

Chapitre III : L'identification bactérienne et l'antibiogramme.

1. Identification bactérienne

L'identification bactérienne constitue une étape fondamentale en microbiologie médicale. Elle a pour objectif de reconnaître et de caractériser les bactéries isolées à partir d'échantillons cliniques, afin de déterminer leur rôle dans l'origine d'une infection et d'orienter la prise en charge thérapeutique. En effet, chaque espèce bactérienne possède des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques propres qui permettent de la distinguer des autres micro-organismes.

Le processus d'identification repose sur plusieurs méthodes complémentaires. Les techniques classiques incluent l'observation microscopique, la coloration de Gram et les tests biochimiques, qui permettent de déterminer le genre et parfois l'espèce de la bactérie. Ces approches sont aujourd'hui renforcées par des techniques modernes, telles que la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et les analyses moléculaires (PCR, séquençage du gène 16S rRNA), offrant une identification plus rapide, précise et fiable.

En microbiologie médicale, l'identification bactérienne joue un rôle essentiel : elle permet non seulement de poser un diagnostic précis, mais aussi de choisir le traitement antibiotique le plus adapté, de surveiller l'émergence de résistances bactériennes et de prévenir la propagation des infections.

1.1. Les techniques classiques d'identification bactérienne

1.1.1. Identification microscopique

➤ Cytologie

La cytologie bactérienne recouvre l'observation microscopique directe (ou après préparation) des bactéries dans un échantillon (fluide, prélèvement, frottis, etc). On évalue la forme (coque, bacille, spirale), la disposition (chaîne, grappe, paire), éventuellement l'activité motrice (si préparation spéciale), parfois la présence de spores, de capsule ou d'inclusions. Cette étape donne une **orientation diagnostic rapide** (ex : cocci Gram + en grappes évoquant *Staphylococcus spp.*). Elle ne permet cependant pas l'espèce avec certitude, nécessite souvent une culture et des tests complémentaires.

➤ La Coloration de Gram

La coloration de Gram est un pilier de la bactériologie : elle permet de distinguer deux grands groupes de bactéries : les Gram-positives (paroi épais de peptidoglycane) et les Gram négatives (paroi plus fins, couche externe lipopolysaccharidique).

Principe résumé : on fixe les bactéries sur lame, on les colore (violet de cristal), on traite avec l'alcool, on contre-colore (Fushine). Les Gram + restent violettes, les Gram- sont colorés en rose.

Intérêt : très rapide (quelques minutes), orientation très utile (traitement empirique, choix de milieux de culture).

Limites : certaines bactéries ne se colorent pas bien, morphologies atypiques, ne donne pas l'espèce, parfois résultats erronés s'il y a erreurs de réalisation.

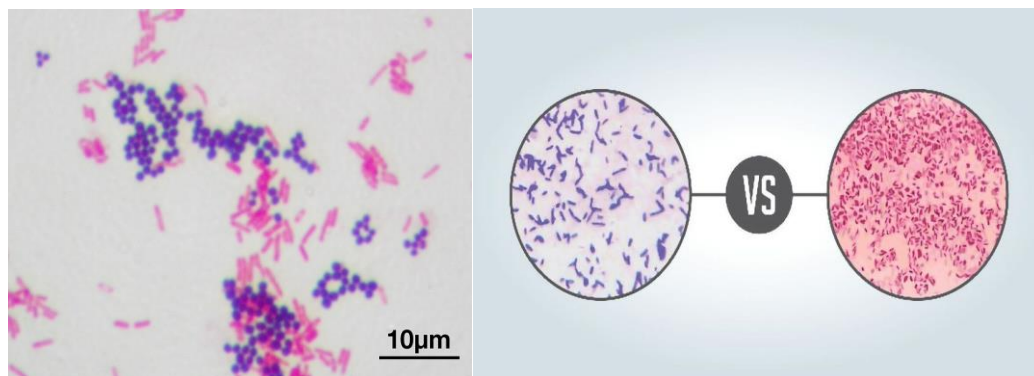


Figure 01 : les bactéries Gram+ et Gram-.

➤ Coloration de Ziehl Neelsen

Cette coloration est utilisée pour la recherche des bacilles tuberculeux, elle est basée sur la capacité de ces bactéries à conserver, après coloration à chaud à la fushine, la teinte rose malgré l'action d'un acide fort concentré et de l'éthanol à 0.95%. Ces bactéries on les appelle les Alcoolo-Acido-Résistants ou B.A.A.R.

➤ Coloration de spores

Certaines espèces bactériennes ont la propriété de se transformer en spores ex : *Bacillus* ; c'est une forme de résistance de ces bactéries en particulier vis-à-vis de la chaleur, capable de redonner la forme végétative. La coloration de spore se fait par le vert de malachite. Les spores apparaissent vertes dans les corps bactériens roses.

➤ Coloration de capsule

Les capsules sont des couches denses et bien délimitées de molécules visqueuses accumulées à l'extérieur de la paroi par certaines bactéries comme les pneumocoques. Pour l'observation de la capsule des microorganismes on utilise l'encre de chine : le fond de la préparation apparait noir et la capsule apparait transparente autour d'une bactérie plus foncée.

