



2019-2020

Manuel des Travaux Pratiques de Bactériologie



Dr. BOUSSENA SABRINA

Institut des Sciences Vétérinaires
Département de Productions Animales
2019-2020

Table des matières

| | |
|---|----------|
| AVANT-PROPOS..... | 1 |
| TP. N° 1 : LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE..... | 2 |
| 1. Types de laboratoires de bactériologie..... | 2 |
| 1.1 Niveaux de confinement..... | 3 |
| 1.1.1 Niveau de confinement 1..... | 3 |
| 1.1.2 Niveau de confinement 2..... | 3 |
| 1.1.3 Niveau de confinement 3..... | 4 |
| 1.1.4 Niveau de confinement 4..... | 4 |
| 2. Laboratoire de bactériologie médicale de l'ISVK : les différents locaux de travail et les postes de manipulation)..... | 5 |
| 3. Règles à suivre durant les travaux pratiques..... | 6 |
| 4. Les consignes de sécurité..... | 6 |
| 5. Consignes de propreté..... | 8 |
| 6. Présentation de l'endroit de travail et du matériel..... | 9 |
| 7. Présentation et organisation des postes de manipulation stérile et de coloration..... | 9 |
| 7.1 Organisation de poste de manipulation stérile..... | 9 |
| 7.1 Organisation de poste de coloration..... | 10 |
| 8. Ensemencement et mise en culture des bactéries..... | 11 |
| 9. Préparation et utilisation des milieux de culture..... | 12 |
| 9.1 Préparation des milieux en poudre..... | 13 |
| 9.2 Types de milieux de culture..... | 13 |
| 9.2.1 Milieu sélectif..... | 13 |
| 9.2.2 Milieu électif..... | 14 |
| 9.2.3 Milieu ordinaire..... | 14 |
| 9.2.4 Milieu enrichi..... | 14 |
| 10. La stérilisation..... | 15 |
| 10.1 Chaleur sèche..... | 15 |
| 10.2 Chaleur humide..... | 15 |
| 10.3 Autres procédés de stérilisation..... | 16 |

TP. N° 2 : LES ETAPES DU DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE :

| | |
|---|----|
| I. Premières étapes du diagnostic bactériologique (étude des caractères morphologiques et culturaux)..... | 17 |
| 1. Etude des caractères culturaux..... | 17 |
| 2. Etude des caractères morphologiques..... | 19 |
| 2.1. Etat frais..... | 19 |
| 2.1.1 Mode opératoire..... | 19 |
| 2.1.2 Observation au microscope..... | 20 |
| 2.2 Techniques de coloration simple : bleu de méthylène..... | 20 |
| 2.2.1 Technique..... | 20 |
| 2.2.2 Observation..... | 20 |
| 2.3 Techniques de coloration complexe : Coloration de Gram..... | 20 |
| 2.3.1 Technique..... | 21 |
| 2.3.2 Observation..... | 21 |

TP. N° 3: LES ETAPES DU DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE (suite)°:

| | |
|---|----|
| II. Etude des caractères biochimiques..... | 22 |
| 1. Préparation de la suspension bactérienne..... | 22 |
| 2. Recherche de l'enzyme respiratoire..... | 23 |
| 2.1 Test de catalase..... | 24 |
| 2.2 Test d'oxydase..... | 24 |
| 2.3 Nitrate réductase..... | 25 |
| 3. Quelques milieux d'identification de galerie classique..... | 28 |
| 3.1 Milieux pour l'étude des métabolismes protéique, glucidique et énergétique..... | 28 |
| 3.1.1 Production d'uréase (métabolisme protéique)..... | 28 |
| 3.1.2 Milieu Kligler Hajna..... | 29 |
| 3.1.3 Milieu Clark et Lubs..... | 31 |
| 3.1.3.1. Test RM (rouge de méthyle)..... | 31 |
| 3.1.3.2. Test VP (Voges-Proskauer)..... | 31 |
| 3.1.4 Citrate de Simmons..... | 32 |
| 3.1.5 Mannitol-Mobilité..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Galeries de tests biochimiques miniaturisés (galerie Api)..... | 34 |
| 4.1 Choix de la galerie..... | 35 |
| 4.2 Mode opératoire..... | 36 |
| 4.3 Lecture et interprétation des résultats..... | 38 |
| TP. N° 4: ANTIBIOGRAMME..... | 41 |
| 1. Définition..... | 41 |
| 1.1 Limites de l'antibiogramme..... | 42 |
| 2. Antibiogramme par dilution..... | 42 |
| 2.1 Choix du milieu..... | 42 |
| 2.2 Préparation de l'inoculum..... | 43 |
| 3. Antibiogramme par diffusion..... | 44 |
| 3.1 Préparation de l'inoculum..... | 45 |
| 3.2 Choix des disques d'antibiotiques..... | 46 |
| 3.3 Choix du milieu..... | 47 |
| 3.4 Mode opératoire..... | 48 |
| 3.4.1 Ensemencement par écouvillonnage..... | 48 |
| 3.4.2 Ensemencement par inondation..... | 48 |
| 3.4.3 Application des disques..... | 49 |
| 3.5 Lecture et interprétation..... | 50 |
| 4. E-test..... | 54 |
| 5. Association d'antibiotiques..... | 55 |
| REFERENCES | 56 |

AVANT-PROPOS

Le présent manuel constitue un recueil des travaux pratiques de bactériologie destiné non seulement aux étudiants préparant leur diplôme de docteur vétérinaire mais aussi aux enseignants de l'*Institut des Sciences Vétérinaires*. Afin de s'assurer que les membres de l'équipe de bactériologie conservent, complètent et améliorent leurs compétences et ont accès à des outils appropriés pour les guider lors des travaux pratiques, nous avons soigneusement mis en place ce document avec l'essentiel des connaissances et des techniques requises en bactériologie. Concernant la formation des étudiants vétérinaire, ce manuel vise aussi à apporter, les connaissances sur un ensemble de pratiques réalisées dans le laboratoire afin d'identifier les bactéries pathogènes issues de divers prélèvements provenant d'animaux de compagnie ou de rente.

Ainsi, quatre séries de travaux pratiques ont été établies avec toute la rigueur nécessaire ainsi que l'adaptabilité exigée par les circonstances (laboratoire pédagogique) et les disponibilités (milieux de cultures et réactifs) du laboratoire de bactériologie médicale de l'*Institut des Sciences Vétérinaires*.

Un premier TP intitulé "Laboratoire de bactériologie " traite les consignes de sécurité, l'organisation et les équipements ainsi que les principales manipulations de base exercées au niveau du laboratoire de bactériologie médicale. Il est à noter que les différentes parties abordées dans cette section ont été présentées tout en accordant une importance particulière à la protection du manipulateur sans compromettre la qualité des résultats. Un deuxième et un troisième TP réunirent les renseignements relatifs aux étapes du diagnostic bactériologique et les critères à étudier afin d'identifier des bactéries pathogènes en particulier d'intérêt vétérinaire préalablement isoler au sein du laboratoire. Dans un dernier et quatrième TP, l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (réalisation de l'antibiogramme, lecture et interprétation des résultats) a été présentée d'une manière traduisant l'importance de ce test dans la pratique vétérinaire.

Enfin, il s'avère judicieux de préciser que les renseignements contenus dans le présent document ne sont pas exhaustifs ; elles feront l'objet de révisions, et toute suggestion susceptible d'améliorer le contenu sera accueillie avec grand intérêt.

| |
|---|
| TP. N° 1. LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE : Structure, organisation et manipulation |
|---|

Objectifs : familiariser les étudiants avec un laboratoire de bactériologie médicale, son équipement et son fonctionnement.

Le laboratoire de bactériologie médicale vétérinaire réalise l'étude bactériologique des prélèvements provenant d'animaux infectés. Ce qui permet :

- De confirmer le diagnostic d'infection.
- De déterminer quelle est l'espèce ou les espèces bactériennes responsables de cette infection.
- De déterminer à quels antibiotiques ces bactéries sont sensibles c'est-à-dire avec quels antibiotiques il faudra traiter l'animal pour le guérir de son infection.

1. Types de laboratoires de bactériologie

Les laboratoires de bactériologie (ou encore de microbiologie ou de biologie) sont principalement orientés vers la manipulation d'agents biologiques pathogènes ou non. Les manipulations sont réalisées dans des laboratoires dits de confinement (1-4) pour les substances pathogènes (cf. niveaux de confinement).

En bactériologie courante, les techniques mises en œuvre peuvent avoir divers buts. En bactériologie médicale, le but est d'effectuer l'isolement et l'identification des bactéries pathogènes à travers :

- l'examen microscopique : lecture au microscope optique de lames (mise au point d'état frais et de colorations (Bleu de méthylène, Gram).
- l'isolement sur milieux de culture bactérienne.
- la reconnaissance des caractéristiques d'une culture bactérienne (caractères cultureux).
- la reconnaissance des caractéristiques biochimiques d'une culture bactérienne.

En plus, la lecture et l'interprétation des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) sont couramment réalisées au sein du laboratoire de bactériologie médicale.

En bactériologie alimentaire, l'évaluation quantitative et qualitative d'une éventuelle pollution et même dans des conditions particulières, la mise en évidence de bactéries potentiellement pathogène sont les principaux objectifs recherchés.

Le contrôle de qualité (contrôle de stérilité, contrôle de qualité de substances inhibant (antibiotiques par ex.) ou favorisant la croissance bactérienne fait également partie des missions des laboratoires de bactériologie.

1.1 Niveaux de confinement

Selon le risque issu des bactéries isolées, il existe 4 niveaux de sécurité biologiques (confinement) :

1.1.1 Niveau de confinement 1

Ce niveau de confinement concerne le laboratoire de base pour la manipulation des agents du groupe de risque 1 (aucune conception spéciale, pas d'enceintes de sécurité biologique (hotte à flux laminaire).

Agents du groupe de risque 1 : Agents biologiques peu susceptibles d'infecter une personne saine ou un animal sain. Ils présentent un risque faible pour l'utilisateur et la collectivité.

1.1.2 Niveau de confinement 2

Ce niveau de confinement est adapté à la manipulation des agents du groupe de risque 2. Les principaux risques d'exposition liés à des organismes devant être manipulés en niveau de confinement 2 sont l'ingestion, l'inoculation et l'exposition de membranes muqueuses.

Les agents pathogènes traités dans un niveau de confinement 2 ne sont généralement pas transmissibles par voie aérienne, mais il est important d'éviter la production d'éclaboussures et d'aérosols qui peuvent se projeter dans l'air (manipulation dans des enceintes de sécurité biologique, port des équipements de protection personnels appropriés tels que les gants, les lunettes, etc...).

Agents du groupe de risque 2 : Agents pathogènes susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme et l'animale, mais qui constitue exceptionnellement, un danger grave pour le personnel du laboratoire, pour la collectivité, pour le bétail ou pour l'environnement. L'exposition en laboratoire provoque exceptionnellement des infections graves. Néanmoins, il existe des mesures préventives et thérapeutiques efficaces, et le risque de propagation de l'agent pathogène est limité. Les risques sont considérés comme modérés pour les utilisateurs mais faible pour la collectivité.

1.1.3 Niveau de confinement 3

Ce niveau de confinement permet la manipulation des agents du groupe de risque 3. Les agents pathogènes étudiés en niveau de confinement 3 sont transmissibles par voie aérienne même à faible dose infectieuse, qui est susceptible de provoquer des maladies graves, voire mortelles. Des barrières primaires et secondaires additionnelles sont nécessaires pour limiter la libération d'organismes infectieux dans le laboratoire et dans l'environnement. Il est par conséquent exigé une protection respiratoire appropriée, des filtres spéciaux pour traiter l'air évacué du laboratoire et un accès strictement contrôlé au laboratoire pour la prévention de la transmission de tels organismes.

Agents du groupe de risque 3 : Agents pathogènes responsables généralement d'une maladie humaine grave ou présentant de lourdes conséquences économiques, mais qui se transmet exceptionnellement par simple contact de personne à personne et qui cause rarement des maladies ne pouvant pas être traitées par des agents antimicrobiens ou antiparasitaires. Les risques sont importants pour les manipulateurs mais faibles pour la collectivité.

1.1.4 Niveau de confinement 4

C'est le niveau de confinement extrême. Il autorise la manipulation d'agents transmissibles par aérosol avec une faible dose infectieuse et entraînant des graves maladies souvent mortelles, pour lesquelles en général il n'existe pas de traitement ou de vaccin disponible. Le périmètre du laboratoire sera scellé afin d'isoler complètement l'agent infectieux (port de combinaison d'isolement de l'agent pathogène) ou bien l'agent sera maintenu dans une enceinte de sécurité biologique de niveau 3. L'air et les autres effluents produits en laboratoire doivent être décontaminés.

Agents du groupe de risque 4 : agents pathogènes entraînant généralement de très grave maladie humaine, souvent impossible à traiter, facilement transmissible par simple contact par les voies direct ou indirect, de personne à personne ou d'un animal à une personne et vice-versa. Les risques sont élevés pour les manipulateurs et pour la collectivité.

2. Laboratoire de bactériologie médicale de l'ISVK : les différents locaux de travail et les postes de manipulation

Le laboratoire de bactériologie de l'Institut des Sciences Vétérinaires d'El Khroub (ISVK) est en charge des travaux pratiques en bactériologie médicale et des cliniques des maladies infectieuses. Son activité de conseil s'étend du prélèvement des échantillons jusqu'à l'interprétation finale des résultats.

Au niveau de son bureau d'accueil, le laboratoire reçoit des prélèvements apportés par les étudiants vétérinaires, les vétérinaires praticiens, les éleveurs et les propriétaires des animaux de compagnies. Ces prélèvements utilisés comme produits pathologiques servent comme outils pédagogique pour la formation des étudiants lors des travaux pratiques et des cliniques.

Les échantillons présentant un danger biologique sont orientés vers d'autres laboratoires (zone de tri). Les échantillons ainsi acceptés sont alors identifiés par des codes enregistrés qui les suivront tout au long de leur parcours dans le laboratoire.

En fonction des examens demandés, les échantillons peuvent être analysés par colorations et observations microscopiques ou être mis en culture afin d'isoler et d'identifier par la suite les bactéries pathogènes en cause. Des tests d'antibiogramme sont éventuellement réalisés pour l'optimisation de l'antibiothérapie. Les résultats de ces analyses sont ensuite enregistrés manuellement dans un registre de laboratoire ou informatiquement. Les étudiants sous la supervision des enseignants participent aux différentes tâches de manipulations effectuées lors du diagnostic bactériologiques (microscopie, culture, identification biochimique, et tests de sensibilité aux antibiotiques).

