

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.



UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1-

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE



**DETERMINATION DE LA
CONCENTRATION MINIMALE
INHIBITRICE D'UN ANTIBIOTIQUE :
METHODES ET INTERETS**

Thèse d'exercice de fin d'étude

Présentée en vue de l'obtention du titre de docteur en pharmacie

Session : Septembre 2020

Présentée par :

-Briki Maria Karsa

-Belouadah Imane

-Belkhelfa Ahlam

Devant le jury :

-Présidente :Dr. BEROUAKEN. S

-Examinatrice :Dr.AZROU. S

-Promotrice :Dr.BENAMARA. M

M. Assistante en Microbiologie USDB.I

M. assistante en Microbiologie USDB.I

M. assistante en Microbiologie USDB.I



Remerciements

*Tout d'abord on Remercie **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donnée le courage, la santé, la volonté et surtout la patience pour pouvoir accomplir ce modeste travail.*

Nous souhaitons tout d'abord exprimer notre gratitude à l'ensemble de l'équipe pédagogique et administrative du département de pharmacie de la faculté de médecine de l'université de Blida 1.

*Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à notre promotrice Docteur **BENAMARA Mounia**, qui n'a ménagé aucun effort pour que ce mémoire puisse voir le jour, Merci chère Docteur pour votre disponibilité, votre tolérance, votre orientation et vos conseils. Vous avez valorisé notre thèse par un thème minutieusement choisi, ce qui nous a permis non seulement d'acquérir beaucoup de connaissances mais aussi de nous rappeler que la conscience professionnelle et l'intérêt du patient sont la première priorité de notre travail, Veuillez croire Docteur à l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre grand respect.*

Nous remercions également les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger notre soutenance ;

*Nous souhaitons vous exprimer ici, Dr **BEROUAKEN .S** et Dr **AZROU.S** notre gratitude pour avoir examiné et évalué cette thèse.*

*Et pour conclure un grand Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire du CHU Frantz fanon à leur tête madame le professeur **ABDI**, Une dédicace particulière est adressée au Dr **.ZADOUERKEB WALID** (résident en microbiologie); qui nous a orienter et accompagner tout au long de notre travail expérimentale au sein de l'unité de microbiologie.*



DEDICACES

C'est avec grand honneur et beaucoup de fierté que je ponctue mon cursus de doctorat en pharmacie par ce travail.

Je ne peux clôturer mon mémoire qu'avec mes chers, mes Piliers ou encore la raison de ce que j'ai pu venir aujourd'hui,

*Mes parents **Fatima** et **Lakhdar**, vraiment c'est là ou les mots ne suffiront jamais, un sentiment au-delà de toutes expressions. À eux qui ont été à mes côtés aux moments les plus difficiles, m'ont soutenu, m'ont encouragé à accomplir mon chemin avec leurs sacrifices, leurs présences et leurs conseils, Avec leurs amours, leurs inquiétudes et leurs prières que j'arrivais à prendre mon souffle à chaque fois ou à vous mes deux chers que je dédie non seulement mon travail mais plutôt toute ma vie.*

Que dieu vous gardes et vous envoies de sa bénédiction.

*A MES SOEURS ADORÉES : **Malak** ET **Aya**,*

Vous étiez toujours à mes côtés, merci pour votre présence, votre amour et vos encouragements, que ce travail vous témoigne de ma sincère affection.

*A MON CHÉR FRÈRE : **Mahdi**,*

Mon ange et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie, Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

*A MA PETITE fleur **Roeya***

Que dieux te garde pour nous, merci d'être dans ma vie pour faire mon bonheur.

*Une spéciale dédicace à mes chères amies : **Imane** et **Ahlam** merci pour les moments inoubliables durant cette année, merci pour votre amitié et votre soutien.*

Dédicaces

Je tiens d'abords à remercier dieu le tout puissant, de m'avoir donné le courage et la volonté d'élaborer ce travail.

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de toutes mes années d'études

Mes très chers parents, que Dieu me les garde, je ne saurai jamais les remercier pour tout ce qu'ils m'ont apporté, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui, ils m'ont soutenu tout le long de mes études.

Mes très chères sœurs Messaouda, Ouidad et Sara,

Mes chers frères Youcef et Hamza.

Mon neveu Ahmed Chahine.

Mes chères amies Ahlam, Maria et à toutes leurs familles.

Tous ceux qui auront l'occasion de lire ce travail.

En fin à toutes les personnes qui j'espère m'excuseront de ne pas les avoir cité.

