milieu BMH + glucose + pyruvate

- ☞ Mettre 22 g de poudre de MH dans 1000 ml d'eau distillée
- ☞ Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- ☞ Ajouter les ions Mg^{2+} (1,25 ml) et les ions Ca^{2+} (2,5 ml)
- ☞ Mettre le tout dans un flacon de 1 litre, bien homogénéiser.
- ☞ Mettre 5 g de glucose et 10 g de pyruvate
- ☞ Ajuster le pH à pH final : $7,4 \pm 0,2$
- ☞ Mettre le rouge de phénol (1%)
- ☞ Mettre à l'autoclave à $121^{\circ}C$ pendant 15 minutes.
- ☞ Après stérilisation conserver à $+4^{\circ}C$.