1.2. Identification après culture bactérienne (colonies)

Après ensemencement d'un prélèvement sur un milieu de culture (milieu gélosé adapté), on obtient des colonies bactériennes. La description macroscopique des colonies isolées permet de connaître le germe car les colonies sont typiques. Cette description doit mentionner :

- **La taille** : diamètre des colonies. Vous pouvez mesurer cette taille à l'aide d'une règle graduée. On distingue :
 - Colonies punctiformes : Colonies à peine visibles, dont la taille est inférieure au millimètre.
 - Petites colonies : Colonies dont le diamètre est compris entre 1 et 2 mm.
 - Colonies moyennes : Colonies dont le diamètre est compris entre 3 et 5 mm.
 - Grosses colonies : Colonies dont le diamètre est supérieur à 5 mm.
- **La vue de profil (élévation)** (bombée, plane, ombiliquée, a bords surélevés ou en œuf au plat) et **avec vue de dessus (bords ou contours)** (bords : dentèles, en étoile, ovoïde, régulière, ondulée, lobée).
- **L'aspect de la surface** (lisse, rugueuse, brillante).
- **L'opacité** : Les colonies opaques ne laissent pas passer la lumière contrairement aux translucides. Certaines sont très transparentes, car ils laissent passer la lumière.
- **La consistance** : Elle se juge au moment du prélèvement. On distingue les colonies crémeuses des sèches et des muqueuses (gluantes).
- **La couleur ou pigmentation** : La plupart des colonies isolées sur gélose ordinaire sont couleur crème (sans pigment) mais certaines sont blanc porcelaine, jaune, vert,...;

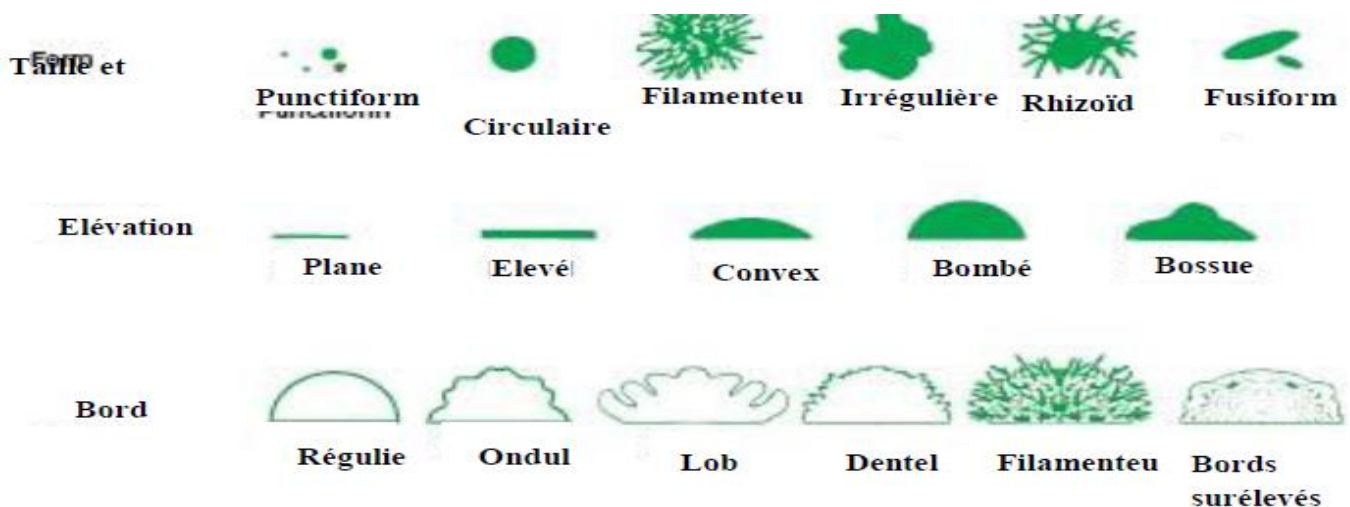


Figure 2 : aspect macroscopique des colonies bactériennes.

Cette phase permet d'isoler une souche pure, de réaliser une culture en quantité suffisante pour les tests biochimiques ou d'identification avancée. Elle reste essentielle car sans isolement pur on ne peut pas faire d'identification fiable ni d'antibiogramme.

1.3. Identification biochimique

L'identification biochimique est parmi les premières méthodes utilisées pour l'identification en bactériologie, pour cela elle est appelée **galerie biochimique classique**, les tests se font dans des tubes à essai contenant les substrats à tester. Vers la fin du vingtième siècle ces tests ont été modernisés et regroupés dans des plaques en plastiques chacune de ces plaques contient environ 20 tests miniaturisés en microtubes, chaque plaque est spécifique pour un groupe d'espèces bactérien, ces plaques s'appellent galerie API (Appareillage et Procédé d'Identification). **Exemple** ; **API 20E** spécifique pour les Entérobactéries, **APIstaph** spécifique pour les staphylocoques, etc.

1.3.1. Galerie classique

Une galerie classique regroupe plusieurs mini-tests biochimiques (tubes ou cupules) dans lesquels la bactérie est inoculée. On note les réactions (changement de pH, gaz, colonie, précipitation...). **Exemple** : fermentation de lactose, production de H₂S, lysine décarboxylase, etc. Le résultat est comparé à des tables/clés d'identification.

Avantages : technique éprouvée, peu d'investissement instrument-spécial.

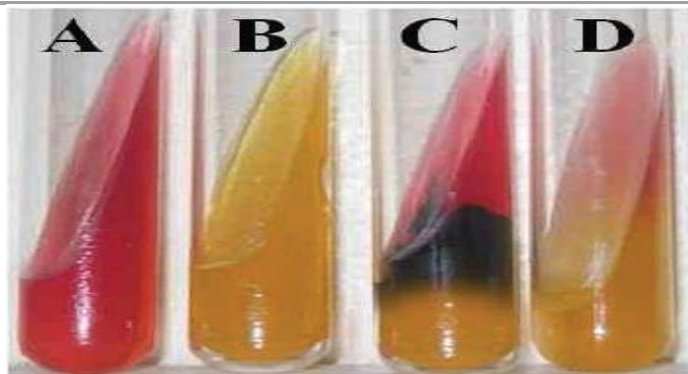
Inconvénients : plus lente (24-48 h voire plus), nécessite technicien expérimenté, plus sujette aux erreurs.