Imane

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à

❖ A mes très chers parents

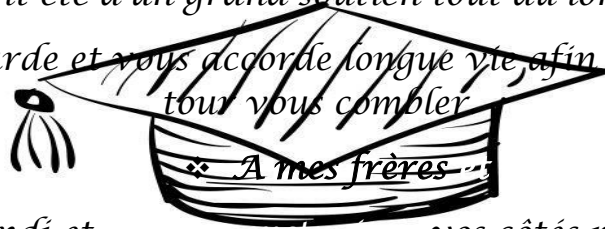
Source de tendresse de volonté et de patience, mes yeux à travers
lesquels j'ai vu et je vois ce monde

Maman, Papa,

Je sais que vous êtes fiers de moi, et vous savez que je suis très fière de
vous montrer ce que j'ai réussi à devenir grâce à vous. Vous êtes et vous
avez toujours été à mes côtés pour ma soutenir, m'aimer, et me
protéger et surtout m'encourager à aller de l'avant.

Vos priées m'ont été d'un grand soutien tout au long de mes études.

Que dieu vous garde et vous accorde longue vie, afin que je puisse à mon
tour vous combler



❖ A mes frères

Pour m'avoir grandi et
uni. Je suis fière des personnes

vos côtés pour ce lien qui nous
é devenue.

❖ A mes amis de la faculté

Merci pour ces années de folies, de rires, je garderai de ces années

Un souvenir impérissable.

❖ A mes deux camarades, Imane et Maria

Merci d'avoir supporté mes mauvaises humeurs. Merci pour tous ces
agréables Moment passés ensemble.

@eucarvalhoanna

À tous les moments partagés ...que tout cela continue ici et ailleurs...

RESUME

Le choix d'un antibiotique pour traiter une infection est guidé par l'étude de la sensibilité in vitro de la bactérie responsable de cette infection aux différents antibiotiques pour bien adapter l'antibiothérapie.

Différentes méthodes phénotypiques d'évaluation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques peuvent être mises en œuvre, parmi celles-ci on cite la détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI), définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après une période d'incubation précise. Elle est déterminée soit en milieu liquide ou bien en milieu solide.

Notre étude porte sur une comparaison entre deux techniques ,de mesure de la valeur de la CMI de la vancomycine chez les souches de l'espèce *Staphylococcus aureus* ,à savoir : la technique de dilution en milieu liquide en micro méthode,réalisée par des microplaques à 96 puits contenant des concentrations croissantes en vancomycine par rapport à la technique de référence qui est la technique de dilution en milieu gélosé (adoptée au sein de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU Blida) ,par la préparation d'une gamme de dilution de l'antibiotique à étudier et de son incorporation dans des boites de pétri contenant le milieu Mueller Hinton (MH) solidifié.

Les constatations issues de l'analyse des résultats de cette étude préliminaire, réalisée entre le 1^{er} Janvier 2020 et le 10 Mars 2020, au niveau de l'unité sus citée, et portant sur un échantillonnage de trente souches isolées de différents prélèvements cliniques, nous a permis de mettre en évidence les avantages non négligeables de la technique de micro dilution en milieu liquide, du point de vue cout et aisance des manipulations et également gain de temps technicien.

Néanmoins nous ne pouvons envisager de l'adopter qu'après la reconduite de cette même étude sur un plus large échantillonnage.

Mots-clés : Concentration minimale inhibitrice, dilution en milieu gélosé, microdilution en milieu liquide, vancomycine, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The choice of an antibiotic to treat an infection is guided by studying the in vitro sensitivity of the bacteria responsible of this infection to different antibiotics in order to properly adapt the antibiotic therapy.

Different phenotypic methods of evaluating the sensitivity of bacteria to antibiotics can be implemented, among them; we quote the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC).

This last one is defined, as being the lowest concentration of antibiotic, which inhibits any visible culture from a bacterial strain after a specific incubation period .It, is determined either in liquid or solid media.

Our study relates to a comparison between two techniques, for measuring the value of the MIC of vancomycin in strains of the *Staphylococcus aureus* species, namely: the technique of broth microdilution , carried out by microplates with 96 wells containing increasing concentrations of vancomycin ,compared to the reference technique which is the technique of dilution in agar medium (adopted within the microbiology unit of the central laboratory of the CHU Blida), by the preparation of a range of dilution of the antibiotic to be studied and its incorporation into petri dishes containing the solidified Mueller Hinton (MH) medium.