Le laboratoire de bactériologie médicale de l'Institut des Sciences Vétérinaires d'El Khroub dispose aussi de 4 principales pièces techniques (compartiments) distinctes et suffisamment séparées, réservées exclusivement aux analyses de bactériologie ;

- la première pièce est réservée aux manipulations stériles, les colorations, les observations microscopiques, l'incubation et la conservation des produits pathologiques,
- le second compartiment (deuxième pièce) est réservé à la préparation des milieux de culture, d'identification et de conservation ...,
- le troisième compartiment est consacré à l'autoclavage et la stérilisation des déchets des manipulations.

Cette conception a été adoptée afin de respecter l'évolution du travail dans le temps et surtout de réaliser les travaux pratiques dans des conditions d'hygiène et de sécurité. Il est à noter qu'une dernière pièce (quatrième) semblable à la première dédiée aux manipulations stériles a été conçue afin de permettre à plusieurs personnes de manipuler au même temps.

Le laboratoire est munit de deux accès afin de limiter le croisement des flux.

3. Règles à suivre durant les travaux pratiques

Quels que soient le but recherché et en conséquence, les méthodes à appliquer dans le laboratoire de bactériologie (médicale et alimentaire), le bactériologiste doit impérativement respecter certaines règles essentielles :

- éviter d'être contaminé par le produit pathologique manipulé : cette règle importante doit toujours être respectée quelles que soient les bactéries en question.

- éviter de contaminer le produit pathologique manipulé : La contamination d'un poste de travail et par conséquent du produit pathologique risque de compromettre le résultat du diagnostic.

Pour répondre à ces règles impérieuses, le bactériologiste doit s'astreindre au respect de gestes précis de travail que certains auteurs ont qualifiés de « gestes rituels de la bactériologie » et d'autres, de réflexes conditionnés.

4. Les consignes de sécurité

- Porter une blouse blanche fermée et manches longue.
- Interdiction formelle de boire, manger, de fumer, de mâcher du chewing-gum... pendant les TP ou de sortir de la salle de TP sans motif valable.
- Cheveux longs attachés (flamme...) et les ongles courts.
- Ne pas manipuler les téléphones portables pendant les TP.
- Ne porter aucun bijou aux poignets et surtout aux doigts.
- Attention à l'alcool + flamme et des autres produits inflammables.
- Éviter le contact des réactifs de Gram avec la peau.
- Procéder à un lavage minutieux des mains, avec brossage des ongles avant et après les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP.
- Éviter les ouvertures des fenêtres, de portes pendant les manipulations.

- L'étudiant(e) doit éviter de se déplacer en cours de travail, il doit travailler assis(e), sans geste brusque.
- Ouvrir avec précaution dans la zone de stérilité d'un bec bunsen [un espace restreint délimité par un rayon de 10cm autour de la flamme d'un bec Bunsen réglé en intensité moyenne (flamme bleu) (cf. Fig. 1)] les récipients contenant des cultures microbiennes, afin d'éviter toute projection.
- Les tubes ou les flacons ne sont jamais tenus verticalement mais obliquement, leur ouverture dirigée vers la flamme.

Les pipettes, pipettes Pasteur ou pipettes graduées doivent être maintenues en position oblique, leurs pointes dirigées vers le bas.

- D'une façon générale et pour un manipulateur droitier, la main droite, qui maintient dans la zone aseptique l'anse de platine ou la pipette Pasteur, ne doit pas se déplacer (coude de la main droite sur la paillasse). Tout le matériel nécessaire : tubes de milieux de cultures, tubes de liquide de dilutions, tubes stériles ou lames, doit être porté par la main gauche vers la main droite (cf. Fig. 2).
- Flamber, avant et après manipulations, l'anse de platine utilisée pour les prélèvements, en commençant par chauffer la partie moyenne de l'instrument afin de dessécher les restes de culture avant de porter l'extrémité dans la flamme, ceci pour éviter toute projection.
- Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de bris d'un récipient contenant une culture, en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien.
- Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation.
- Prendre toutes dispositions indispensables pour la mise à l'abri des souches microbiennes ainsi que leur destruction afin d'éviter toute contamination.
- Vérification avec l'enseignant avant de quitter la salle des robinets d'eau et de gaz.

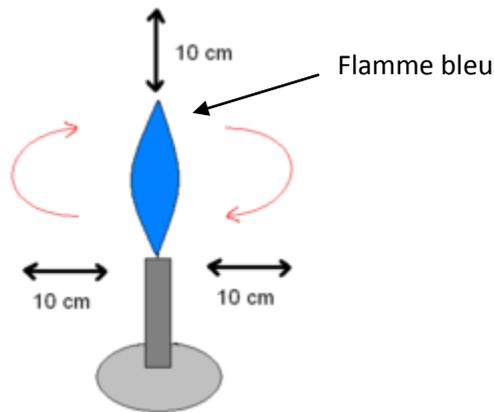


Fig. 1 : Rôles du bec bunsen.

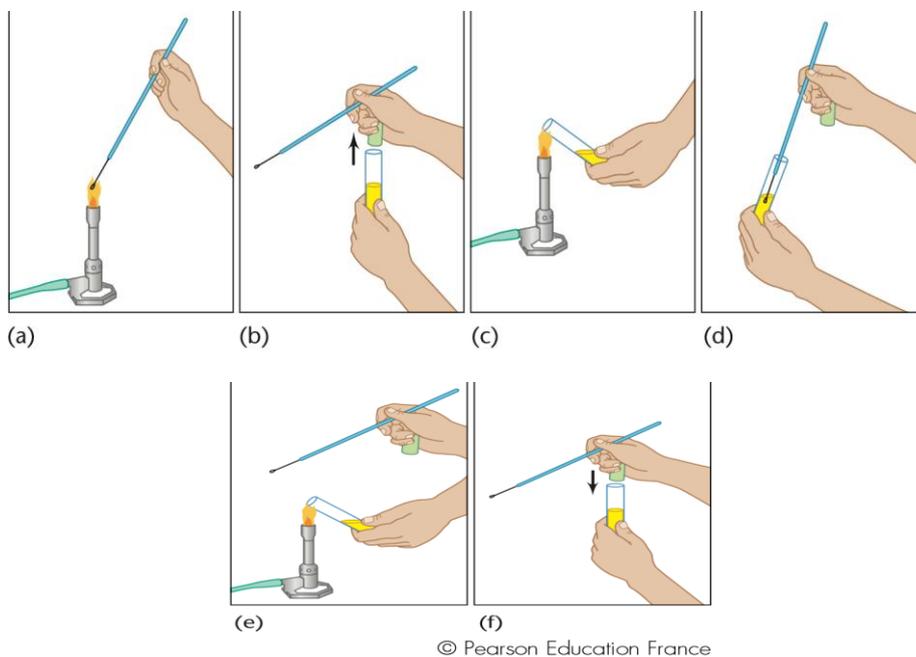


Fig. 2 : La manière de saisir l'anse de platine et le tube de suspension bactérienne.

5. Consignes de propreté

- Nettoyer les paillasses avec l'eau de Javel à l'aide d'un torchon.
- Nettoyer les éviers des colorants et remplir les pissettes d'eau et d'alcool.
- Ramener tout le matériel sur les paillasses et ranger le matériel utilisé.
- Jeter le verre et le matériel souillé (tubes à usage unique, lames...) dans le bac d'eau de Javel.
- Nettoyer les objectifs du papier joseph et de l'alcool iso-amylque et couvrir les microscopes et la loupe.

- Déposer les tubes et les boîtes de cultureensemencés dans l'étuve ou le réfrigérateur.
- Lavage minutieux des mains.

6. Présentation de l'endroit de travail et du matériel

Toutes les manipulations sont réalisées sur la paillasse. Elle doit mesurer au minimum 60 cm (90 cm) de largeur sur 1,5 m de longueur. Elle doit être recouverte d'un matériau de préférence de couleur blanche, lisse, incombustible, résistant aux antiseptiques, aux acides, aux bases et aux colorants (marbre par ex.). Toute la salle doit être bien éclairée (les reflets gênants et les lumières éblouissantes sont à éviter) de façon à éviter les ombres portées sur la paillasse. Les revêtements de sol doivent être antidérapants.

En plus de l'ameublement, du matériel informatique et de la verrerie, le laboratoire est équipé du matériel suivant :

- petit matériel : bec bunsen, anse de platine, pipettes Pasteur, micropipettes, pinces, lames, ...).
- matériel d'optique : microscopes et loupes binoculaires.
- matériel d'incubation et de conservation : incubateurs (étuves), réfrigérateur et congélateur.
- matériel de stérilisation et de décontamination : hotte à flux laminaire, autoclaves, stérilisateur et centrifugeuses.
- matériel de préparation de milieux de culture ou autre (d'identification, de transport et de conservation) : agitateurs, balance à précision, bains Marie, distillateur.

7. Présentation et organisation des postes de manipulation stérile et de coloration

7.1 Organisation de poste de manipulation stérile

Le poste de manipulation stérile est organisé de la façon suivante :

Le bec bunsen permettant d'assurer les conditions de stérilité locale indispensables à la manipulation stérile, est placé au centre du poste de travail de 15 à 30cm du bord de la paillasse de sorte à ce que le manipulateur soit à l'aise dans sa

manipulation. A droite du bec bunsen se trouvent les instruments nécessaires au travail pour un manipulateur droitier (pipettes Pasteur entreposées dans un récipient à large ouverture, anse de platine et les pinces disposés sur un portoir). Le reste du matériel est placé à gauche du bec bunsen (le produit pathologique à étudier, les boîtes de Petri placées couvercle en bas, l'eau physiologique stérile...). Derrière le bec bunsen et légèrement à droite, un récipient en matière plastique rempli d'une solution antiseptique (eau de javel par exemple) dans lequel seront déposées les pipettes Pasteur utilisées, les écouvillons et les tube à usage unique. Un gauche n'a qu'inverser les positions (cf. Fig. 3).

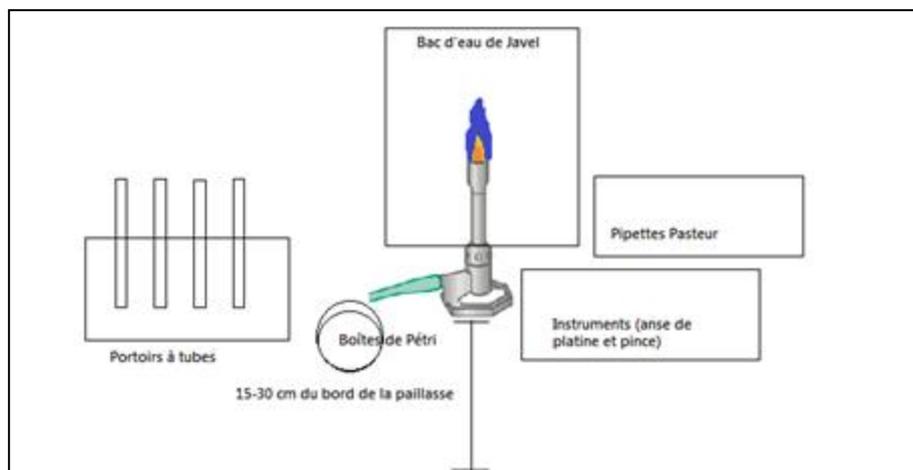


Fig. 3 : Organisation du poste de manipulation stérile.

Le travail est réalisé en position assise ce qui nécessite que tout le matériel soit disposé à portée de main. L'étudiant doit prévoir tout le matériel nécessaire avant de commencer la manipulation (tout le matériel doit être accessible sans que l'étudiant ait à se déplacer ou à être aidé par ces collègues). Il doit pouvoir manipuler sans que rien ne s'interpose entre lui et la flamme.

7.2 Organisation de poste de coloration

Quant au poste de coloration, il doit comprendre un bac à coloration surmonté d'un porte-lame (surmonté lui-même d'une pince pour saisir les lames) et tout autour de ce bac, une batterie de colorants, de mordant, des pissettes d'eau distillée et d'alcool sont placés par ordre d'utilisation. De préférence le poste de coloration doit être installé près du lavabo pour pouvoir effectuer le rinçage surtout s'il y a plusieurs lames à colorer.

8. Ensemencement et mise en culture des bactéries

L'ensemencement est le transport des bactéries dans un milieu de culture neuf et doit obligatoirement être fait dans des conditions d'asepsie totale. Les cultures sont faites en milieux liquides (enrichissement) ou en milieux solides (isolement).

Lors d'un diagnostic bactériologique, la mise en culture est toujours nécessaire. Si le prélèvement provient d'une cavité ouverte et contient par conséquent plusieurs espèces bactériennes, l'ensemencement sur milieu solide afin d'isoler les bactéries pathogènes s'avère indispensable. D'ailleurs, c'est à partir de cultures que les divers caractères biochimiques peuvent être déterminés permettant ainsi l'identification de ces bactéries.

Sur milieux de culture coulés en tubes, l'ensemencement peut se faire en stries transversales sur les milieux solidifiés inclinés (stries parallèles et serrées sur la gélose en pente sans l'érailler) ou en strie médiane (piqûre centrale) lorsqu'il s'agit des milieux en culot (ensemencement en piqûre par le fil en platine ou par une pipette Pasteur à bout fermé).

Sur milieux de culture solides coulés en boîtes de Petri, plusieurs techniques d'ensemencement peuvent être proposées : (cf. Fig. 4 et 5)

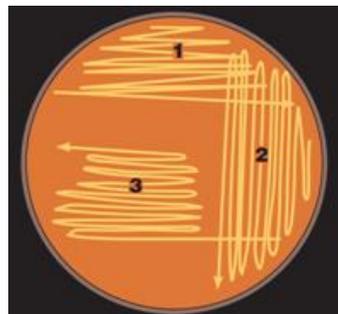


Fig. 4 : Etapes de l'ensemencement selon la technique d'isolement.

1. Prélever à l'aide de l'anse de platine une fraction de l'inoculum.
2. Ensemencer par stries fines et très serrées le premier demi-cercle.
3. Flamber l'anse de platine, laisser refroidir.
4. Ensemencer le deuxième demi-cercle.
5. Flamber l'anse de platine.
6. Ensemencer le troisième demi-cercle.

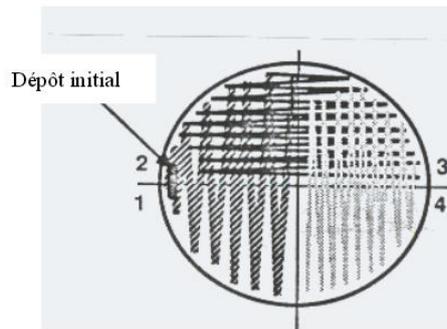


Fig. 5 : Ensemencement selon la technique des 4 séries de stries.