Voici quelques tests biochimiques de galerie classique :

- **Le milieu TSI**

Le milieu TSI est un milieu glucosé saccharosé, contenant du citrate de fer ammoniacal. C'est un milieu qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

Ensemencement	Mode d'action	Caractères recherchés
Abondamment la surface par stries serrées ou par inondation, puis le culot par simple piquûre, à l'aide de la même pipette boutonnée. Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la capsule afin de permettre les échanges gazeux	utilisation du glucose, utilisation du lactose, utilisation du saccharose, production de gaz	le lactose a fermenté : la surface inclinée vire au jaune. Dans le cas contraire, sa couleur reste inchangée.
		Le glucose a fermenté : le culot vire au jaune, dans le cas contraire, sa couleur reste inchangée.
		S'il y a production de gaz, il est possible d'observer, soit seulement quelques bulles, soit une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu de fond du tube.
		La production de H ₂ S se traduit par un noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente.



A : Milieu négatif (couleur rouge).

B : Gluc + ; Sacc/Lac + (tous jaune)

C : Gluc + ; Sacc/Lac - ; H₂S + (culot jaune ;noircissement ; pente rouge)

D : Gluc + ; Sacc/Lac - ; H₂S - (culot jaune ; pente rouge)

Figure 02 : Résultats du test TSI.

• Le milieu citrate de Simmons

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. L'enzyme citrase hydrolyse le citrate en acide oxaloacétique et acide acétique. L'acide oxaloacétique est ensuite hydrolysé en acide pyruvique et CO_2 . Si le CO_2 est produite, il réagit avec des composants du milieu pour produire un composé alcalin (par exemple Na_2CO_3). Le pH alcalin fait passer l'indicateur de pH (bleu de bromothymol) du vert au bleu.



Figure 03 : Résultats positif et négatif dans le milieu citrate de Simmons.

• Le milieu urée-indole

Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants :

- Présence d'une uréase
- Présence d'une tryptophanase.

Ce milieu est utilisé pour l'identification des entérobactéries (bacille gram -, oxydase -). L'uréase dégrade l'urée substance formée par la dégradation des protéines dans le foie. Selon la réaction suivante : $\text{Urée} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$. Les ions CO_3^{2-} vont entraîner une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rouge).

La recherche de la production d'indole (mise en évidence de la tryptophanase) : La tryptophanase hydrolyse le tryptophane selon la réaction suivante : $\text{Tryptophane} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{indole} + \text{acide pyruvique} + \text{NH}_3$. L'indole forme un complexe coloré en rouge en présence d'un réactif : le réactif de Kovacs.

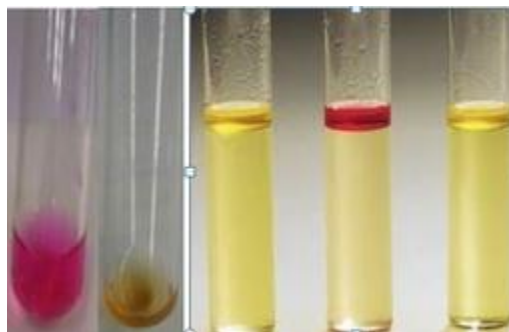


Figure 03 : Résultats positif dans le milieu urée-indole.

• Le milieu de mannitol mobilité

Le milieu Mannitol-Mobilité est utilisé pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du mannitol (virage de couleur du milieu de rouge au jaune) et la mobilité.

Nom du milieu	Composition	Aspect initial et mode d'ensemencement	Aspect après 24 h à 37°C	Résultats Interprétation
Mannitol Mobilité				
Milieu Mannitol - Mobilité (Nitrate réductase)	- Peptones tryptiques de viande - Mannitol - KNO_3 - Rouge de phénol Régénérer le milieu et refroidir	Ensemencer par piqûre centrale au fil droit par exemple.	1 2 3 4	1. Mannitol - mobilité - 2. Mannitol - mobilité + 3. Mannitol + mobilité - 4. Mannitol + mobilité + On peut faire une recherche de nitrate réductase en ajoutant du réactif de Griess dans le tube après incubation. La lecture est alors identique à celle que l'on pourrait faire avec un bouillon nitrate.

- **Test de catalase**

Ce test est utilisé pour identifier les organismes qui produisent l'enzyme catalase. Cette enzyme détoxifie le peroxyde d'hydrogène en le décomposant en eau et en oxygène. Les bulles résultant de la production d'oxygène gazeux indiquent clairement un résultat positif pour la catalase. $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.

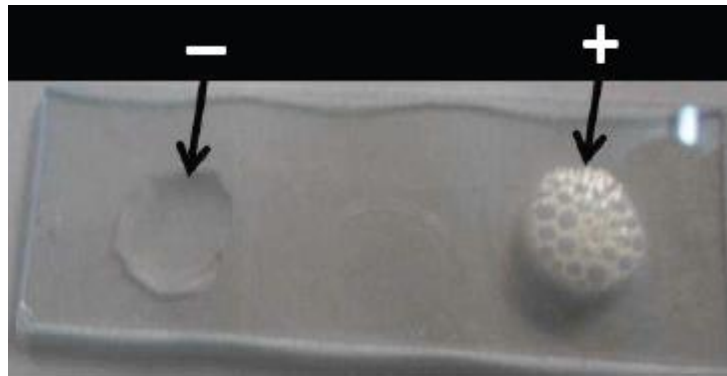


Figure 4: résultat du test de catalase.

- **Test d'oxydase**

Ce test est utilisé pour identifier les microorganismes contenant l'enzyme cytochrome oxydase (importante dans la chaîne de transport des électrons). Dans le test oxydase, des donneurs et accepteurs d'électrons artificiels sont fournis. Lorsque le donneur d'électrons est oxydé par le cytochrome oxydase, il devient violet foncé. Ceci est considéré comme un résultat positif.