The findings resulting from the analysis of the results of this preliminary study, carried out between January 1st, 2020 and March 10th, 2020, at the level of the aforementioned unit, and relating to a sample of thirty strains isolated from different clinical samples, gave us allowed to highlight the significant advantages of the technique of micro dilution in liquid medium, from the point of view of cost and ease of handling and also saving of technician time.

However, we can only consider adopting it after the renewal of this same study on a larger sample.

Keywords: Minimum inhibitory concentration, agar dilution, broth microdilution, vancomycin, *Staphylococcus aureus*.

ملخص

يتم توجيه اختيار المضاد الحيوي لعلاج العدوى من خلال دراسة الحساسية في المختبر للبكتيريا المسؤولة عن هذه العدوى للمضادات الحيوية المختلفة من أجل تكييف العلاج بالمضادات الحيوية بشكل صحيح.

يمكن استخدام الطرق المظهرية المختلفة لدراسة حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية، ومن بينها نذكر تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط، وهو أقل تركيز للمضاد الحيوي الذي يثبط أي نمو مرئي لسلسلة بكتيرية بعد فترة حضانة محددة. هذا الأخير يتم تحديده إما في وسط سائل أو في وسط صلب.

تتعلق دراستنا بالمقارنة بين طريقتين لقياس الحد الأدنى للتركيز المثبط للفانكوميسين في سلالات من نوع المكورات العنقودية الذهبية وهي تقنية التخفيف في الوسط السائل بالطريقة الدقيقة يتم إجراؤها بواسطة صفيحة ميكروية 96 بئر تحتوي على تركيزات متزايدة من الفانكوميسين مقارنة بالتقنية المرجعية وهي التخفيف في وسط الآجار (وهي التقنية المعتمدة داخل وحدة الأحياء الدقيقة بالمختبر المركزي بالمستشفى المركزي الجامعي فرانس فانون بالبلدية). من خلال إعداد مجموعة مخففة من المضادات الحيوية الخاصة بنا ودمجها في أطباق بتري التي تحتوي على هلام.

هذه الدراسة الأولية التي امتدت من 01 جانفي إلى 10 مارس 2020 على مستوى الوحدة المذكورة اعلاه والمتعلقة بأخذ عينات سريرية مختلفة، سمحت بتسليط الضوء على المزايا الهامة لتقنية التخفيف الدقيق في الوسط السائل، حيث التكلفة وسهولة التعامل وكذلك توفير وقت الفني.

ومع ذلك، لا يمكننا التفكير في اعتمادها إلا بعد تكرار هذه الدراسة نفسها على عينة أكبر.

الكلمات المفتاحية:

التركيز المثبط الأدنى، التخفيف في الوسط السائل، التخفيف في وسط آجار، الفانكوميسين، المكورات العنقودية.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RESUMEError! Bookmark not defined.

ABSTRACT.....Error! Bookmark not defined.

ملخص..... **III**Error! Bookmark not defined.

TABLE DES MATIERES..... **IV**

LISTE DES TABLEAUX..... **VIII**

LISTE DES FIGURESError! Bookmark not defined.**X**

LISTE DES ABREVIATIONSError! Bookmark not defined.**XII**

GLOSSAIRE **XIV**

INTRODUCTION

PARTIE BIBIOGRAPHIQUE

**CHAPITRE I : LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE : définition,
indications et apports.**

I.1.Notion de la bactériostase et de la bactéricidie.....3

I.2. Définition.....4

I.3. Indications6

I.4.Interets et apport.....18

I.4.1.Apport du point de vue thérapeutique18

I.4.2. Apport du point de vue technique.....20

**CHAPITRE II : METHODES ET TECHNIQUES DE LA DETERMINATION DE LA
CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE**

II .1.Méthodes de la détermination de la CMI en milieu solide.....22

II.1.1.La technique de dilution en gélose.....	22
II.1.1.1.Principe.....	22
II.1.1.2. Avantages.....	23
II.1.1.3. Inconvénients.....	23
II.1.2.La technique épilomètre-test. (E-test).....	23
II.1.2.1.Principe.....	23
II.1.2.2. Avantages.....	24
II.1.2.3. Inconvénients.....	25
II.2.Méthodes de la détermination de la CMI par dilution en milieu liquide	25
II.2.1. La technique de macro dilution.....	25
II.2.1.1.Principe.....	25
II.2.1.2. Avantages.....	26
II.2.1.3. Inconvénients.....	26
II.2.2.La technique de micro dilution (la micro méthode).....	26
II.2.2.1.Principe.....	26
II.2.2.2. Avantages.....	27
II.2.2.3.Inconvénients.....	27
II.2.3.Les variantes de la micro méthode.....	27
II.2.3.1.Microplaque à antibiotique sous forme déshydratée.....	28
II.2.3.1.1.Technique UMIC.....	28
II.2.3.1.2.Technique sensititre.....	30
II.2.3.2.Microplaque à antibiotique sous forme congelée.....	31