1. Tracer sur le fond extérieur de la boîte de petri deux diamètres perpendiculaires séparant la boîte en quatre secteurs.
2. Prélever à l'anse (stérile) la suspension ou le bouillon dans le cône stérile.
3. Avec la main gauche saisir la boîte (couvercle sur la paillasse) dans le cône stérile et déposer l'inoculum sur la surface de la gélose, étaler ensuite le prélèvement par stries très serrées dans une moitié de quadrant (quadrants 1 et 2), flamber l'anse et laisser refroidir.
4. Étaler à nouveau le prélèvement par stries moins serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 2 et 3, flamber l'anse et laisser refroidir.
5. Répéter une dernière fois l'étalement en stries encore moins serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 3 et 4.

Les milieux ainsiensemencés sont transférés à l'incubateur (étuve). La durée, l'atmosphère et les températures d'incubation doivent être respectés avec précision. La vérification de la température des incubateurs doit être un geste journalier et habituel au bactériologiste.

9. Préparation et utilisation des milieux de culture

- Les micro-organismes exigent pour leur croissance des aliments. Ces aliments leur sont fournis au laboratoire par des milieux nutritifs ou milieux de culture. Comme les besoins nutritionnels des microorganismes et les conditions de leurs développements sont très variés, il n'existe évidemment aucun milieu universel sur lequel tous les microbes soient capables de se multiplier.

- Toutefois, certains milieux conviennent au développement d'une grande variété de germes microbiens; le choix de tels milieux repose sur la connaissance de l'habitat naturel et de la physiologie alimentaire du groupe de germes que l'on désire cultiver.

- D'une manière très générale, on peut distinguer :

Les milieux sont soit liquides, soit solides. Les milieux solides présentent un grand intérêt et permettent, lorsque la technique d'ensemencement est convenable, le développement des germes en colonies apparentes, isolées les unes des autres, provenant en principe, de la multiplication d'une seule bactérie (clone) et à partir desquelles peuvent être obtenues des cultures pures.

9.1 Préparation des milieux en poudre

Matériels : distillateur, béchers, éprouvette graduée, thermomètre, agitateur magnétique, balance à précision, autoclave, bec bunsen, boîtes de Petri, des tubes à vis ou cotonnés stériles, pince en bois ou gants.

Mode opératoire :

- Peser la masse nécessaire de poudre pour un volume (ml) d'eau distillée.
- Dissoudre la poudre dans le diluant à l'aide de l'agitateur magnétique et chauffer jusqu'à l'ébullition.
- Laisser refroidir la préparation dans le cône stérile du bec bunsen.
- Lorsque la préparation a atteint une température inférieure à 60°C, verser dans des flacons et stériliser à l'autoclave (sauf indication) à 120°C pendant 20 min.
- Lorsque la préparation a atteint de nouveau une température inférieure à 60°C, coulé dans des boîtes de Petri ou des tubes à vis stériles.
- Après refroidissement et pour éviter que l'eau de condensation dans les boîtes de Petri perturbe la surface du milieu gélosé, on place les boîtes en position retournée.

9.2 Types de milieux de culture

9.2.1 Milieu sélectif

Un milieu de culture est dit sélectif pour une espèce microbienne lorsque seules les exigences nutritives et les conditions de développement spécifiques de cette espèce sont satisfaites. En modifiant différents facteurs, il est donc possible d'orienter un milieu pour que la croissance d'une espèce de bactérie soit favorisée et que les autres voient leur développement entravé voir inhibée.

L'effet sélectif est obtenu en jouant sur les facteurs physico-chimiques (tels que pression osmotique, pH, ...) ou par l'action bactériostatique ou bactéricide de certaines substances telles que : sels minéraux (azide de sodium, tellurite de sodium, ...) ; substances organiques (eau peptonée phéniquée) ; ou des substances colorantes (vert brillant, vert malachite, cristal violet, ...).

Ils sont utilisés pour isoler les germes de produits poly-microbiens. La nature des inhibiteurs est variable, il peut s'agir :

- de NaCl : milieu de Chapman à 75‰ pour *Staphylococcus*, bouillon hypersalé à 65‰ pour *Enterococcus*.
- de sels biliaires (désoxycholate) : Mac Conkey, Hektoen pour Enterobacteriaceae.
- d'antibiotiques: gélose au sang + ANC (acide nalidixique, colistine) pour les *Streptococcus*.
- d'antiseptiques : gélose au cétrimide pour *Pseudomonas*.

9.2.2 Milieu électif

Un milieu électif est un milieu sur lequel apparait une culture abondante et rapide de certaines bactéries, alors que la plupart des espèces bactériennes s'y développent peu et lentement.

9.2.3 Milieu ordinaire

Un milieu ordinaire est un milieu comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne, sous une forme utilisable par des bactéries n'ayant pas d'exigence nutritive particulière (bactéries non exigeantes).

La composition de ces milieux est simple et sans effet de sélection. Un exemple de milieu ordinaire pourrait être la gélose nutritive.

9.2.4 Milieu enrichi

Il contient, outre les composants de base, des composants indispensables aux bactéries, que celles-ci ne peuvent pas synthétiser. C'est un milieu utilisé pour l'obtention des bactéries dites exigeantes. Par exemple : les milieux au sang frais (le sang est riche en nutriments divers). Les milieux avec du sérum, du jaune d'œuf.

10. La stérilisation

- La stérilisation est l'opération qui consiste à éliminer les micro-organismes d'un objet, et ce de manière durable.
- En bactériologie, le but de la stérilisation est d'une part de maîtriser les micro-organismes introduits dans le milieu d'étude, et d'autre part d'éviter la contamination du milieu extérieur et des personnes.
- Il existe deux grands moyens de stérilisation : 1. La chaleur 2. La filtration.
Concernant la stérilisation par la chaleur : la chaleur détruit les bactéries et les spores. On distingue les procédés à chaleur « sèche » ou « humide ».

10.1 Chaleur sèche

a). Flambage : c'est le passage dans la flamme (bec Bunsen) de la surface de matériel non inflammable assure une parfaite stérilisation. On stérilise de cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur.

b). Four pasteur ou stérilisateur: C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé à 180°C pendant 90 minutes. Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériels métalliques (instruments de dissection, ...) pouvant tolérer de très hautes températures.

Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans le stérilisateur jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières.

10.2 Chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités : la stérilisation à l'autoclave, la pasteurisation et la tyndallisation.

a). Autoclave : c'est un appareil indispensable dans un laboratoire de microbiologie. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 120°C pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients. Ce procédé tue toutes les cellules végétatives et les endospores.

b). Pasteurisation : la pasteurisation est un traitement à chaud de liquides, tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.

c). Tyndallisation : La tyndallisation est une série de 3 chauffages brefs à des températures de 70°C à intervalles réguliers, ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant.

10.3 Autres procédés de stérilisation

Certaines matières (plastiques, caoutchous ...) ne tolèrent pas l'autoclave ou se détériorent rapidement après des expositions répétées à la chaleur.

a). Radiations : La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection (hotte à flux laminaire). Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. D'autres radiations (rayons X), peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Petri en matière plastique et de produit pharmaceutiques.

b). Agents chimiques : Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

TP. N° 2. LES ETAPES DU DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

I. Premières étapes du diagnostic bactériologique (étude des caractères morphologiques et culturels)

Objectifs : Mise en évidence des bactéries à partir de prélèvements (Isolement et purification) par l'étude des caractères culturels et morphologiques.

Il faut au préalable faire :

- L'isolement et la purification des souches sur des milieux sélectifs (utiliser une souche de staphylocoques et une autre d'entérobactéries).

Après 24h d'incubation, les cultures sont purifiées. La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'aspect...

- Conservation des souches

Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, les souches isolées et purifiées sont conservées au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation (2 semaines maximum).

1. Etude des caractères culturels

Le polycopié de systématique bactérienne (cf. cours de Dr. Boussena) donne pour chaque espèce bactérienne d'intérêt vétérinaire étudiée, les aspects caractéristiques de sa culture sur les milieux de cultures (liquide et surtout solide). Il est par conséquent impératif de connaître ces détails car ils vont servir d'indices d'orientation pour le choix des tests ultérieurs.

Sur milieu liquide, il sera noté la présence : de trouble plus au moins important, d'un dépôt (en mie de pain, glaireux ...) ou d'un voile.

En revanche, sur les milieux de culture solide seront notés : l'abondance de la culture et son délai d'apparition, les caractéristiques des colonies isolées et éventuellement, la présence de pigments soluble (*Pseudomonas*) ou insoluble (*Serratia*).

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. Cette étude est basée sur des observations à l'œil nu et macroscopiques permettant de différencier les caractéristiques des souches étudiées (l'aspect de colonies caractéristiques de chaque espèce bactérienne est un des premiers critères d'identification).

Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées : les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées.

-Examen macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies sous la loupe binoculaire permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (examen facilité sous différents angles d'éclairage). Les éléments d'identification macroscopiques sont :

1- La **forme** des colonies : rondes, irrégulières,...etc.

- Allure du contour: bords lisses réguliers ou irréguliers, dentelés, déchiquetés pouvant même présenter parfois des prolongements (tête de méduse).
- Relief: surface bombée, demi-bombée, plate.
- Centre: parfois surélevé, parfois ombiliquée (en creux).

2- La **taille** des colonies par la mesure du diamètre : punctiformes ou de taille mesurable. La taille d'une colonie ne peut être appréciée que si elle est suffisamment isolée (les colonies serrées les une contre les autres n'atteignent pas leur taille maximale). Il ne faut pas tout de même oublier que certaines bactéries donnent des colonies qui s'étalent en vieillissant. Par conséquent, les colonies ne sont comparables quant à leur taille que dans les zones du milieu de culture présentant une densité de culture identique.

3- La **couleur** de la colonie et l'opacité (opaque, translucide ou transparente...). La transparence des colonies doit être appréciée en lumière naturelle et artificielle. Certaines colonies élaborent des pigments ce qui représente un élément précieux d'identification (ex. colonies jaune doré pour *Staphylococcus aureus*).

4- L'**aspect** : colonie lisse (S pour smooth), rugueuse (R pour rough) ou muqueuse (M).

5- l'**odeur** dégagée par l'ensemble de la culture.

6- l'**adhérence** appréciée par raclage à l'aide de l'anse de platine.

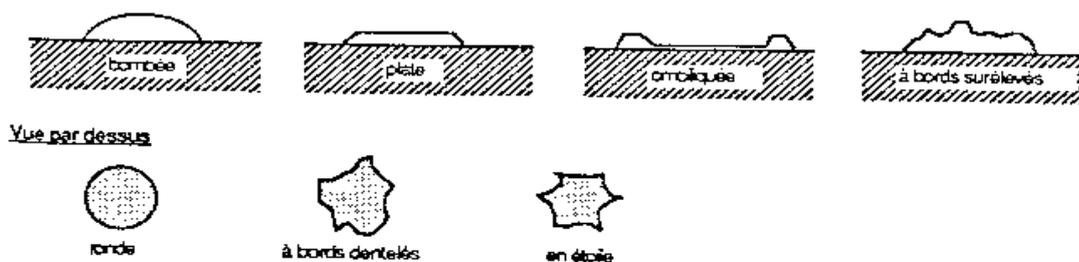


Fig. 6 : Formes de colonies.

2. Etude des caractères morphologiques (aspect microscopique)

2.1. Etat frais

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et surtout la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait sur microscope optique.

2.1.1 Mode opératoire

- Déposer une goutte d'une suspension bactérienne (de 1 à 10 colonies placées dans 5 ml de l'eau physiologique) sur une lame de verre (Fig. 7(a)).
- Recouvrir la goutte d'une lamelle couvre objet (la suspension ne doit pas déborder les contours de la lamelle) (Fig. 7(b)).
- Fixer la lamelle avec 4 perles de paraffine fondue (Fig. 7(b)).
- Luter la lame avec de la paraffine fondue (Fig. 7(c)).
- Observer immédiatement au microscope (objectif x40, condenseur non relevé au maximum, diaphragme non complètement ouvert).
- Après observation jeter immédiatement la lame dans un bocal contenant de l'eau de Javel.

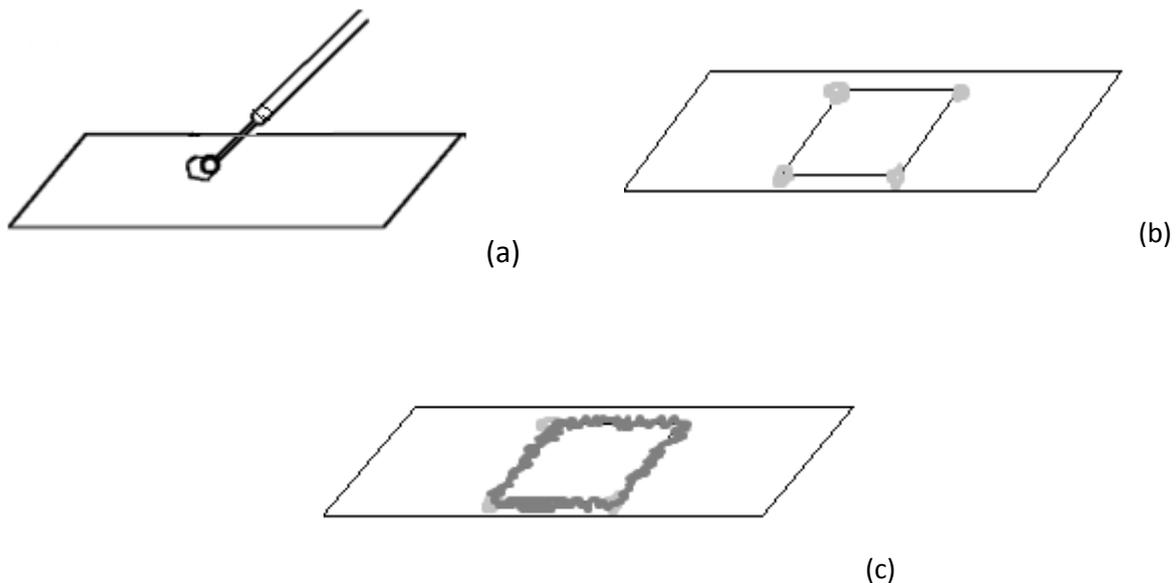


Fig. 7 : Etapes de l'état frais.

2.1.2 Observation au microscope

Elle se fait en lumière blanche, éclairage direct de la préparation. Condensateur baissé si le microscope le permet. Diaphragme fermé (lumière minimale). Objectif x 40 à sec (sans huile). Pour la mise au point, l'objectif est à environ 1 mm au-dessus de la lamelle.