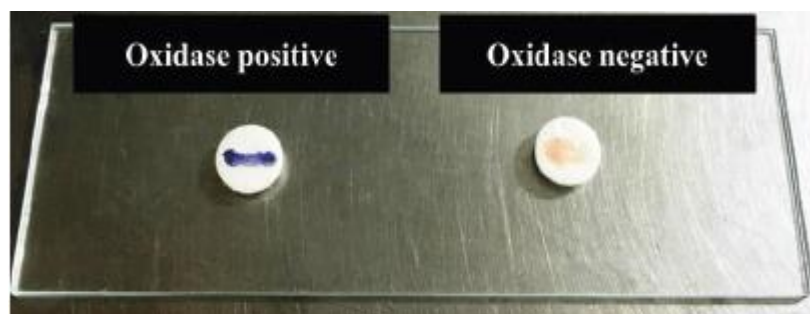


Figure 5 : résultat de test d'oxydase.

1.3.2. Galerie API (Analytical Profile Index)

La galerie API est une forme standardisée de galerie biochimique (microtubes/incubation, lecture visuelle/colorimétrique) qui permet une identification plus facile et souvent semi-automatisée. Elle est très utilisée en routine dans les laboratoires de microbiologie médicale.

- **La galerie Api 20 E**

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

➤ **Principe**

Dans l'API 20E, la bande contient vingt mini-chambres d'essai contenant un milieu déshydraté ayant des compositions définies chimiquement pour chaque essai. Ils détectent généralement l'activité enzymatique, principalement liée à la fermentation des glucides ou au catabolisme des protéines ou des acides aminés par les organismes inoculés.

Une suspension bactérienne est utilisée pour réhydrater chacun des puits. Pendant l'incubation, le métabolisme produit des changements de couleur spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs. Tous les résultats de tests positifs et négatifs sont compilés pour obtenir un numéro de profil, qui est ensuite comparé aux numéros de profil dans un livre de codes commercial (ou en ligne) afin de déterminer l'identification de l'espèce bactérienne.

- Le kit de test permet les tests suivants :

1. **ONPG**: recherche de l'enzyme β -galactosidase par hydrolyse du substrat onitrophényl-D-galactopyranoside
2. **ADH** : décarboxylation de l'acide aminé arginine par l'arginine dihydrolase
3. **LDC** : décarboxylation de l'acide aminé lysine par la lysine décarboxylase
4. **ODC** : décarboxylation de l'acide aminé ornithine par l'ornithine décarboxylase
5. **CIT** : utilisation du citrate comme seule source de carbone
6. **H₂S** : production de sulfure d'hydrogène
7. **URE** : test de l'enzyme urease
8. **TDA** (Tryptophane désaminase): détection de l'enzyme tryptophane désaminase: Réactif- Chlorure Ferrique.
9. **IND** : production d'indole à partir de tryptophane par l'enzyme tryptophanase. Réactif de Kovac.
10. **VP**: test de Voges-Proskauer pour la détection de l'acétoïne (acétyl méthylcarbinol) produite par fermentation du glucose par des bactéries utilisant la voie du butylène glycol
11. **GEL** : test pour la production de l'enzyme gélatinase qui liquéfie la gélatine
12. **GLU** : fermentation du glucose (sucre hexose)
13. **MAN**: fermentation du mannose (sucre hexose)
14. **INO**: fermentation de l'inositol (polyalcool cyclique)
15. **SOR**: fermentation du sorbitol (alcool sucre)
16. **RHA**: fermentation du rhamnose (sucre méthyl pentose)
17. **SAC**: fermentation du saccharose (disaccharide)
18. **MEL**: fermentation du mélibiose (disaccharide)
19. **AMY**: fermentation de l'amygdaline (glycoside)
20. **ARA**: fermentation de l'arabinose (sucre pentose)