II.2.3.2.1.Technique Trek Sensititre.....	31
II.2.4.Les systèmes automatisés	32
II.2.4.1.L'automate Microscan walkyaway.....	32
II.2.4.2.L'automate Phoenix Becton Dickinson.....	33
II.2.4.3 .L'automate Vitek 2 biomérieux.....	34
II.2.4.4.Avantages de l'automatisation	36
II.2.4.5.Inconvénients de l'automatisation.....	36

**CHAPITRE III : INTERPRETATION DES VALEURS DE LA CONCENTRATION
MINIMALE INHIBITRICE**

III.1. Principes de l'interprétation de la concentration minimale inhibitrice	37
III.1.1. Les concentrations critiques.....	37
III.1.2.L'importance des concentrations critiques.....	38
III.1.2.1.Les concentrations critiques épidémiologiques.....	39
III.1.2.2.Les concentrations critiques cliniques.....	39
III.2.La catégorisation bactérienne.....	41
III.3.Importance de la valeur de la CMI dans la détermination des posologies	42

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES

IV.1. Présentation de l'étude.....	45
IV.1.1. Type et période d'étude	45
IV.1.2. Objectifs	45
IV.1.4. Critères d'inclusion	45
IV.1.5. Critères d'exclusion	45
IV.2.Matériel	4

IV.2.1. Appareillage	45
IV.2.2. Matériel non biologique	46
IV.2.3. Matériel biologique.....	46
IV.3. Méthodes.....	46
IV.3.1.Collecte des souches.....	46
IV.3.2. .Etude de la sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> au vancomycine.....	46
IV.3.2.1.Détermination de CMI de la vancomycine par technique de micro dilution en milieu gélosé.....	46
IV.3.2.2.Détermination de CMI de la vancomycine par technique de dilution en milieu liquide : méthode en microplaque.....	50
IV.3.2.3. Comparaison des techniques.....	54
CHAPITRE V : RESULTATS	
V.1. Évaluation des performances analytiques	56
V.1.1. Souches de référence	56
V.1.2. Résultats des valeurs de CMI obtenues pour les 30 souches de <i>staphylococcus aureus</i> constituant notre échantillonnage	56
V.1.2.1 : Résultats des valeurs de CMI obtenues par dilution en milieu gélosé : méthode de référence.....	56
V.1.2.2 : Résultats des valeurs de CMI obtenues par micro dilution en milieu liquide.....	59
V.2. Bilan de l'évaluation des performances	61
V.3. Comparaison des techniques.....	62
V.3.1. Résultats des valeurs de CMI obtenues par les deux techniques	62
V.3.2.Résultats du test de Pearson r	66
CHAPITRE VI : DISCUSSION	
CONCLUSION	
BIBLIOGRAPHIE.....	XXI
ANNEXES.....	XXX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les différentes indications et circonstances de détermination de la CMI et ce selon les recommandations de l'EUCAST/CA-SFM et du CLSI.....6

Tableau II : Liste des abréviations des antibiotiques..... 17

Tableau III : La relation pharmacocinétique/pharmacodynamique en fonction de la classe thérapeutique.....20

Tableau IV : Comparaison entre les différents systèmes automatisés.....35

Tableau V : Les concentrations critiques PK/PD peuvent varier en fonction de la posologie et de la nature des bactéries.....40

Tableau VI : Recommandations et conséquences sur l'adaptation posologique de vancomycine.....44

Tableau VII : Schéma de préparation des dilutions d'antibiotiques adapté.....47

Tableau VIII: La gamme des concentrations d'antibiotique pour la détermination de la CMI par technique de micro dilution en milieu liquide.....52

Tableau IX : Concentrations critiques et souches témoin de la vancomycine.....54

Tableau X : Les critères d'acceptation selon la norme ISO 20776-2 :2007.....54

Tableau XI : Les résultats de vancomycine testé par rapport aux limites d'acceptabilité définies pour les matériaux de référence.....56