2.2 Techniques de coloration simple : bleu de méthylène

2.2.1 Technique

- Faire un frottis des bactéries sur une lame propre et sèche : avec une anse on étale doucement un peu de suspension bactérienne sur le milieu de la lame.
- Sécher.
- Fixer à l'alcool et rincer à l'eau, ou fixer à la flamme en passant la lame trois fois dans la flamme du bec Bunsen réglé en flamme éclairante (virole fermée).
- Recouvrir d'une solution de bleu de méthylène pendant une minute.
- Rincer et sécher entre deux papiers-filtres.
- Éliminer l'humidité résiduelle au-dessus de la veilleuse du bec Bunsen.

2.2.2 Observation

Les bactéries sont tuées, fixées sur la lame et colorées. Condensateur monté jusqu'à la lame si le microscope le permet. Diaphragme ouvert (maximum de lumière). Objectif x 100 à immersion (avec huile). Pour la mise au point, l'objectif trempe dans la goutte d'huile. Nettoyer au papier Joseph après utilisation de l'objectif.

2.3 Techniques de coloration complexe : Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement (mode d'assemblage), la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une enveloppe externe sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-), alors que celles qui n'en possèdent pas vont retenir le colorant (Gram+).

La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif.

2.3.1 Technique (cf. Fig. 8)

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir au violet de Gentiane (cristal violet) pendant 1min. Eliminer l'excès par l'eau courante;
- Ajouter du Lugol (mordant) et appliquer pendant 1min, jeter l'excès par l'eau courante;
- Traiter à l'alcool 95° pendant quelques secondes (10-15 secondes), puis rinçage à l'eau;
- Recolorer à la Fuschine (safranine) pendant 60 à 75 secondes, rinçage à l'eau puis séchage.

Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.



Fig. 8 : Etapes de la coloration de Gram.

2.3.2 Observation

L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion et au plus fort grossissement (grossissement : objectif x 100) en lumière blanche (lumière maximale).

TP. N° 3. LES ETAPES DU DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE (suite) :

II. Etude des caractères biochimiques

Objectifs : Identification des bactéries à partir de prélèvements préalablement ayant subis l'isolement et la purification, par l'étude des caractères biochimiques.

En plus de l'étude des caractères morphologiques et culturaux, on identifie aussi une bactérie en observant si elle utilise tel ou tel substrat. On la met donc en contact dans un milieu de culture avec un glucide, ou un peptide, ou d'autres substrats plus complexes. En général, l'utilisation d'un substrat est révélée par le virage d'un indicateur de pH (par exemple : un glucide utilisé donne un produit acide, un peptide donne un produit basique, etc..) mais toujours appréciée à l'œil nu.

Chaque espèce de bactéries a des caractères propres, on peut donc les rassembler facilement avec des caractéristiques de base comme l'utilisation du glucose avec ou sans oxygène, la réduction des nitrates, etc. La combinaison de différents résultats obtenus permet de définir le profil métabolique de la bactérie analysée ce qui permet de l'identifier (on ne peut conclure à une identification que sur un ensemble de caractères).

Pour que les résultats de l'étude des caractères biochimiques soient interprétables, certaines conditions doivent être respectées :

-La pureté de la souche doit être vérifiée : l'identification doit être effectuée à partir d'une colonie isolée prélevée sous la loupe (possibilité d'avoir deux colonies qui se développent l'une sur l'autre). Il faut pratiquer un nouvel isolement à partir de la suspension bactérienne utilisée pour l'ensemencement de la galerie d'identification afin de déceler une éventuelle contamination en cours de travail.

Les repiquages fréquents et les transferts en milieux liquides doivent être évités avant l'identification, en raison des possibilités de mutations qu'ils entraînent.

1. Préparation de la suspension bactérienne

Les colonies (de forme, de taille, de couleur et d'aspect variables d'une bactérie à une autre) sont par définition des amas de bactéries toutes identiques issues d'une cellule originelle. Il arrive parfois qu'une colonie soit mixte, formée de deux colonies différentes superposées provenant de deux cellules bactériennes réunies au même endroit.

La purification devrait précéder toute identification bactérienne entreprise à partir d'une colonie isolée.

La méthode de suspension directe est une méthode de remplacement pratique pour préparer l'inoculum de certaines bactéries exigeantes ou non (ex. : streptocoques, staphylocoques dorés...etc.). Les étapes suivantes sont alors réalisées pour préparer une suspension bactérienne :

1. Repiquer une colonie bien isolée de la bactérie à étudier sur une gélose sang et laisser incuber 18 à 24 heures.
2. À l'aide d'une anse de platine, racler, au minimum, de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques de la bactérie étudiée et ensemercer dans un tube contenant de 4 à 5 ml d'un bouillon nutritif stérile (tel que Medium Api) ou dans une solution saline stérile (utilisée surtout pour l'ensemencement de la galerie classique d'identification).
3. Le bouillon de culture est incubé à 35°C jusqu'à l'apparition d'une turbidité égale ou supérieure à la turbidité du tube étalon 0,5 de McFarland (en général, délai de 2 à 6 heures) (cf. TP antibiogramme).
4. Ajuster la turbidité du bouillon de culture en phase de croissance avec de la saline stérile (sérum physiologique) ou du bouillon stérile pour obtenir une turbidité optiquement comparable à celle du tube étalon 0,5 de Mc Farland (approximativement $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/ml pour *E. coli* par ex.). Le tube étalon est agité à l'aide d'un agitateur électrique avant l'ajustement.

Remarque : En cas d'utilisation d'une solution saline stérile, la turbidité doit être ajustée dès le début et l'incubation est à proscrire.

Pour effectuer cet ajustement de turbidité, on peut utiliser la comparaison visuelle. La méthode visuelle consiste à comparer visuellement le bouillon de culture en phase de croissance et le tube étalon en les plaçant devant une série de lignes noires sur un fond blanc en présence d'une source de lumière adéquate.

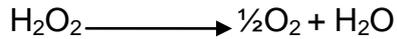
5. L'inoculum bactérien devrait être ensemercé sur les milieux d'identification au cours des 15 minutes qui suivent l'ajustement de sa turbidité.

2. Recherche de l'enzyme respiratoire

Des tests d'orientation rapides sont réalisés en fonction du Gram et des résultats des caractères morphologiques et culturels.

2.1 Test de catalase

C'est une enzyme décomposant l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux.



La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier (ex. les staphylocoques pour les Gram + et les entérobactéries pour les Gram -) sur l'extrémité d'une anse de platine que l'on plonge ensuite dans une goutte d'eau oxygénée (à l'aide d'une pipette Pasteur). Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme (cf. Fig. 9).

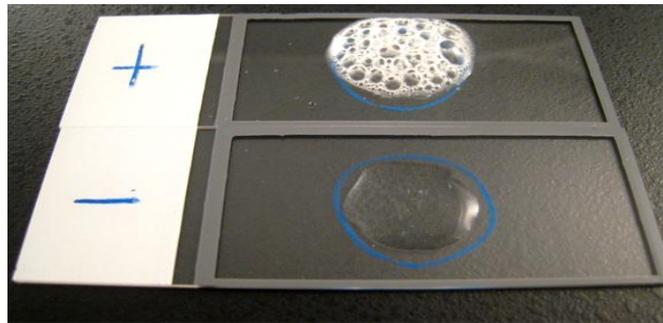


Fig. 9 : Test de catalase.

2.2 Test d'oxydase

Appelé aussi phénylène diamine oxydase est une enzyme intervenant dans divers couples d'oxydo-réduction. Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram (-).

Placer un disque d'oxydase sur une lame propre et stérile. Déposer à l'aide d'une pipette Pasteur (il est strictement interdit d'utiliser l'anse de platine pour ne pas fausser le résultat) une goutte de suspension bactérienne pure sur " un disque oxydase", celui-ci contient de l'oxalate de diméthyl paraphénylène diamine. Les bactéries oxydase-positives donnent rapidement une coloration violette foncée ; dans le cas contraire, il n'y a pas de coloration (cf. Fig. 10).



Fig. 10 : Test d'oxydase.

2.3 Nitrate réductase NR

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne.

Ce test consiste à mettre en évidence les nitrites ou la disparition des nitrates initiaux. Elle utilise deux types de réactifs (réactifs de Griess) : l'acide sulfanilique (nitrite 1) et l' α -naphtylamine (nitrite 2) en solution (dans l'acide éthanoïque). (cf. Fig. 11a et 11b)



La recherche peut s'effectuer à partir de milieu gélosé nitraté, de bouillon nitraté ou à partir du milieu mannitol mobilité.

La coloration rouge témoigne la présence des nitrites dans le milieu (NR+).

Si le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que le nitrate réductase vis à vis des nitrates.

Présence de coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. Résultat NR-.

Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat NR+ au stade azote.

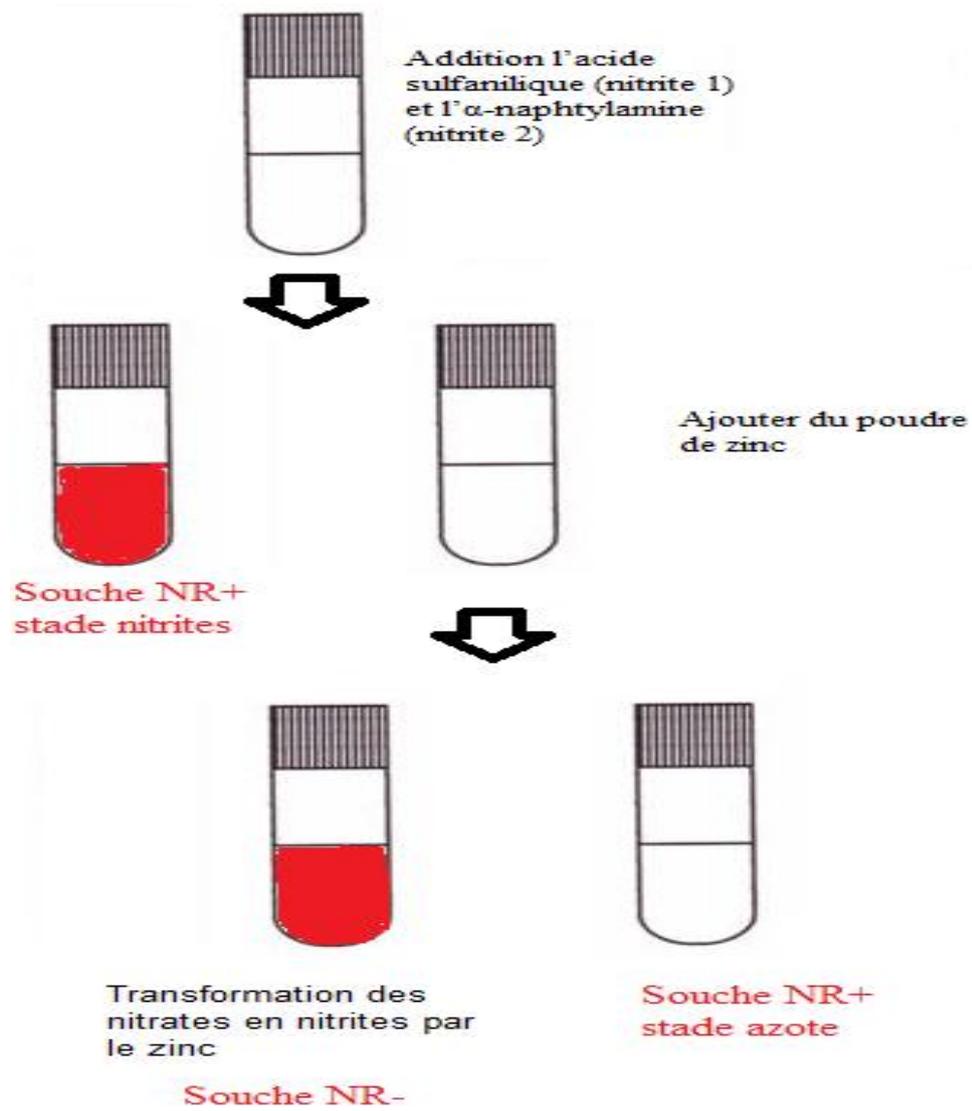


Fig. 11 (a) : Test du nitrate réductase.

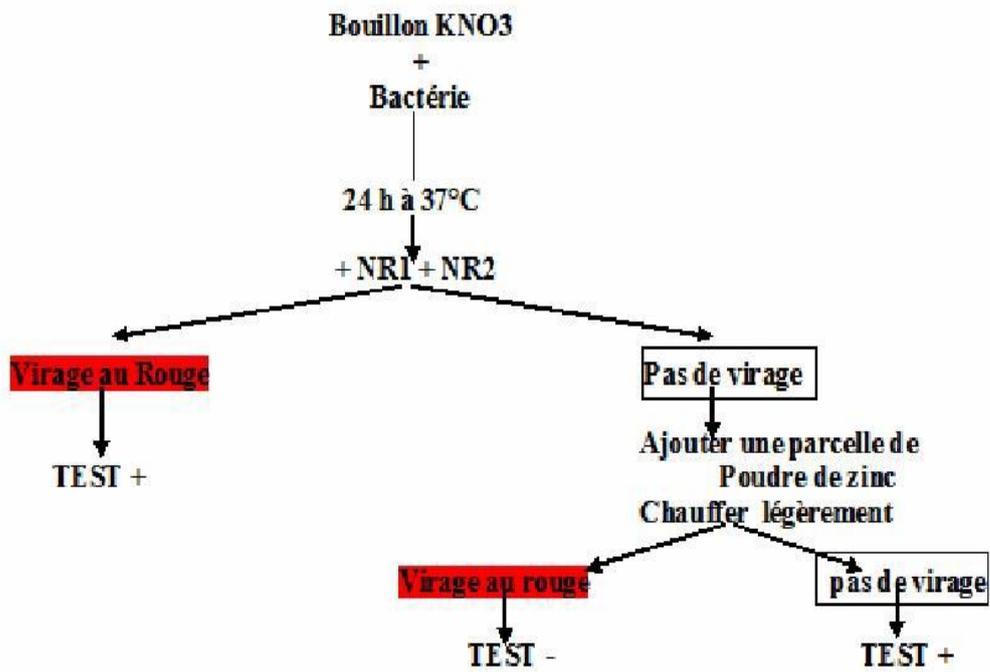


Fig. 11(b) : Test de nitrate réductase.

3. Quelques milieux d'identification (galerie classique)

Les tests biochimiques abordés dans le présent manuel correspondent à la galerie classique des bactéries Gram négatif. Il est a rappelé que cette liste n'est pas exhaustif et que elle a été choisi en fonction des tests disponibles au niveau du laboratoire pédagogique. Compte tenu des changements possibles de la disponibilité des tests biochimiques au niveau du laboratoire pédagogique, l'enseignant chargé des travaux pratiques peut développer d'autres tests non abordés dans le présent manuel ainsi que leur contexte de réalisation (coagulase, lipase, DNase, ...).