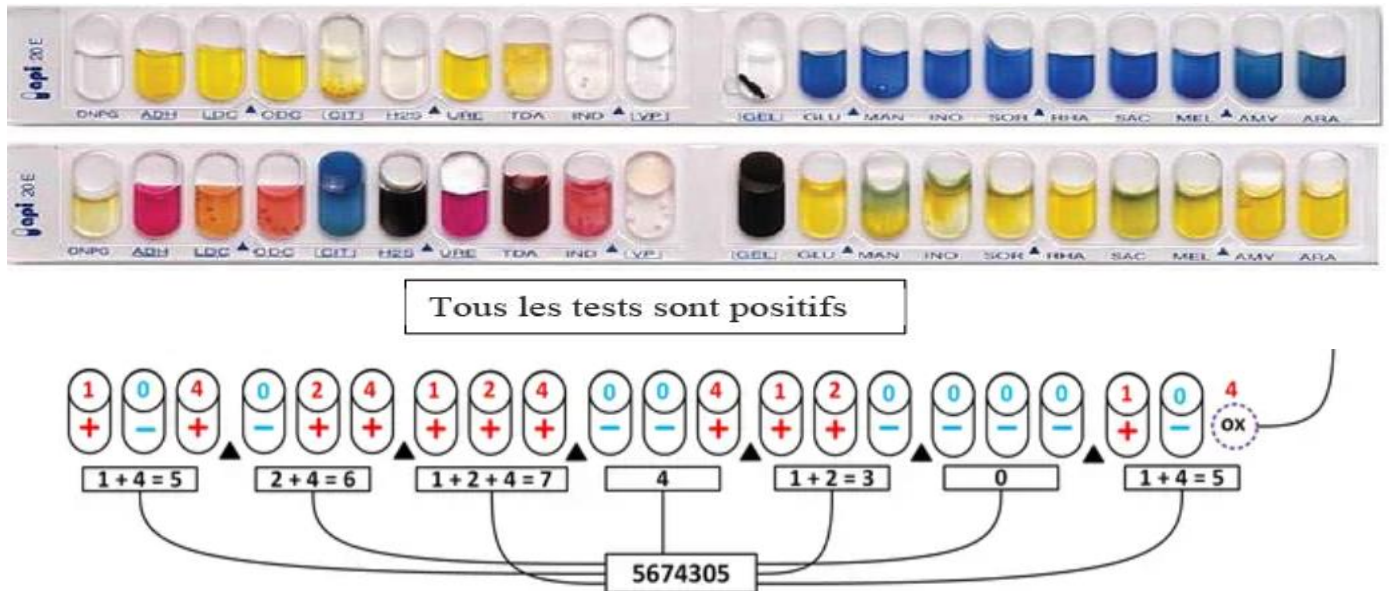
➤ **Mode opératoire**

-Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer une boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

-Interprétation des résultats

1. Pour certains compartiments, le changement de couleur peut être lu immédiatement après 24 heures, mais pour certains tests, il faut y ajouter des réactifs avant toute interprétation. Ajouter les réactifs suivants à ces compartiments spécifiques :
 - **TDA**: Mettez une goutte de chlorure ferrique
 - **IND**: Mettez une goutte de réactif de Kovac
 - **VP**: Mettez une goutte de KOH à 40% (réactif VP 1) et une goutte de VP Réactif 2 (α -Naphthol).
2. Obtenez l'Échelle de lecture de l'API (nuancier) en marquant chaque test comme positif ou négatif sur le couvercle du plateau. Les puits sont délimités en triplets par des triangles noirs pour lesquels des scores sont attribués.
3. Additionnez les scores pour les puits positifs uniquement dans chaque triplet.
4. Trois réactions de test sont additionnées à la fois pour donner un numéro à 7 chiffres, qui peut ensuite être recherché dans le livre de codes. Le score le plus élevé possible pour un triplé est 7 (la somme de 1, 2 et 4) et le plus bas est 0.
5. Identifier l'organisme en utilisant le catalogue API ou apiweb (en ligne)



Entrez le profil numérique dans l'apiweb pour obtenir l'identité.

Figure 6 : Lecture de résultats de l'API 20E.

2. L'antibiogramme

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.

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

2.1. Techniques de diffusion en milieu gélosé

La méthode de diffusion sur gélose est la plus classique pour tester la sensibilité d'une souche bactérienne à plusieurs antibiotiques simultanément par exemple sur gélose Mueller-Hinton.

➤ Le principe

On ensemence une suspension bactérienne standardisée (souvent 0,5 McFarland) sur la surface de la gélose, puis on dépose des disques de papier imprégnés d'un antibiotique à dose connue. L'antibiotique diffuse radialement dans la gélose, formant un gradient. Après incubation, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque. Ce diamètre est comparé à des tables de référence pour déterminer si la souche est sensible, intermédiaire ou résistante.

➤ Étapes :

- Préparation de l'inoculum standardisé (ex : 0,5 McFarland)
- Ensemencement uniforme de la gélose
- Dépôt rapide des disques après ensemencement
- Incubation dans des conditions standard (temps, température, atmosphère)
- Lecture des diamètres et interprétation.

Avantages : simple, peu coûteuse, multi-antibiotiques.

Limites : donne une estimation « qualitative » (S/I/R) mais pas toujours la CMI exacte, dépend de l'ensemencement, du milieu, de l'incubation.

➤ Mode opératoire

a. 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. 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.

b. 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 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 (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Listes des antibiotiques testés.

Entérobactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus B</i>
Amoxicilline +Ac.clavulanique	Amoxicilline	Amikacine	Amoxicilline +Ac.clavulanique	Levofloxacin
Acide nalidixique	Augmentin	Céfalexine	Amikacine	Minocycline
Amikacine	Amikacine	Cefoxitine	Cefazoline	Nitrofurantoin
Colistine	Bactrime	Doxycycline	Céfalexine	Norfloxacin
Cefazoline	Cefoxitine	Fosfomycine	Cefotaxime	Rifampicin
Cefoxitine	Cefotaxime	Kanamycine	Erythromycine	Teicoplanin
Chloramphenicol	Colistine	Lincomycine	Fosfomycine	Tétracycline
Ciprofloxacine	Ciprofloxacine	Pristinamycine	Lincomycine	Chloramphenicol
Fosfomycine	Doxycycline	Pinicilline	Pinicilline	Clindamycin
Gentamycine	Fosfomycine	Spiramycine	Pristinamycine	Co-Trimoxazole
Imipénème	Piperacilline	Tétracycline	Rifampicine	
Ticarclilline	Ticarclilline		Tétracycline	
Augmentin				

c. 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. Ainsi, lorsque le MH est coulé dans des boîtes de Pétri, 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.

Le pH de 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).

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.

d. Ensemencement

- 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.

La gélose Mueller-Hinton est ensemencée 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).

-Ensemencement par inondation

Prélever 3 à 5 ml de la suspension bactérienne et les mettre dans une boîte de Pétri 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.

- **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 Pétri de 150 mm de diamètre ou ≤ 5 disques/boîte de Pétri de 100 mm sauf exception. Les disques doivent être espacés minimum de 24 mm centre à centre.

Appliquer ensuite des disques d'antibiotiques à la surface de la gélose. 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. Ensuite, Incuber 18 à 24h à 37°C.

- **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. 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)

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 Pétri 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 (Fig. 07).