Tableau XII : Valeurs de CMI en µg/ml obtenues en milieu gélosé (lecture de 4 opérateurs)57

Tableau XIII : Valeurs de CMI en µg/ml obtenues par micro dilution en milieu liquide (lecture de 4 opérateurs)59

Tableau XIV : La concordance des lectures visuelles inter-opérateurs.....62

Tableau XV : Valeurs de CMI en µg/ml obtenues par les 2 techniques.....62

Tableau XVI : Classification des souches de *Staphylococcus aureus* selon leurs CMI obtenues par les 2 techniques.....64

Tableau XVII : Comparaison de la micro dilution vis-à-vis référence : Conformité à la norme ISO 20776 à 24h chez les souches de *Staphylococcus aureus*.....65

Tableau XVIII : Evaluation et maitrise des facteurs d'incertitude lors de la réalisation des tests.....68

Tableau XIX : Évaluation et maitrise des facteurs d'incertitude lors de la lecture et interprétation de la CMI70

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Courbes de croissance d'un inoculum bactérien en présence d'antibiotique en concentrations croissantes.....3

Figure 2 : Les indices PK/PD associés avec l'efficacité des antibiotiques.....19

Figure 3 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.....23

Figure 4 : Détermination de la CMI par technique E-test.....24

Figure 5 : Détermination de la CMI par la macro méthode.....26

Figure 6 : Détermination de la CMI par Micro dilution manuelle en plaque.....27

Figure 7 : La barrette UMIC28

Figure8 : UMIC BOX.....28

Figure 9 : La plaque Sensititre.....31

Figure 10 : Cupule Sensititre avec trois puits présentant une croissance.....31

Figure 11: L'automate Microscan walkaway.....32

Figure12:L'automate phoenix (Becton Dickinson).....33

Figure 13 : La galerie d'identification bactérienne et de détermination de CMI de l'automate Phoenix BD.....33

Figure14 : L'automate Vitek2 bio Mériou.....34

Figure 15 : Les concentrations critiques inférieures et supérieures.....37

Figure16 : Les étapes de la réalisation de dilution en milieu gélose.....49

Figure17 : Les étapes de la réalisation de la micro dilution en milieu liquide53

Figure 18 : La répartition des CMI chez les souches de *Staphylococcus aureus* obtenues par dilution en milieu gélosé.....58

Figure 19 : La répartition des CM chez les souches de *Staphylococcus aureus* obtenues par micro dilution en milieu liquide.....60

Figure20 : Comparaison entre les CMI obtenues par les deux techniques.....64

LISTE DES ABREVIATIONS

- **µg** : Microgramme
- **µl** : Microlitre
- **AC** : Agrément catégorique
- **AE** : Agrément essentiel
- **AMM** : Autorisation de la Mise sur le Marché
- **ASC** : Air Sous la Courbe
- **AST**: Antibiotic Sensibility Testing
- **ATB**: Antibiotique
- **AUC**: Air Under Courbe
- **BLSE** : Bétalactamase à Spectre Elargi
- **BMR** : Bactérie Multi Résistantes
- **C max** : Concentration maximale
- **C3G** : Céphalosporine de 3^{ème} Génération
- **C4G** : Céphalosporine de 4^{ème} Génération
- **CAMHB** : Bouillon de Mueller-Hinton Additionné en Cation
- **CA-SFM** : Communauté d'Antibiogramme de Société Française de Microbiologie
- **CIVIP**: Continuous Intra Venous Infusion by Pump
- **CKD EPI**: Chronic Kidney Disease EPIdemiology collaboration
- **CL** : Clairance
- **CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute
- **CMB** : Concentration Minimale Bactéricide
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **CMP** : Concentration Minimale Préventive
- **Cres** : Concentration résiduelle
- **DFG** : Débit de Filtration Glomérulaire
- **E-test** :Epilométre-test
- **E.coli**:*Escherichia coli*
- **EER** : Epuration Extra Rénale
- **EM** : Ecart Majeure
- **EN** : Ecart Mineur
- **ETM** : Ecart Très Majeur
- **EUCAST**: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- **FDA**: Food and Drug Administration
- **G-** : Gram négatif
- **G+** : Gram positif
- **GISA** : Glycopeptide Intermediate *S. aureus*
- **GN** : Gélose Nutritif
- **GRSA** : Glycopeptide Resistant *S. aureus*
- **H** : Heures