3.1 Milieux pour l'étude des métabolismes protéique, glucidique et énergétique

3.1.1 Production d'uréase (métabolisme protéique)

Les milieux synthétiques les plus couramment utilisés "Urée-Indole" de Ferguson sont ensemencés avec des souches isolées sur milieux gélosés (ne jamais utilisé des souches cultivées sur géloses).

La culture est effectuée sur urée- indole (exempte d'indole) à partir d'une colonie de la souche à étudier et incubée par la suite 24-48h à 37°C.

Le milieu urée-indole est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens, notamment parmi les *Enterobacteriaceae*.

L'uréase, enzyme hydrolysant l'urée, activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation (virage spontané). La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium: uréase+.

Après la lecture de l'urée, on procède à la lecture de l'indole sur le même tube.

Certaines bactéries dégradent le tryptophane (présent dans la plupart des protéines) en indole grâce à une tryptophanase.

Tryptophane \longrightarrow Indole+ Pyruvate+ NH₃

L'indole produit est révélé par des réactifs divers (virage non spontané nécessitant l'addition de réactif), le plus utilisé est le réactif de Kovacs. La culture est additionnée de réactif de Kovacs (contenant le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde qui réagit avec l'indole); si l'espèce bactérienne est indole (+), un anneau rouge apparaît à la surface du milieu ; si au contraire elle est indole (-), il y a un anneau jaune ou le milieu demeure inchangée.

3.1.2 Milieu Kligler Hajna

Le milieu Kligler-Hajna permet de mettre en évidence la production d'H₂S (métabolisme protéique), la recherche de la de la β-galactosidase en 2ème jour et la fermentation des glucides (glucose et lactose)

C'est un milieu est conditionné en tubes avec une pente et un culot. C'est un milieu complexe (cf. Tab.1), qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des Enterobacteriaceae. Il est ensemencé de la manière suivante :

Ensemencer abondamment la surface par stries serrées ou par inondation, puis le culot par simple piqûre, à l'aide de la même pipette boutonnée (pipette à bout fermée). Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la capsule (le bouchon) afin de permettre les échanges gazeux. Mettre à l'étuve 18-24h à 37°C.

Tab. 1 : Composition du milieu Kligler-Hajna (pH=7,4-7,5).

| Composant | Quantité |
|---|----------|
| Extrait de viande de bœuf | 3g |
| Extrait de levure | 3g |
| Peptone (riche en lysine) | 20g |
| NaCl | 5g |
| Citrate ferrique | 0,3g |
| Thiosulfate de sodium | 0,3g |
| Lactose | 10g |
| Glucose | 1g |
| Rouge de phénol (solution à 1%) comme indicateur du pH | 5mL |
| Agar | 12g |
| Eau distillée (qsp) | 1L |

a)- Principe de la lecture de la fermentation des glucides :

Le milieu de Kligler contient 2 glucides: glucose et lactose (10 fois plus de lactose que de glucose). Les entérobactéries utilisent d'abord le glucose et ensuite, éventuellement le lactose. La production de gaz se traduit par l'apparition de bulles au niveau du culot, ou encore par la formation d'une poche qui décolle complètement le milieu du fond du tube.

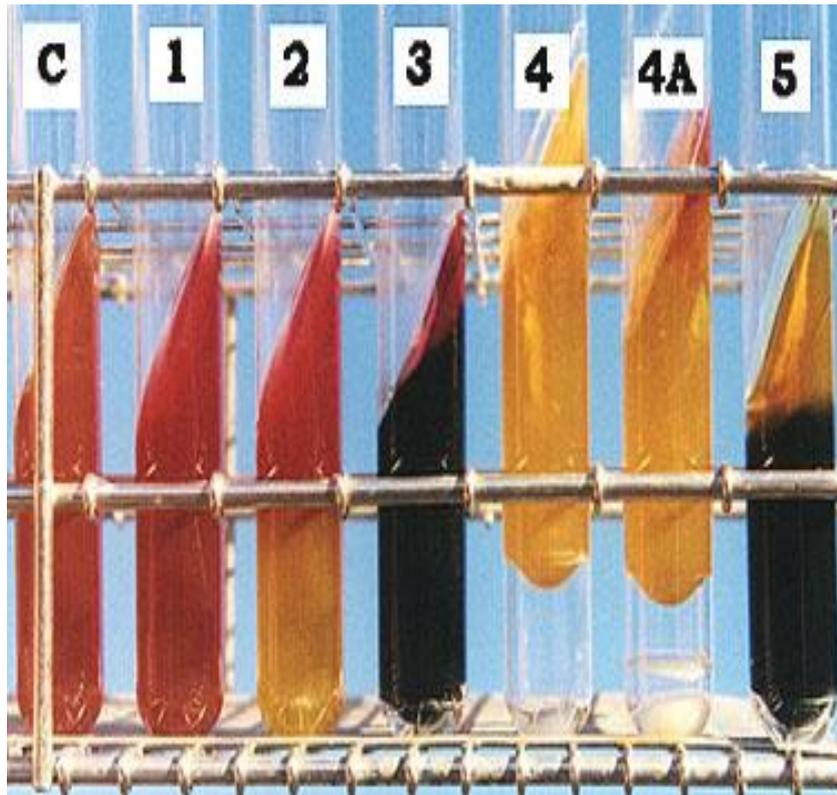


Fig. 12 : Test Kligler Hajna.

Tube C : Tube témoin négatif.

Tube n°1 : Bactérie de type oxydatif du glucose ou glucose - et lactose - : culot rouge et pente rouge.

Tube n°2 : Bactérie Glucose, lactose et H₂S négatifs.

Tube n°3 : Bactérie de type oxydatif du glucose ou glucose -, lactose - et H₂S+ : culot noir et pente rouge.

Tube n°4 : Bactérie de type fermentatif du glucose (+) et lactose + avec production de gaz: culot jaune et pente jaune.

Tube n°4A : Bactérie de type fermentatif du glucose (+) avec production de gaz et lactose - : culot jaune et pente rouge.

Tube n°5 : Bactérie de type oxydatif du glucose (+), lactose + sans production de gaz et H₂S+ : culot noir et pente jaune.

Dans le culot (anaérobiose):

Le glucose est dégradé par fermentation, d'où production importante d'acides et virage du rouge de phénol au jaune. L'utilisation ultérieure du lactose (si elle a lieu) ne modifiera pas la teinte du rouge de phénol.

On lit donc le caractère glucose dans le culot.

Sur la pente (aérobiose):

Le glucose est attaqué par voie oxydative, d'où production faible d'acides (d'autant plus faible que la quantité de glucose présent est faible).

Si la souche est lactose -, la faible acidité produite sera masquée par l'utilisation des acides aminés (alcalinisation).

Si la souche est lactose +, il y aura acidification due à l'oxydation du lactose, présent en quantité importante: virage du rouge de phénol au jaune.

On lit donc le caractère lactose sur la pente.

b)- Principe de la production d' H_2S

La mise en évidence de la production d' H_2S se fait grâce à la présence de thiosulfate de sodium et de citrate ferrique (fer III). En effet, chez une souche dite H_2S +:

Le thiosulfate est réduit en anaérobiose en H_2S . L' H_2S ainsi formé se combine au citrate de fer présent pour former un précipité de sulfure de fer noir.

3.1.3 Milieu Clark et Lubs

Ce milieu permet l'étude de la voie de fermentation du glucose (tests RM et VP). L'étude de cette voie permet de différencier les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae (bacilles Gram -, oxydase -).

Bouillon Clark et Lubs est inoculé par une goutte d'une suspension trouble de bactéries. Après 18h à 37°C, on divise le bouillon dans 2 tubes stériles. Chaque tube sert à révéler une des 2 voies :

- Voie des Acides mixtes : Addition d'une goutte de rouge de méthyle (test au RM)
- Voie Butylène-Glycolique : Addition de 2 gouttes de KOH à 10% et d'Alpha-naphtol (réaction de Voges-Proskauer) (cf. Fig. 13).

3.1.3.1. Test RM (rouge de méthyle)

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation du glucose en acides mixtes par acidification d'un milieu glucosé.

3.1.3.2. Test VP (Voges-Proskauer)

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxybutanone) au cours de la fermentation butylène glycolique: en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d' α -naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

Remarque: le test VP est beaucoup plus spécifique que le test RM qui ne donne qu'une idée globale du métabolisme.

Le test VP est particulièrement intéressant pour caractériser le groupe *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* et *Serratia* (complexe KEHS cf. cours des entérobactéries).

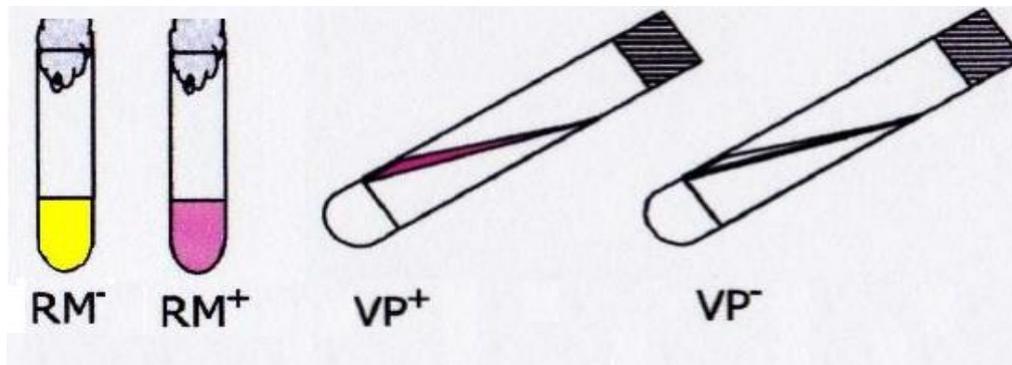


Fig. 13 : Tests RM et VP.

3.1.4 Citrate de Simmons

Ce milieu est un exemple de milieu synthétique, c'est à dire de milieu dont la composition, qui est complexe, est connue exactement tant qualitativement que quantitativement.

Dans ce milieu le citrate ($C_6H_5O_7^{3-}$) est l'unique source de carbone. L'utilisation de ce substrat, pour la plupart des bactéries pouvant le cataboliser, est une utilisation aérobie, et se traduira par une alcalinisation du milieu.

L'équation de l'oxydation par respiration aérobie du citrate est :



Le milieu est présenté sous forme de gélose inclinée. La pente estensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. Il est important de ne pas apporter de substrats carbonés. Ainsi l'ensemencement à partir d'une souche pure fournie en bouillon nutritif ou en eau peptonée est impossible. Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone). Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

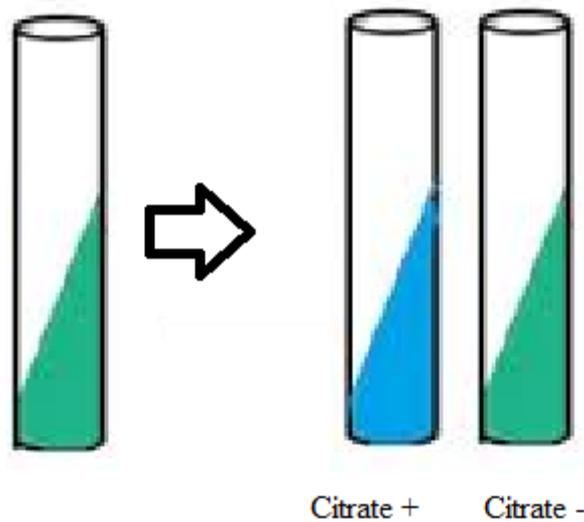


Fig. 14 : Test du citrate de Simmons.

Pour la lecture du test, on procède comme suit : (cf. Fig. 14)

- Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons +.

- Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'y a pas eu alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est citrate de Simmons -.

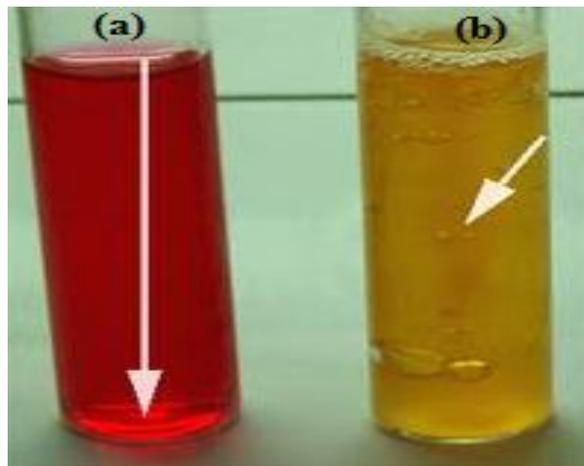
Remarque :

Les causes possibles d'erreurs peuvent s'observer si : i) inoculum apportant une source de carbone et ii) bouchon mal dévissé

3.1.5 Mannitol-Mobilité

Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol (caractère biochimique) et la mobilité de la souche (caractère morphologique). Ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives. La présence d'une faible teneur d'agar (gélose molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale (le milieu estensemencé à l'aide d'un fil de platine ou une pipette Pasteur à bout fermée et incubé à 37°C pendant 18-24 heures). La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement. La présence de nitrate de potassium permet aussi la recherche du nitrate réductase grâce à ce milieu (en ajoutant à la surface, les réactifs de Griess (nitrite 1 et nitrite 2) (cf. test du nitrate réductase).



(a) Test avant
l'ensemencement

(b) Test positif (mannitol+
et mobilité+)

Fig. 15 : Test mannitol mobilité.

4. Galeries de tests biochimiques miniaturisés (galerie Api)

Là où les techniques classiques nécessitaient une à trois semaines, les gammes miniaturisées permettent l'obtention des résultats sous 18 à 72 heures (rapide). Elles permettent, en outre, l'identification d'environ 700 bactéries et levures, ce qui couvre pratiquement une bonne partie des micro-organismes pathogènes et près de 1000 tests biochimiques différents d'usage courant. Les galeries Api (analytical profile index) sont aussi de réalisation facile et de haute performance (résultat fiable).

Elles se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini (ONPG, ADH, GEL...) et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Elle comprend généralement 20 tests biochimiques.

La première galerie qui a été utilisée est la galerie Api 20 E (Fig. 16), destinée à l'identification des entérobactéries. Actuellement dans le laboratoire de bactériologie médicale de l'Institut des Sciences Vétérinaires, seules les galeries Api 20 E, Api 20 NE, Api Staph et Api 20 Strep sont disponibles.