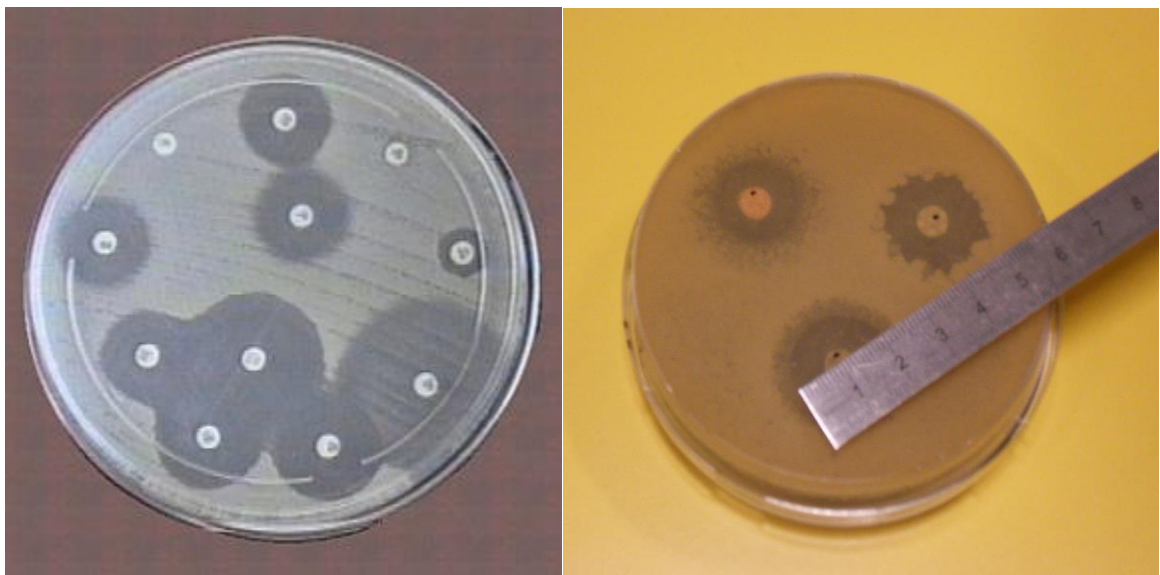


Figure 7: Lecture de l'antibiogramme par diffusion.

Tableau 02: Tableau de lecture de l'antibiogramme.

Antibiotique	Charge du Disque	Concentrations critiques (mg/L)	
		Sensible(S)	Résistante(R)
-Ciprofloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1
-Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10 µg	≤ 4/2	> 16/2
-Ticarcelline	75 µg	≤ 16	> 64
-Colistine	50 µg	≤ 2	> 2
-Cefazoline	30 µg	≤ 8	> 32
-Cefoxitine	30 µg	≤ 8	> 32
-Acide nalidixique	30 µg	≤ 8	> 16
-Imipenème	10 µg	≤ 4	> 8
-Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16
-Fosfomycine	50 µg	≤ 32	> 32
-Chloramphenicol	30 µg	≤ 8	> 16
-Gentamycine	15 µg	≤ 4	> 8
- Pinicilline	6 µg	≤ 0,25	> 16
-Céfalexine	30 µg	≤ 8	> 32
- Doxycycline	30 UI	≤ 4	> 8
-Spiramycine	100 µg	≤ 1	> 4
-Tétracycline	30 UI	≤ 4	> 8
-Kanamycine	30 UI	≤ 8	> 16
-Lincomycine	15 µg	≤ 2	> 8
-Pristinamycine	15 µg	≤ 1	> 2
- Rifampicine	05 µg	≤ 4	> 16
-Erythromycine	15 UI	≤ 1	> 4
-Bactrime	23 µg	≤ 2	> 8
-Céfotaxime	30 µg	≤ 4	> 32
-Augmentin	20 µg	≤ 4	> 16

2.2. Technique de la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

2.1. Définition de CMI

La CMI (ou MIC – Minimum Inhibitory Concentration) est définie comme la concentration minimale d'un antibiotique qui inhibe la croissance *in vitro* de 99% de la population bactérienne testée.

-L'importance de la CMI :

- Détermination de la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique.
- Aide au choix thérapeutique (adaptation d'un traitement).
- Surveillance de la résistance aux antimicrobiens.
- Études pharmacodynamiques et développements de nouveaux antibiotiques.

Elle s'exprime en général en µg/ml et peut être réalisée par différentes méthodes et sur différents milieux de croissance.

2.2. Méthode de détermination de la CMI (Méthodes de dilution)

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2.

- En milieu liquide (figure 8), l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antibiotique. 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.

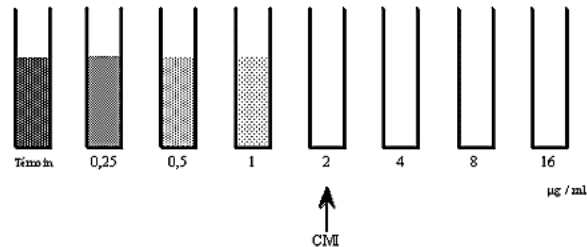


Figure 8 : détermination de la CMI en milieu liquide.

La CMI de la souche testée est de 2 µg/mL (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'oeil nu).

-En milieu solide (figure 9), l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose est ensemencée avec un inoculum des souches à étudier. 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.

La méthode de dilution en milieu gélosé, réalisée avec une gamme de concentrations en progression géométrique de raison 2 est la méthode de référence. Elle permet également de mesurer la concentration inhibitrice 99% (concentration qui inhibe la croissance de 99% des cellules d'une souche bactérienne) ou la concentration inhibitrice 50% (concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules d'une souche bactérienne).

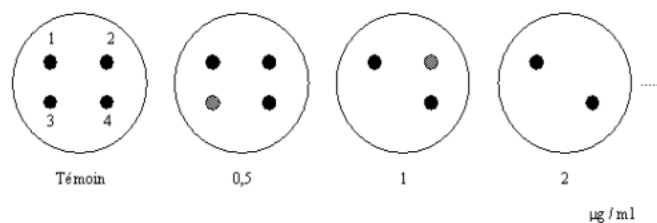


Figure 9: Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.