-
- **HACCEK** :
Haemophilus ,*Actinobacillus* ,
Capnocytophaga , *Cardiobacterium* ,
Eikenella , *Kingella*
 - **ID** : Identification
 - **IRC** : Insuffisance Rénale
Chronique
 - **ISO** : International Standardisation
Organisation
 - **IV** : Intra Veineuse
 - **Kg** : kilogramme
 - **L** : Litre
 - **LCR** : Liquide Céphalo Rachidien
 - **McF** : McFarland
 - **MH** : Mueller-Hinton
 - **MHB** : Bouillon Mueller-Hinton
 - **MHLAC** : Mueller –Hinton Liquide
Ajustée en Cation
 - **Min** : Minutes
 - **ml** : Millilitre
 - **MRSA** : *Staphylococcus aureus*
Resistant à la Méthiciline
 - **NFS** : Numération Formule
Sanguine
 - **NS** : Non Susceptible
 - **PD** ; Pharmacodynamie
 - **PENI G** : Pénicilline G
 - **PK** : Pharmacocinétique
 - **SDD** : Susceptible Dose Dependant
 - **S.aureus** : *Staphylococcus aureus*
 - **T** : Temps
 - **UFC** : Unité Formant Colonie

GLOSSAIRE

-Air sous la courbe : l'aire sous la courbe de la concentration d'un agent au cours du temps est une mesure de l'intégrale des concentrations instantanées pendant un intervalle de temps, et a pour dimension : (masse/volume) × temps.

-Anaérobie : un organisme anaérobie est capable de vivre et de se développer dans un environnement dépourvu d'oxygène.

-Antibiothérapie : est un traitement par antibiotique. Les indications de l'antibiothérapie est les infections bactériennes. Il existe deux types d'antibiothérapie, la curative et la prophylactique ou préventive (antibioprophylaxie).

-Antibiotique : est une substance naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries.

-Automate : est un dispositif reproduisant en autonomie une séquence d'actions prédéterminées sans l'intervention humaine, le système fait toujours la même chose, ou s'adapte à des conditions environnementales perçues par ses capteurs. L'automate est un objet programmé

-Autres streptocoques : Regroupent les streptocoques des groupes suivants: - Groupe «*S. milleri*» : *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*- Groupe «*S. mitis*» : *S. australis*, *S. cristatus*, *S. infantis*, *S. mitis*, *S. oligofermentans*, *S. oralis*, *S. peroris*, *S. pseudopneumoniae*, *S. sinensis*.- Groupe «*S. sanguinis*» : *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. gordonii*- Groupe «*S. bovis*» : *S. equinus*, *S. gallolyticus* (*S. bovis*), *S. infantarius*- Groupe «*S. salivarius*» : *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. thermophilus*- Groupe «*S. mutans*» : *S. mutans*, *S. sobrinus*

-Bactéricide : substance ayant la capacité de tuer la bactérie.

-Bactérie multi-résistante (BMR) : les bactéries sont dites multi résistantes aux antibiotiques lorsque du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (résistance à plus de 3 familles différentes). Toutes les bactéries peuvent développer une multi résistance, qu'elles soient impliquées dans les infections communautaires (comme le pneumocoque responsable d'infections ORL ou pulmonaire) ou dans les infections nosocomiales.

-Bactériostatique : substance qui inhibe la multiplication des bactéries sans les tuer.

-Barrière hémato-encéphalique : ou hémato-encéphalique, ou hémato-méningée est une barrière physiologique présente dans le cerveau chez tous les tétrapodes (vertébrés terrestres), entre la circulation sanguine et le système nerveux central (SNC).

-Bêtalactamase : enzyme sécrétée par certaines bactéries et permettant à celles-ci de résister aux antibiotiques de la famille des bêtalactamines exemple : pénicillinase (action sur les pénicillines et éventuellement C1G) ; céphalosporinase (active sur les pénicillines et les céphalosporines) ; BLSE: β -lactamases à spectre étendu (c'est une pénicillinase active aussi sur les les céphalosporines avec une synergie permettant de la différencier des céphalosporinases) et les carbapénémases .

-Break point : concentration critique.

-CMI modale : c'est la valeur de CMI dominante c'est-à-dire la valeur de la CMI la plus représentée d'une variable quelconque dans une population donnée.

-Colorimètre : est un appareil permettant de mesurer l'absorbance ou la transmittance,

d'une solution pour un petit nombre de longueurs d'onde prédéterminées. La valeur d'absorbance peut être reliée à la concentration de l'entité colorée.