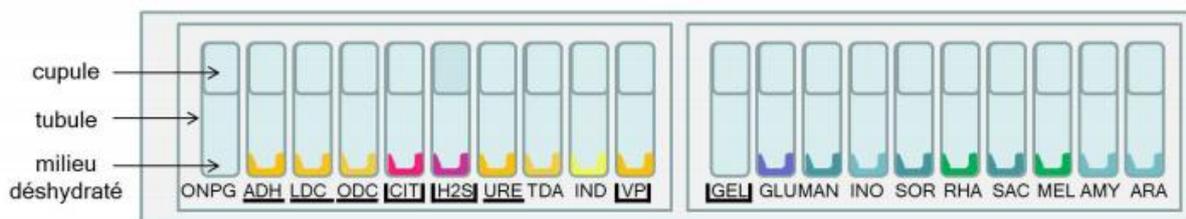


Fig.16 : Galerie Api 20 E.

4.1 Choix de la galerie

Le choix de la galerie à ensemencer dépend des résultats de l'étude des caractères morphologiques, culturels et biochimiques qui ont été étudiés précédemment (oxydase, catalase...) et qui sont indispensables pour l'interprétation de la galerie Api.

Ainsi, les galeries disponibles dans notre laboratoire permettent d'identifier un ensemble de bactéries Gram positif et négatif (cf. catalogues analytiques des galeries) qui présentent un risque négligeable (P1) ou faible (P2) et dont la manipulation est autorisée aux étudiants dans un laboratoire pédagogique.

-La galerie Api 20 NE est destinée à l'identification des coques ou bacilles Gram négatif, peu exigeants (bacilles autres que les entérobactéries) et oxydase positif (*Pseudomonas* et apparentés, Vibrionaceae, Aeromonadaceae).

-La galerie Api Staph permet l'identification des staphylocoques et des microcoques.

-La galerie Api 20 Strep assure l'identification des streptocoques, entérocoques et les bactéries apparentées (notamment quelques espèces du genre *Listeria*) en 4 ou 24 heures

-Pour la galerie Api 20 E, les entérobactéries (bacilles Gram négatif, peu exigeants et oxydase négatif) sont facilement identifiées par le biais de cette galerie. Les Vibrionaceae, *Pseudomonas* et les Aeromonodaceae sont également d'identification possible avec cette galerie.

4.2 Mode opératoire

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation (support de la galerie) et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

-Préparer la suspension bactérienne à une opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland (dans l'ampoule du Medium correspondant à la galerie ou dans un tube d'eau distillée stérile) (cf. Préparation de la suspension bactérienne).

-Inoculer la galerie : la suspension bactérienne à analyser, souvent obtenue suite à une purification des colonies bactériennes sur milieux sélectifs, est versée dans chacun des tubules de la galerie. Pour les substrats dont le nom est encadré, il convient de remplir la cupule. L'objectif est de réaliser des tests en aérobiose (riche en oxygène). Pour les substrats dont le nom est souligné, il convient de remplir la cupule avec de l'huile de paraffine. Cette huile empêche le contact avec l'oxygène, créant ainsi un milieu anaérobique (absence d'oxygène) et empêche également les composés volatiles synthétisés lors de la réaction de s'échapper du tube.

-Incuber de 18 à 24h à température adaptée.

-Refermer la boîte d'incubation, coder (il convient de noter le code sur la languette latérale du boîtier d'incubation) et placer à 37 °C pendant 18-24 heures.

Remarque : il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (GAZ+).

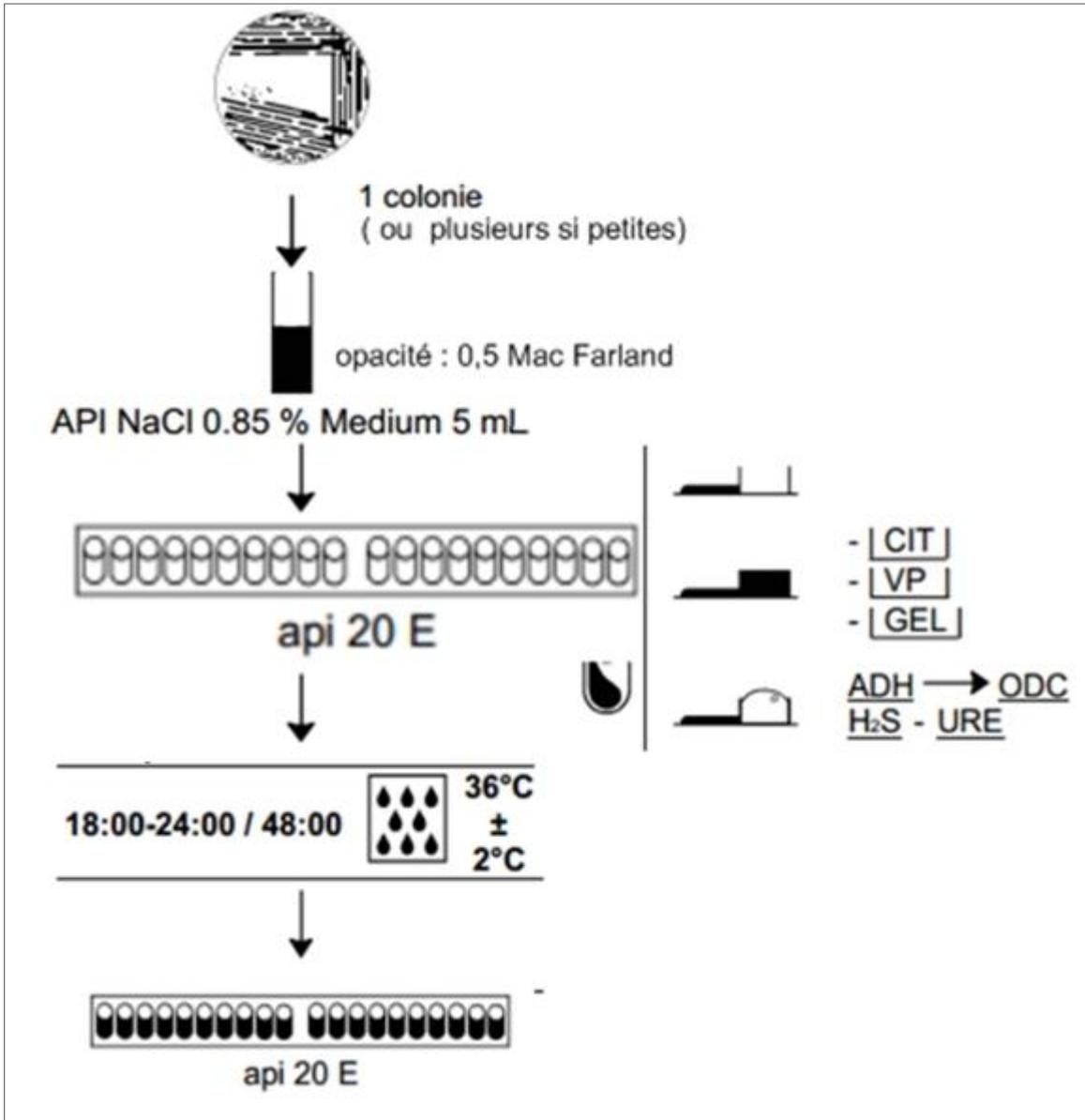


Fig. 17 : Préparation de la suspension bactérienne et ensemencement de la galerie Api 20 E.

| | | |
|---|--|---|
| Remplir les tubules et les cupules des tests du type [CIT] | | Remplissage des tubes : Pipette Pasteur Cupule Tubule |
| Remplir les tubules des tests du type <u>ADH</u> et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l'anaérobiose. | | |
| Remplir uniquement les tubules des tests restants | | |

Fig. 18 : Ensemencement de la galerie Api 20 E.

Tab. 2 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 E.

| Microtube | Substrat | Caractère recherché | Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire) | Résultat + | Résultat - |
|---|---|---------------------------------|--|---|---|
| ONPG | Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside | β -galactosidase | Lecture directe |  |  |
| ADH | Arginine | Arginine dihydrolase | Lecture directe |  |  |
| LDC | Lysine | Lysine décarboxylase | |  | |
| ODH | Ornithine | Ornithine décarboxylase | | | |
| CIT | Citrate | Utilisation du citrate | Lecture directe |  |  |
| H₂S | Thiosulfate de sodium | Production d'H ₂ S | Lecture directe |  |  |
| URE | Urée | Uréase | Lecture directe |  |  |
| TDA | Tryptophane | Tryptophane désaminase | Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer |  |  |
| IND | Tryptophane | Production d'indole | Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs |  |  |
| VP | Pyruvate de sodium | Production d'acétoïne | Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol |  |  |
| GEL | Gélatine emprisonnant des particules de charbon | Gélatinase | Lecture directe |  |  |
| GLU à ARA | Substrat carboné | Utilisation de substrat carboné | Lecture directe |  |  |
| NO₂⁻ / N₂ | Nitrates (NO ₃) | Nitrate réductase | Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif |  | |

Avec le tableau d'identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau : chaque cellule de ce tableau contient les pourcentages de positivité • Avec le catalogue analytique : Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun.

Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification

La lecture peut se faire plus facilement grâce à l'utilisation du logiciel d'identification. Les bases de données des galeries Api sont désormais intégrées par API web™ afin de faciliter leur interprétation.

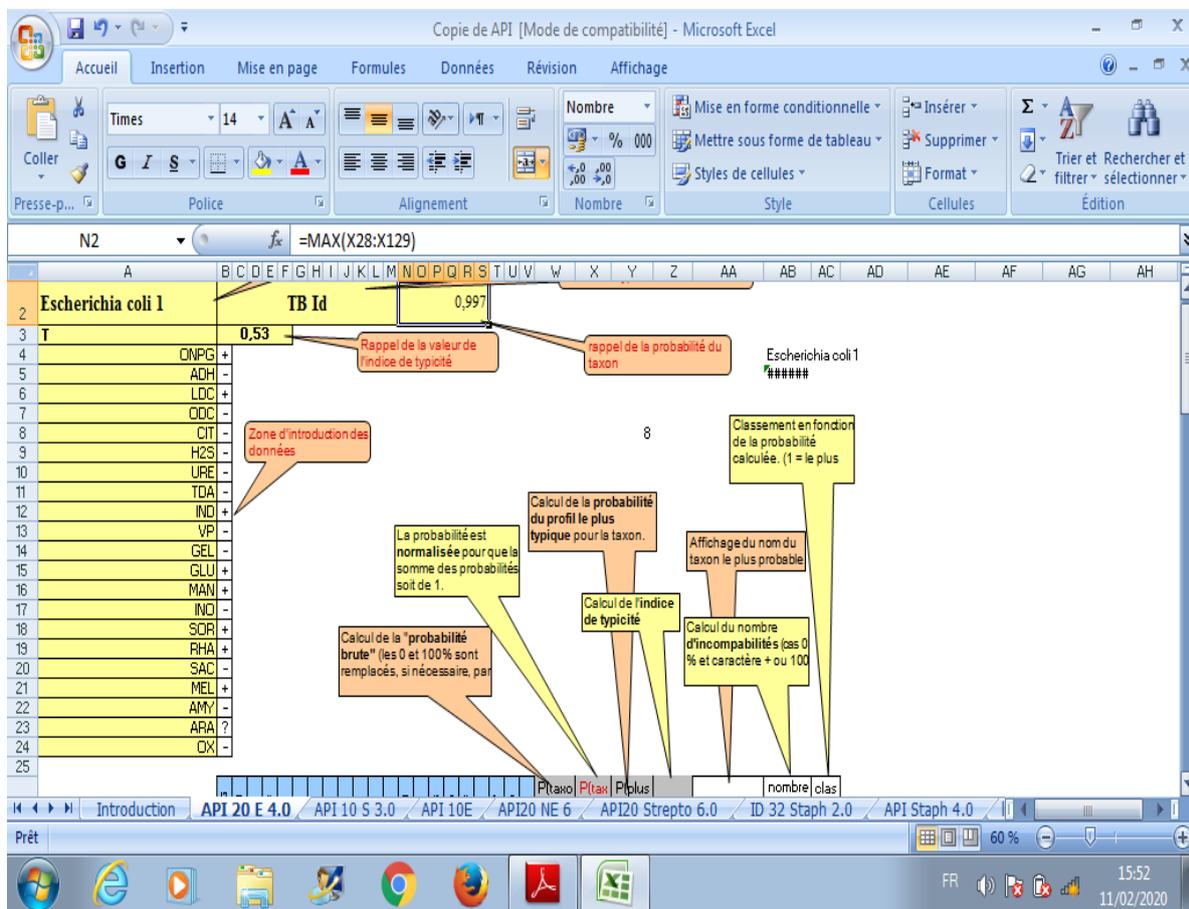


Fig. 20 : Feuille Excel de lecture de la galerie Api (Excel Microsoft).

TP. N° 4. ANTIBIOGRAMME

Objectif :

L'antibiogramme a pour but de mettre en évidence les effets des antibiotiques sur les bactéries isolées au niveau du laboratoire. Elle permettra de répondre aux hypothèses suivantes :

- Les antibiotiques agissent de manière inégale sur un même type de bactérie.
- Tous les antibiotiques ne fonctionnent pas sur toutes les bactéries.

Il est fondamental de mesurer l'activité des antibiotiques :

- pour sélectionner, in vitro, le ou les antibiotiques actifs sur une bactérie identifiée ou non ;
- Pour agir vite et éviter la prolifération microbienne et la septicémie.

1. Définition

L'antibiogramme standard est un test in vitro de sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques. L'identification bactérienne devra donc souvent être complétée par l'antibiogramme (standard). En effet, l'antibiogramme vise à trouver l'antibiotique le plus efficace sur les bactéries prélevées en cas d'infection bactérienne, d'exploitées les données pour la surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques (échange de données par le logiciel WHONET fourni par l'OMS) et une indication supplémentaire pour l'identification du germe par la mise en évidence de résistances naturelles.

L'antibiogramme d'une souche peut être déterminé en milieu liquide par la méthode de la CMI (concentration minimale inhibitrice) ou par la technique des disques.

Il existe aussi des galeries d'antibiogramme qui permettent la catégorisation de la souche bactérienne à tester par rapport à plusieurs antibiotiques sur les CMI déjà fixées. Des méthodes dites automatisées permettant l'obtention rapide des résultats et la reproductibilité des tests ont été récemment développées. Les automates fonctionnent de la même manière que les galeries mais permettent de tester plusieurs concentrations d'antibiotiques.

Un antibiogramme doit obligatoirement être effectué sur une culture pure et identifiée. Cela permet d'ajuster la densité de l'inoculum, de choisir judicieusement les antibiotiques à tester, et de pratiquer une lecture interprétative.

1.1 Limites de l'antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé *in vitro*, tandis qu'une infection bactérienne à plusieurs composantes qui varient avec le temps : la localisation de l'infection, l'animale, les concentrations d'antibiotiques et les bactéries. Ainsi, l'antibiogramme ne peut pas prédire le comportement des antibiotiques *in vivo* :

- Diffusion au site de l'infection ;
- Choix de posologie ;
- Pénétration dans les cellules ;
- Influence des facteurs physiologiques ou pathologiques ;
- Transformation de la molécule d'antibiotique *in vivo* ;
- Emergence d'une résistance au cours du traitement ;
- Etat physiologique de la bactérie au sein du foyer infectieux (les bactéries «au repos» sont insensibles aux antibiotiques qui interfèrent avec la biosynthèse du peptidoglycane et de même pour les mutants dépourvus de paroi).