Une boîte de Pétri permet de tester jusqu'à 30 souches différentes. Dans l'exemple présenté ci-dessus, le nombre de souches est limité à quatre.

La CMI de la souche 3 vis-à-vis de l'antibiotique incorporé à la gélose est de 1 µg/mL. La CMI de la souche 2 est de 2 µg/mL. Les déterminations des CMI des souches 1 et 4 nécessiteraient de tester des concentrations plus fortes en antibiotique.

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.

3. Les nouvelles techniques d'imagerie et d'intelligence artificielle utilisées pour l'identification bactérienne et l'antibiogramme (Approches innovantes)

Les méthodes classiques d'identification bactérienne (cultures, tests biochimiques) et d'antibiogramme prennent souvent 24–72 heures ou plus, ce qui retarde la prise en charge clinique et favorise l'antibiorésistance. Ces dernières années, l'association d'outils d'imagerie avancée (spectroscopies, imagerie hyperspectrale, microscopie temps-réel, microfluidique) et de l'intelligence artificielle (IA / apprentissage automatique profond) a permis d'accélérer et d'automatiser l'identification des espèces et la détermination

de la sensibilité aux antibiotiques, parfois en quelques dizaines de minutes à quelques heures au lieu de jours.

3.1. L'automatisation et l'application de l'intelligence artificielle

Voici quelques technologies innovantes, avec leur usage, avantages et limites :

➤ Sysmex UF-4000 (cytologie et indication rapide du Gram)

-Type : Cytométrie en flux automatisée — analyse rapide des urines

-Applications : dépistage d'infections urinaires, orientation du Gram

-Principe : analyseur automatisé de cytologie des urines et liquides biologiques, utilisant la cytométrie en flux fluorescence avec laser bleu. Il peut compter les bactéries, et estimer la morphologie bactérienne et le type de Gram (**bacilles Gram négatifs** (taille plus petite, signal particulier, **cocci Gram positifs** (diffusion lumineuse spécifique), les **leucocytes**, les **levures**, les **cellules épithéliales**, et les **granulats / cylindres urinaires**, ce qui oriente rapidement la prise en charge des infections urinaires.

-Intérêt : permet un tri rapide (quel échantillon doit être cultivé), indication du type Gram en quelques minutes au lieu d'heures. Cela réduit les délais de culture inutile. Exemple : un article a montré une réduction de 37 % des cultures urinaires après introduction de l'UF-4000.

-Limites : ne remplace pas totalement l'identification bactérienne ou l'antibiogramme. Sa Performances moindres en cas de faible bactériurie.



➤ Spectrométrie de masse MALDI-TOF (identification bactérienne)

-Type : Spectrométrie de masse

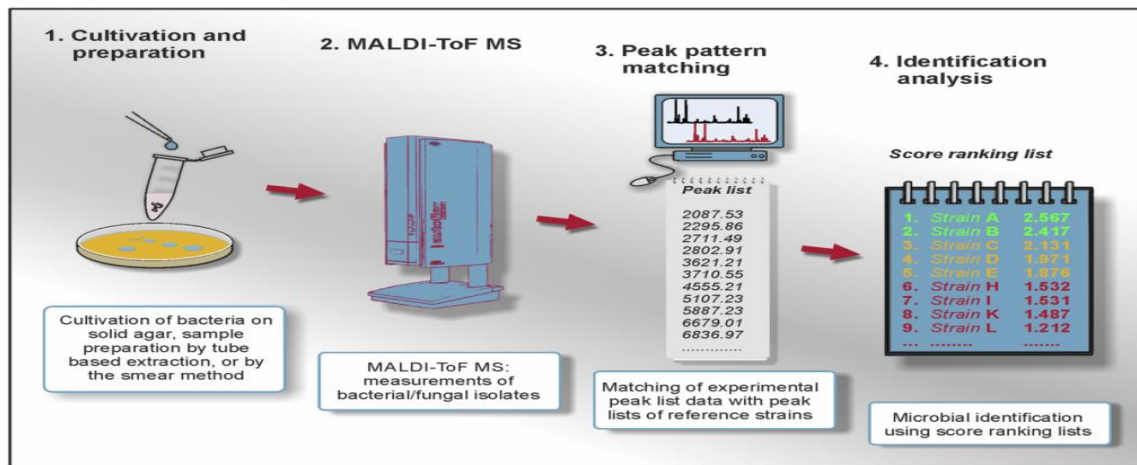
-Applications : identification bactérienne, fongique, parfois virale

-Principe : après isolement de la colonie bactérienne, on réalise une ionisation laser (MALDI) des protéines (principalement ribosomales) et un temps-de-vol (TOF). Le spectre obtenu est comparé à une base de données. Donc l'analyse repose sur :

- ionisation douce par laser,
- mesure du temps de vol des protéines (principalement ribosomales),
- obtention d'un **spectre protéique**,
- comparaison à une base de données pour donner l'espèce.

-Fonctionnement

1. Une colonie bactérienne est déposée sur une plaque métallique.
2. Ajout d'une matrice chimique.
3. Impact laser → désorption/ionisation des protéines.
4. Les ions traversent un tube sous vide → les plus légers arrivent plus vite.
5. Le spectre obtenu est comparé à la base de données du système.