-Concentration critique : Ce sont des CMI seuils, des bornes, qui permettent de statuer sur la sensibilité ou la résistance d'une bactérie donnée à un antibiotique par comparaison à ces seuils de la CMI prise par cet antibiotique vis-à-vis de cette bactérie

-Concentration maximale : paramètre pharmacocinétique (C_{max} exprimée en ng/l ou mg/l) correspondant à la concentration plasmatique maximale relevée après administration.

-Concentration résiduelle : elle correspond à la concentration plasmatique en principe actif obtenue à la fin d'un intervalle d'administration d'un médicament soit juste avant la prise suivante de celui-ci quelle que soit la voie d'administration et après avoir atteint un état d'équilibre.

-Contrôle négatif : est un contrôle expérimental qui ne répond pas au test. Le contrôle négatif n'est pas non plus exposé directement au test expérimental. Il est fait en parallèle à l'expérience comme une expérience de contrôle. Le contrôle négatif est utilisé pour confirmer qu'il n'y a pas de

réponse au réactif ou au microorganisme (ou à tout autre paramètre) utilisé dans le test. Pour obtenir un bon résultat du contrôle négatif, il convient de s'assurer qu'il n'y a pas de réponse nette au test. Par conséquent, les contrôles négatifs sont utiles pour identifier les influences extérieures sur l'expérience. Par exemple, l'effet des contaminants sur une expérience peut être indiqué.

-Contrôle positif : est un contrôle expérimental qui donne un résultat positif à la fin de l'expérience. Ce type de test donne toujours le résultat sous forme de «oui». C'est une bonne indication pour savoir si le test fonctionne. Par conséquent, les contrôles positifs sont utilisés pour évaluer la validité d'un test.

-Densitomètre : appareil permettant la détermination de la concentration bactérienne d'une suspension par la mesure de sa densité optique.

-Diffusion : phénomène par lequel deux ou plusieurs fluides en contact acquièrent une répartition et des propriétés homogènes.

-Dose de charge : on administre une dose de charge d'un médicament lorsque l'on veut

obtenir très rapidement une concentration plasmatique efficace.

-Écouvillon : tampon de matériel absorbant habituellement enroulé à l'extrémité d'une petite tige et utilisé pour des applications médicales ou pour enlever du matériel d'une surface (prélèvements biologiques).

-Emergence : apparition de nouvelles propriétés.

-Endocardite : est une inflammation de l'endocarde (structures et enveloppe interne du cœur, incluant les valves cardiaques). C'est une maladie assez rare mais souvent grave.

-Etuve de laboratoire : est un appareil de chauffage fonctionnant le plus souvent à la pression atmosphérique (parfois sous vide ou sous gaz neutre) et permettant d'effectuer divers traitements thermiques à température régulée.

-Fluorescence : correspond à un processus dans lequel un atome absorbe de l'énergie, généralement de la lumière à une certaine longueur d'onde, et réémet immédiatement (ou dans un intervalle de quelques nanosecondes) de la lumière à une autre longueur d'onde.

-Fluorochrome : exposé à une lumière UV de longueur d'onde donnée, le colorant (acridine ou fluorescéine par exemple) émet une lumière visible d'une longueur d'onde

- Glycosyltransférases : sont des enzymes qui catalysent la formation de la liaison glycosidique pour former un glycoside.

-Hémodialyse : technique permettant d'épurer le sang avec un filtre (rein artificiel) éliminant les déchets toxiques chez des sujets ayant une insuffisance rénale grave. Elle consiste à faire passer le sang du sujet au travers des membranes d'un circuit d'épuration extracorporelle. Celui-ci filtre le sang et le débarrasse des déchets normalement éliminés par les reins avant de le réinjecter au patient insuffisant rénal.

-Indicateur coloré : est une substance chimique qui prend une couleur caractéristique en présence d'une certaine dose d'une autre substance chimique ou organique, il est utilisé pour les dosages.

-Infection systémique : qualifie une affection globale d'un ensemble, d'un système, y compris le corps d'un animal (ou d'un humain). Elle est systémique car l'infection est souvent d'origine bactérienne, virale, mycosique ou parasitaire de un ou

plusieurs tissus. Elle peut aboutir à un choc septique (septicémie).

-Inoculum : échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.

-Lyophilisation : procédé de conservation d'une substance, d'un corps, et notamment de produits alimentaires et pharmaceutiques, consistant en une congélation rapide et une déshydratation presque totale du produit concerné, qui est ensuite conservé sous vide à la température ambiante et retrouve ses qualités et propriétés premières par simple addition d'eau.