2. Antibiogramme par dilution

Dans la pratique courante, les méthodes de dilution sont de mises en œuvre délicates et/ou coûteuses et elles sont réservées à des laboratoires spécialisés.

Elle est souvent effectuée sur milieu de culture liquide. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2.

2.1 Choix du milieu

Détermination de la CMI en milieu liquide doit se faire sur milieu liquide (bouillon). On utilise le bouillon Mueller-Hinton (MH) ou le bouillon MH au sang de cheval et additionné de β -NAD (bouillon MH-F).

Le bouillon MH est employé lors de la méthode de dilution en milieu liquide pour les bactéries autres que celles à croissance lente (bactéries non exigeantes).

Le bouillon MH-F est un bouillon MH additionné de 5% de sang de cheval lysé et de 20 mg/L β -NAD, est employé pour les bactéries exigeantes et/ou à croissance lente (ex. *Streptococcus* spp., dont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Pasteurella multocida*, et autres...).

2.2 Préparation de l'inoculum

Cette méthode consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques. C'est la méthode de référence (dilution en milieu liquide ou solide). En revanche, elle est fastidieuse et lente.

En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) (cf. Fig. 21) ou de cupules (méthode de microdilution).

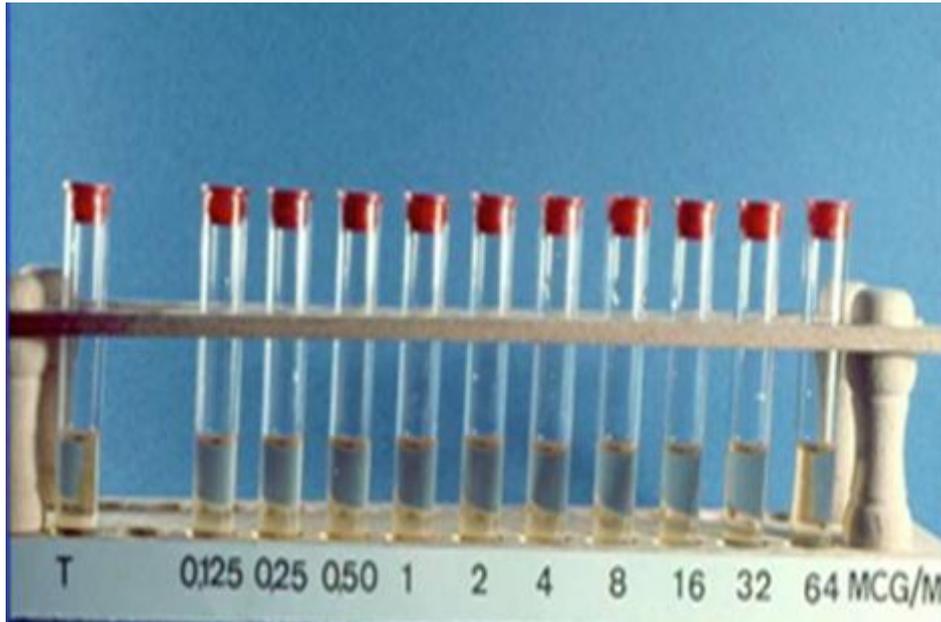


Fig. 21 : Antibiogramme par dilution (aspect avant ensemencement).

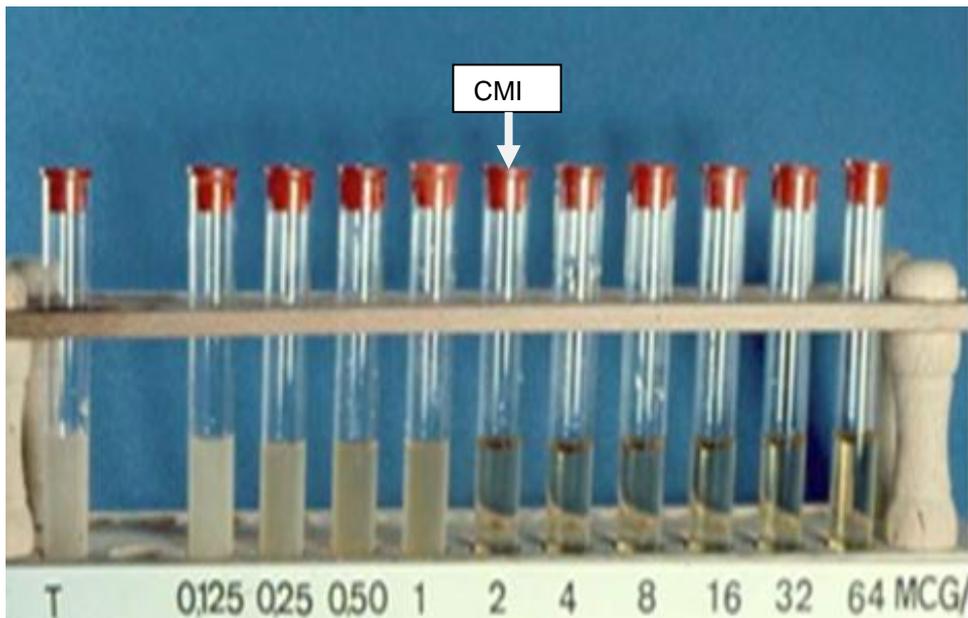


Fig. 22 : Antibiogramme par dilution (aspect après ensemencement et incubation).

Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible (cf. Fig. 22). Dans la Fig. 22, la CMI de la souche testée est de 2 µg/mL (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu).

La méthode par dilution peut aussi être réalisée en milieu solide où l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Petri. La surface de la gélose est ensemencée avec un inoculum des souches à étudier (cf. Fig. 23). Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.

Elle permet également de mesurer la concentration inhibitrice 99% (concentration qui inhibe la croissance de 99% des cellules d'une souche bactérienne=CMI) ou la concentration inhibitrice 50% (concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules d'une souche bactérienne).

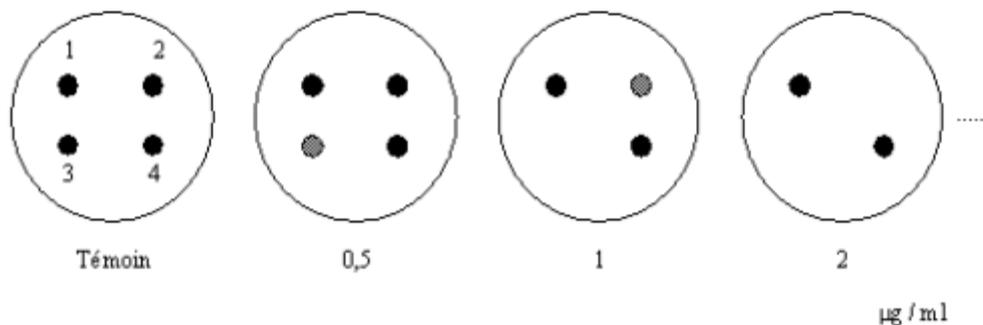


Fig. 23 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé (1, 2, 3 et 4 représentent les souches bactériennes testées).

3. Antibiogramme par diffusion

La méthode de diffusion est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle convient pour la majorité des bactéries pathogènes incluant certaines bactéries à croissance lente ; elle permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier.

Néanmoins, cette technique s'applique mal à l'évaluation de la sensibilité à des antibiotiques qui diffusent peu dans la gélose (polymyxines ou glycopeptides) et toute résistance devrait être confirmée par la mesure de la CMI (antibiogramme par dilution).

L'antibiogramme par diffusion est inadapté pour des bactéries telles que les mycoplasmes par exemple ; en raison de la petite taille des colonies et de la durée d'incubation souvent longue. De même, pour les bactéries intracellulaires obligatoires (*Chlamydia*, *Rickettsia*...), l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques nécessite le recours à des techniques particulières rarement effectuées en routine.

3.1 Préparation de l'inoculum

L'inoculum bactérien est préparé en ensemencant dans 5 ml du bouillon nutritif (ou en milieu salé) au moins trois à cinq colonies bien isolées de même type morphologique d'une culture sur milieu gélosé, ensuite une incubation sous agitation (généralement deux à six heures) à 30°C a été réalisée. La turbidité de la culture a été ajustée avec une solution saline stérile ou du bouillon pour obtenir une turbidité équivalente à celle d'un standard Mc Farland 0,5 ou à une densité optique de 0,08 à 0,1 lue à 625nm. Il en résulte une suspension contenant environ 1 à 2×10^8 UFC/ml pour *E. coli* par exemple voir 1×10^6 UFC/ml pour d'autres bactéries. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de l'eau physiologique stérile s'il est trop dense ou de la culture bactérienne s'il est trop faible.



Fig. 24: Etalon de Mc Farland servent de standard de turbidité pour préparer les suspensions bactériennes.

Pour effectuer cet ajustement de turbidité, on peut utiliser un appareil photométrique (densitomètre) ou la comparaison visuelle. La méthode visuelle consiste à comparer visuellement le bouillon de culture en phase de croissance et le tube étalon en les plaçant devant une série de lignes noires sur un fond blanc en présence d'une source de lumière adéquate (cf. Fig. 24).

L'inoculum bactérien devrait être ensemencé au cours des 15 minutes qui suivent l'ajustement de sa turbidité.

Cette méthode convient pour toutes les bactéries y compris à croissance lente dont : *Haemophilus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, les streptocoques β hémolytiques.

Remarque : il y a possibilité de réalisation d'un antibiogramme direct sur la primoculture sans repiquage pour les prélèvements (LCR, Hémoculture..) réalisés dans des situations d'urgence.

3.2 Choix des disques d'antibiotiques

Les antibiotiques sont sous forme de disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien. Ils sont clairement identifiés par un sigle, comportant 1 à 3 lettres, imprimé de chaque côté du disque.

Les disques sont présentés en cartouche de 50 disques conditionnés en containers étanches contenant un dessiccant (agent desséchant). La date de péremption et le numéro de lot figurent sur chaque conditionnement (cartouche et container).

Le choix des antibiotiques dépend de la souche bactérienne à tester tout en tenant compte des résistances naturelles

Ainsi pour les Aminosides par exemple, l'existence de nombreuses transférases différentes capables d'inhiber seulement quelques antibiotiques de la famille, impose de tester plusieurs antibiotiques.

Pour les Macrolides, il faut toujours employer 2 disques de Macrolides, dont l'un doit impérativement être l'*Erythromycine* pour apprécier la résistance MLS (Macrolides, Lincosamides et Streptogramines) chez des bactéries de type staphylocoques et streptocoques.

De plus, la résistance étant inductible, il faut par conséquence lire l'antibiogramme au bout de 24 heures car à 18 heures, la bactérie peut apparaître faussement sensible.

Pour les Bêtalactamines, le choix de l'Amplcilline intéressant pour les bactéries Gram négatif, est inutile et même nuisible pour les staphylocoques, car l'Ampicilline est un moins bon inducteur des β -lactamases que la pénicilline elle-même.

Pour les staphylocoques, il faut tester la *Méthicilline*.

3.3 Choix du milieu

Milieu recommandé pour l'antibiogramme est le Mueller-Hinton (MH) avec faible teneur en thymidine ou thymine et un contenu en cations connu. Il peut être préparé sur place ou acheté prêt à l'emploi. Ainsi, lorsque le MH est coulé dans des boîtes de Petri, il faut veiller à ce que l'épaisseur de la gélose est de 3 à 4 mm, car il y a une possibilité de faux sensibles si l'épaisseur est inférieure à 3 mm et de faux résistants si l'épaisseur est supérieure à 4 mm. En résumé, Répartir le milieu en boîtes de Petri stériles de façon à obtenir une épaisseur de $4 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$ (soit environ 25 mL par boîte de Petri de 90 mm de diamètre, 31 mL par boîte de Petri de 100 mm de diamètre, 71 mL par boîte de Petri de 150 mm de diamètre, 40 mL par boîte de Petri carrée de 120 mm).

Le pH du la gélose MH doit être entre 7,2 et 7,4 (ex. : la tétracycline donne des zones plus petites si le pH est trop élevé et vice versa).

La gélose MH est employée lors de la méthode de diffusion en gélose pour les bactéries autres que celles à croissance lente (bactéries non exigeantes).

La gélose MH-F additionnée de 5% de sang de cheval défibriné mécaniquement et de 20 mg/L de β -NAD, est employée pour *Streptococcus* spp. dont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Pasteurella multocida*, ... et autres bactéries à croissance lente.

Conserver les boîtes préparées au laboratoire à 8-10°C. Si elles sont conservées au-delà de 7 jours, les conserver à 4-8°C en sachet plastique scellé.

3.4 Mode opératoire

3.4.1 Ensemencement par écouvillonnage

Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.

Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif. La gélose Mueller-Hinton estensemencée par écouvillonnage en stries serrées. Pour écouvillonner la totalité de la surface de la gélose, l'opération a été répétée encore deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois (trois directions) sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et de passer l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (pourtour de la gélose). Il est à noter qu'il faut recharger l'écouvillon à chaque ensemencement s'il y a plusieurs boîtes à ensemenecer. L'ensemencement peut se faire aussi en utilisant un ensemenceur rotatif.

3.4.2 Ensemencement par inondation

Prélever 3 à 5 ml de la suspension bactérienne et les mettre dans une boîte de Petri dont il faut inonder la surface (de toute la plaque gélosée) par une légère rotation de la boîte (ensemencement par inondation), laisser la boîte inondée pendant quelques minutes (de 3 à 5 minutes et ne jamais excéder 15 minutes) afin que la gélose puisse absorber l'humidité à la surface et éliminer ensuite l'excès dans un récipient contenant un antiseptique, laisser sécher la boîte entrouverte à l'étuve pendant 5 à 10 minutes.

L'inoculum doit être toujours de bonne concentration (vérifier à l'aide d'un spectrophotomètre) et provient d'une culture jeune, car un inoculum trop faible peut donner des colonies isolées.

3.4.3 Application des disques

Laisser réchauffer les disques à la température de la pièce (environ 1 à 2 heures) avant de les utiliser.

Répartir les disques uniformément sur la gélose: généralement ≤ 12 disques pour la boîte de Petri de 150 mm de diamètre ou ≤ 5 disques/boîte de Petri de 100 mm sauf exception (p. ex., pneumocoque ≤ 9 disques pour la boîte de Petri de 150 mm de diamètre ou ≤ 4 disques pour la boîte de Petri de 100 mm de diamètre).