-Performances

- Identification en **1 minute** par spot
- Sensibilité > 95 % pour la majorité des bactéries
- Fonctionne très bien pour : entérobactéries, staphylocoques, streptocoques, bacilles à Gram négatif
- Plus difficile pour : streptocoques du groupe viridans, mycobactéries, anaérobies rares

-Avantages

- Rapide, fiable, peu coûteux
- Peu de réactifs
- Identification de milliers de micro-organismes
- Haute reproductibilité

-Limites

- Nécessite culture préalable (pas d'identification directe dans la plupart des cas)
- Identification limitée pour certaines souches très proches
- Ne donne pas directement l'antibiogramme
- Dépend de la qualité de la base de données

➤ BioKube : identification bactérienne par diffraction laser (automate)

-**Type** : Identification par **diffraction laser** sur colonies

- **Application** : identification bactérienne rapide sans spectrométrie

-Principe

BioKube est un automate d'identification basé sur la **diffraction laser** :

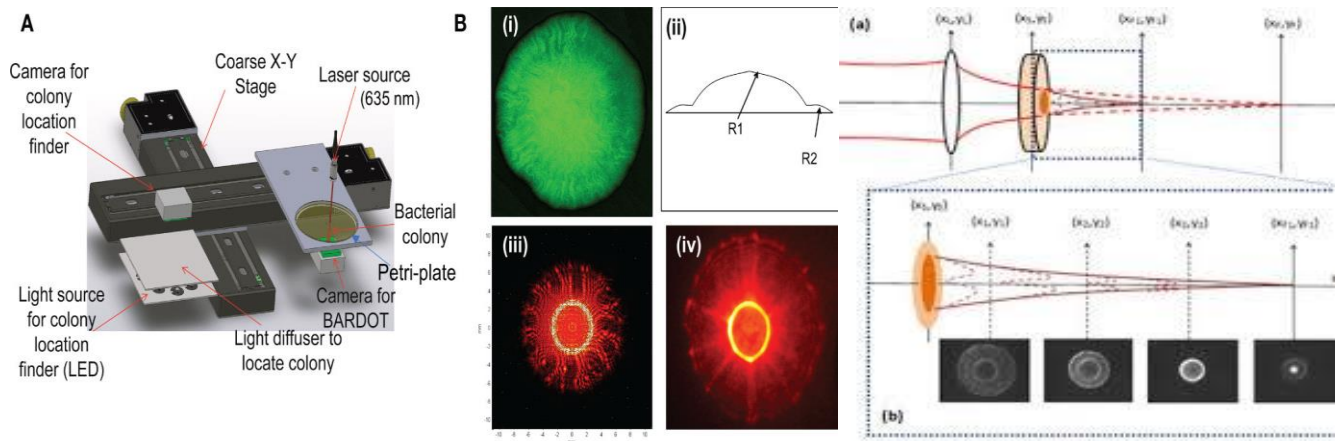
- Un faisceau laser éclaire une colonie bactérienne.
- La colonie agit comme un "réseau de diffraction biologique".
- Le capteur recueille l'image du motif lumineux produit.
- Un algorithme compare ce motif à une base de signatures optiques.

Chaque espèce bactérienne génère un **pattern de diffraction unique**, lié à :

- la structure cellulaire,
- la rugosité de la colonie,
- l'organisation microscopique.

-Fonctionnement

1. Une colonie isolée est placée dans la chambre optique.
2. Le laser projette un faisceau sur la colonie.
3. La figure de diffraction est captée par caméra.
4. L'Intelligence Artificielle associe l'image à une espèce.



-Avantages

- Méthode **non destructive**
- Pas besoin d'extraction chimique
- Très rapide : **quelques secondes** par colonie
- Peu de consommables
- Bon complément lorsque MALDI-TOF non disponible

-Limites

- Dépend de la qualité des colonies (maturité, surface, homogénéité)
- Moins performant que MALDI-TOF pour espèces rares
- Classification encore limitée à certaines bases de données
- Ne donne pas d'antibiogramme

➤ VITEK 2-Compact15 (automate pour l'antibiogramme)

-Type : système d'automatisation complète (antibiogramme)

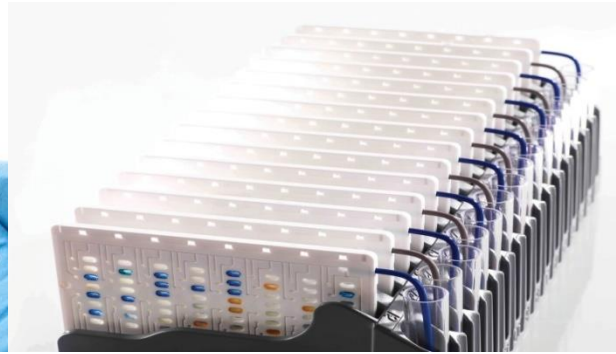
-Application : système automatisé pour l'antibiogramme rapide et standardisé

-Principe : système automatisé pour l'antibiogramme (et identification bactérienne dans certaines versions) qui utilise des cartes/panneaux pré-chargés d'antibiotiques à différentes concentrations, suivi optique automatisé de la croissance bactérienne, et interprétation informatique ; ce qui permet d'obtenir rapidement un profil de sensibilité.

-Fonctionnement

1. La suspension bactérienne est normalisée (0,5 McFarland).
2. Les cartes (ID et/ou AST) sont insérées.
3. L'automate incube à 35–37 °C.
4. Lecture automatique toutes les 15 minutes.
5. Interprétation selon EUCAST/CLSI.





-Performances

- Identification : **2 à 8 heures**
- AntibioGramme : **4 à 10 heures** selon germe
- Très bon pour entérobactéries, staphylocoques, streptocoques, *Pseudomonas*

-Avantages

- Automatisation complète
- Résultats standardisés
- Rapide comparé à la dilution classique
- Bon support pour bactéries fréquentes

-Limites

- Plus lent que méthodes phénotypiques ultra-rapides (microfluidique, imagerie dynamique)
- Peut donner des erreurs ponctuelles :
- faux S ou faux R pour certaines espèces (*Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*)
- Cartes coûteuses
- Nécessite colonies pures