En général, pour la boîte de 90 mm de Diamètre, on n'utilise pas plus de 6 disques. Les disques doivent être espacés minimum de 24 mm centre à centre.

Appliquer ensuite des disques d'antibiotiques à la surface de la surface de la gélose. Incuber 18 à 24h à 37°C. Il est très important de respecter la durée d'incubation : en général, de 16 à 18 heures sauf par exemple dans le cas de *Staphylococcus* sp. et *Enterococcus* sp. où l'incubation est de 24 heures pour certains antibiotiques.

Une incubation trop longue peut fausser les résultats.

L'incubation se fait généralement en aérobiose, avec humidité, sauf si indication contraire : incubation en CO₂ diminue le pH et peut modifier l'activité de certains antibiotiques.

Enfin les disques d'antibiotiques doivent être appliqués sur la gélose en pressant chaque disque à l'aide de pinces bactériologiques stériles pour s'assurer de leur application et ils ne doivent pas être déplacés même si mal placés car, la diffusion des antibiotiques est très rapide. Il existe éventuellement des distributeurs automatiques des disques d'antibiotiques.

Dès lors que l'emballage a été ouvert, les disques doivent toujours être réfrigérés s'ils ne sont pas utilisés. Éviter de les laisser plusieurs heures à la température de la pièce. Une cartouche ouverte doit être utilisée dans un délai de 5 jours qui suivent l'ouverture.

Les disques d'antibiotiques doivent être conservés selon la nature des antibiotiques comme suit :

- Congélateur avec givre à $\leq -14^{\circ}\text{C}$, avec dessiccateur;
- Réfrigérateur à 2-8°C, avec dessiccateur ;
- Antibiotiques thermolabiles (≤ 1 sem.) : réfrigérateur à 2-8°C, avec dessiccateur.

3.5 Lecture et interprétation

La croissance se traduira par l'apparition d'une nappe à la surface de la gélose sauf aux endroits où ont été déposés les disques d'antibiotiques auxquels la souche est sensible (cf. Fig. 25). Si la souche est sensible à un antibiotique, il y aura une zone d'inhibition autour du disque (appelée plage de lyse ou zone d'inhibition) (cf. Fig. 26 et 27).

Les zones d'inhibitions doivent être mesurées au millimètre le plus proche à l'aide d'un pied à coulisse appliqué sur le fond de la boîte de Petri fermée (ou un compas appliqué en contact de la gélose) et comparées avec les valeurs critiques. Les diamètres des zones d'inhibition peuvent être mesurés avec une règle (cf. Fig. 26) ou encore un système de lecture automatisé.



Fig. 25 : Antibiogramme par diffusion.

La lecture se fait en déposant la boîte sur un fond noir et en utilisant une lumière réfléchie. Il faut s'assurer que tous les étudiants respectent les mêmes critères.

La lecture du même test doit être faite par plusieurs étudiants : variation maximale de ± 2 mm d'un lecteur à un autre puis validation du résultat.

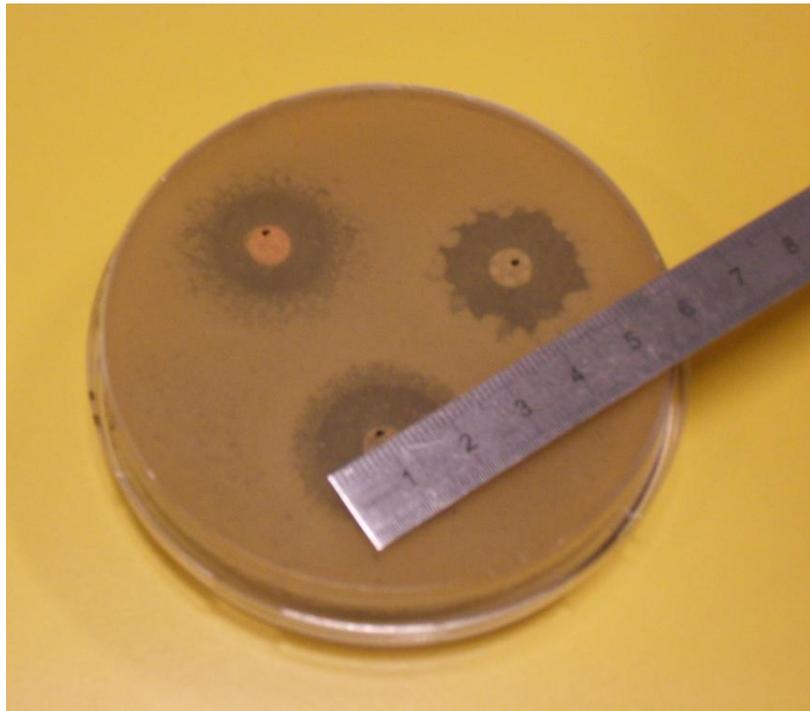


Fig. 26 : Lecture de l'antibiogramme par diffusion.

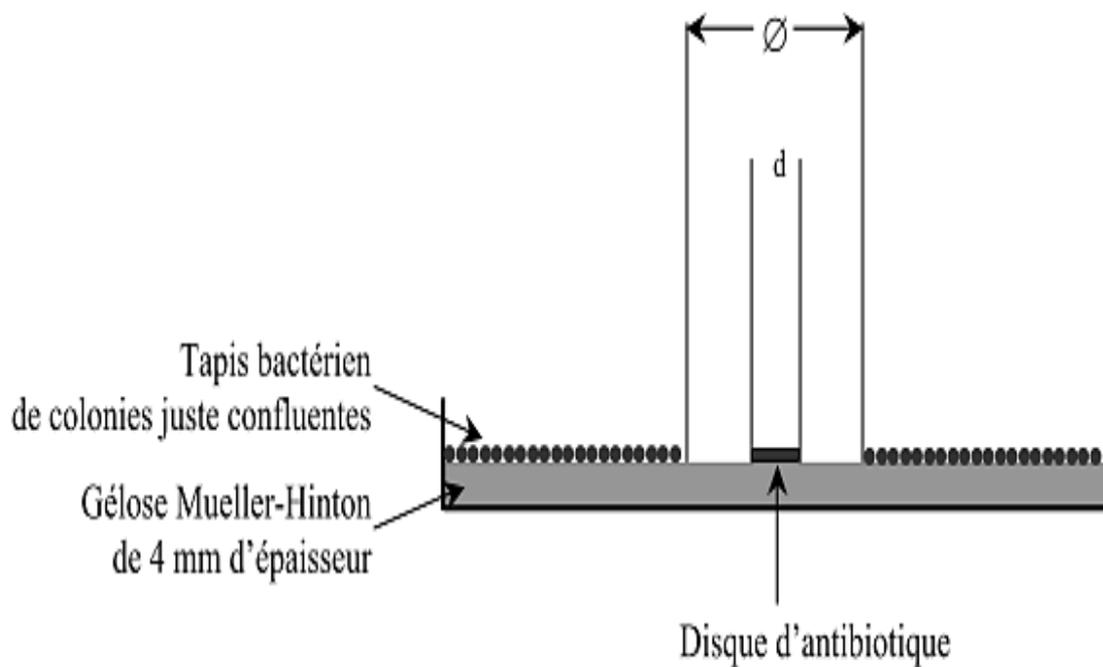


Fig. 27 : Schéma en coupe d'une gélose Mueller-Hinton utilisée pour un antibiogramme standard.

d : diamètre du disque d'antibiotique (6,35 mm)

\emptyset : diamètre d'inhibition mesuré

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par les instances en vigueur (Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques : RASRBA et Clinical Laboratory Standards Institute : CLSI) afin de classer la bactérie dans l'une des catégories Résistant, Intermédiaire, Sensible.

Les résultats d'un antibiogramme sera réalisé en reportant les diamètres d'inhibition mesurés \emptyset pour chaque antibiotique et les diamètres critiques dans un tableau (Tab. 3). Une colonne permettra d'interpréter la résistance ou la sensibilité de la souche pour chaque antibiotique.

Tab. 3 : Exemple des résultats d'un antibiogramme standard

| Antibiotique | Sigle | d(CCsup) (mm) | D(CCinf) (mm) | \emptyset (mm) | Interprétation |
|-----------------|-------|------------------|------------------|------------------|----------------|
| Acide fusidique | FA | 22 | 15 | 24 | S |
| Amoxicilline | AMX | 14 | 21 | 17 | I |
| Gentamicine | GM | 16 | 18 | 12 | R |

dCCsup : diamètre correspondant à concentration critique supérieure

DCCinf : diamètre correspondant à concentration critique inférieure

\emptyset : Diamètre mesuré

Les concentrations critiques sont établies sur la base des concentrations sériques obtenues après administration d'une posologie «usuelle» (c) et de la posologie maximale tolérée (C).

On peut en déduire (Tab. 3) si une bactérie est résistante (R), intermédiaire (I) ou sensible (S) à un antibiotique, et donc adapter l'antibiothérapie, pour proposer au patient l'antibiotique le plus efficace pour son infection.

- Les souches catégorisées S (souches sensibles) sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique (générale ou orale) avec la posologie recommandée : CMI < ou égale à la concentration critique basse.
- Les souches catégorisées R (souches résistantes) sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée : CMI > à la concentration critique haute.
- Les souches catégorisées I (souches de sensibilité intermédiaire) sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible.

Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique.

En Zone intermédiaire, l'efficacité de l'antibiotique sur la bactérie n'est pas sûre. Il vaut mieux alors prendre un autre antibiotique, auquel la bactérie est sensible.

Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles la CMI mesurée (ou le diamètre) est supérieure à la concentration critique basse et inférieure ou égale à la concentration critique haute (raisonnement identique pour les diamètres vis-à-vis des diamètres critiques correspondants). La probabilité de succès thérapeutique est forte uniquement dans le cas d'un traitement par voie systémique avec une posologie forte ou lorsque l'antibiotique se concentre au site de l'infection (voie locale).

Pour une information complète des prescripteurs, cette catégorie intermédiaire va devenir « sensible à forte posologie ».

Pour certains antibiotiques il n'y a qu'une seule concentration critique, donc il n'existe pas de catégorie intermédiaire. En cas de sensibilité (CMI mesurée inférieure à la concentration critique), il convient de suivre attentivement les recommandations, car, dans certains cas, seule la forte posologie est recommandée.

4. E-test

La commercialisation d'une technique rapide et simple, le E-test permet à un laboratoire une estimation indirecte de la CMI.

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

Le principe du Etest® est basé sur l'association des caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI (cf. Fig. 28).

Une échelle de lecture, imprimé sur la bandelette, permet une interprétation rapide.



Fig. 28 : Détermination de la CMI par le E-test.

5. Association d'antibiotiques

L'interaction de deux antibiotiques (A et B) peut produire quatre principaux effets :

- effet synergique : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément. L'effet $(A+B) > \text{effet A} + \text{effet B}$;
- effet additif : l'effet de l'association est légèrement supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément. L'effet $(A+B) = \text{effet A} + \text{effet B}$;
- effet indifférent : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre. L'effet $(A+B) = \text{effet A}$ ou effet B ;
- effet antagoniste : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément. L'effet $(A+B) < \text{effet A}$ ou effet B.

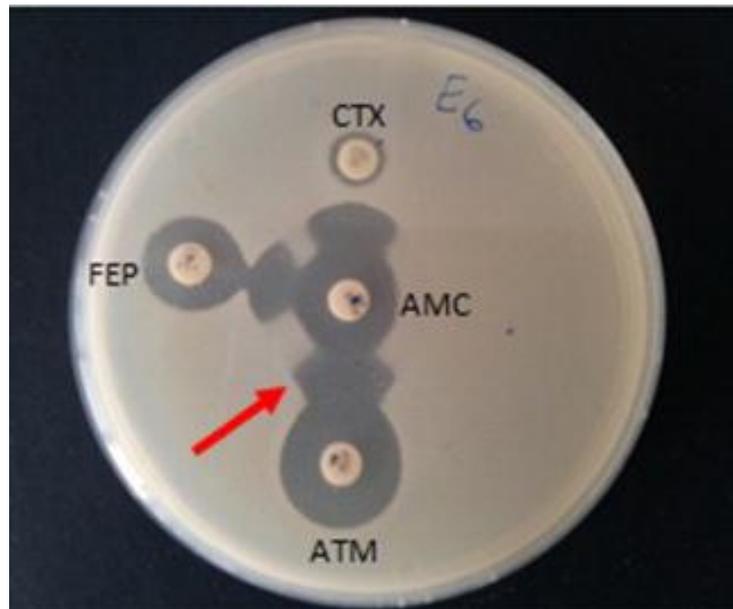


Fig. 29 : Test de synergie positif (aspect en bouchant de champagne).

L'utilisation d'une association d'antibiotiques est justifiée dans trois cas :

- Obtention d'un effet bactéricide maximal ;
- Élargir le spectre d'activité dans les cas d'infections à germes multiples ou non documentée ;
- Prévenir et limité l'émergence la sélection de mutants résistants lors des traitements de longue durée (par exemple, lors d'infections à mycobactéries ou à brucelles).

REFERENCES

- Anonyme 1 (2014) : Croissance des bactéries. Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène, Université Médicale Virtuelle Francophone.
- Anonyme 2 (2014) : TP Introduction à la microbiologie. https://pagesperso.univ-brest.fr/~maignien/teaching/L1-Bio_TP_microbio/TP-L1-2014.pdf
- Anonyme 3 (2010-2011) : TP de microbiologie, Université de Tours, France, 8 pages. http://microbiologie.univ-tours.fr/poly3_tpl3_2010_11.pdf
- Bendjama A. (2018) : Métabolisme biochimique bactérien. Cours de Bactériologie, Université de Sétif. <https://cours-examens.org/images/An-2018/Etudes-superieures/Biologie/Bacteriologie/Setif/3.pdf>
- Bent Mohamed A., Mint Sidi Baba A. (2007-2008) : manuel de travaux pratiques de microbiologie, Université de Nouakchott, 27 pages.
- Bourdon J. L., Marchal N. (1973) : Techniques bactériologiques. Doin Editeurs, Paris France, 335 pages.
- Haichour N. Travaux pratiques de microbiologie générale. Université Ferhat Abbas Sétif, 18 pages.
- Kayser F.H., Böttger E. C., Deplazes P., Haller O. et Roer A. (2008) : Manuel de poche de microbiologie médicale 2^{ème} édition Médecine Sciences Flammarion, France, 764 pages.
- Marchal N., Bourdon J. L. (1973) : Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin Editeurs, Paris France, 179 pages.
- Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière (2005) : Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle national selon les recommandations de l'OMS. 4^{ème} Edition Institut Pasteur, Algérie, 94 pages.
- Société Française de Microbiologie (2018) : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie : Recommandations 2018 V.2.0 Septembre. In : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie 133 pages.