-Méningite : est une inflammation des méninges, des membranes qui entourent notre cerveau et la moelle épinière.

-Métabolisme : est l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent à l'intérieur d'un être vivant pour lui permettre notamment de se maintenir en vie, de se reproduire, de se développer et de répondre aux stimuli de son environnement. Certaines de ces réactions chimiques se déroulent en dehors des cellules de l'organisme, comme la digestion ou le transport de substances entre cellules.

Cependant, la plupart de ces réactions ont lieu dans les cellules elles-mêmes et constituent le métabolisme intermédiaire.

-Mutant : est un organisme ou une cellule présentant un caractère nouveau dû à une mutation génétique.

-Néphélométrie : appareil qui, par utilisation de la diffusion de la lumière par les suspensions, permet d'évaluer la concentration de substances en suspension dans un liquide ou celle d'une émulsion de bactéries.

-Neutropénie : est un trouble hématologique caractérisé par un taux bas de granulocytes (ou polynucléaires) neutrophiles dans le sang.

-Normes McFarland : sont utilisées comme référence en microbiologie pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes pour que le nombre de bactéries se situe dans une gamme de concentrations donnée afin de normaliser les tests microbiens.

-Peptidoglycane : est un composant de la paroi bactérienne maintenant la forme des cellules et assurant une protection mécanique contre la pression osmotique. Il forme une couche fine chez les bactéries à Gram négatif et une couche épaisse chez les

bactéries à Gram positif. C'est un élément dit constant et discriminant chez toutes les bactéries, au même titre que la présence d'un génome ADN et d'une paroi.

- Pharmacocinétique : étudier le sort, le devenir, des médicaments introduits dans l'organisme, de l'absorption à l'élimination en passant par la distribution.

-Pharmacodynamie : étude de l'action exercée par le médicament sur l'organisme.

-Posologie : c'est la quantité du médicament prescrite dans le cadre d'un traitement ou c'est l'étude des modalités de prise d'un médicament et de son dosage.

-Réactif : un composé qui réagit de façon caractéristique en présence d'une autre espèce et permet d'en attester la présence (test chimique), voire d'en évaluer ou même mesurer la quantité.

- Résistance bactérienne : une bactérie est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres bactéries de la même espèce.

-Septicémie : une infection généralisée de l'organisme associée à une réponse inflammatoire grave. Le plus souvent, ce

type d'infection grave ne survient que chez des sujets dont l'état de santé est fragile. Le risque de mortalité est élevé.

-Souche : groupe d'individus en principe génétiquement homogènes (clone).

-Streptocoques A, B, C, G : regroupent exclusivement : *S. pyogenes* pour le groupe A, *S. agalactiae* pour le groupe B, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. equi*, *S. canis* pour les groupes C et G.

-Surdosage : correspond à la prise (ou l'administration) de substances à une dose supérieure à celle pouvant être tolérée par l'organisme. Cette définition implique donc que le terme se réfère à des substances habituellement administrées à l'homme pour produire des effets souhaités, c'est-à-dire aux médicaments traitement d'une maladie ou la modification d'une fonction physiologique.

-Transaminase : sont des enzymes présentes à l'intérieur des cellules, en particulier au niveau du foie et des muscles. Elles interviennent dans une multitude de réactions biologiques.

-Transpeptidase : est une hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques présentant préférentiellement la

configuration $(Ac)_2-L-Lys-D-Ala-D-Ala$. Il s'agit d'une enzyme bactérienne responsable de la réticulation du peptidoglycane pour former une paroi cellulaire rigide.

-Turbidimétrie : est une mesure indirecte de la croissance microbienne par la mesure optique du trouble, par absorbance de la turbidité, produit par cette croissance dans un milieu liquide. La turbidimétrie est utilisée en microbiologie dans un but d'effectuer une numérotation totale des bactéries.

-UFC : abréviation de Unité Formant une Colonie (en anglais, CFU, Colony Forming Unit). C'est l'unité utilisée pour dénombrer les cellules, bactéries ou parasites viables. Une UFC correspond à une colonie observée mais peut correspondre à plusieurs cellules si elles restent agrégées lors du dénombrement. On parle habituellement d'une concentration en "colonies/ml" mais il s'agit en fait d'UFC/ml. En virologie, on emploie le terme d'Unité Formant Plage (UFP) avec la même signification.

-Valeur seuil : est la valeur de la concentration d'un produit à partir de laquelle ce dernier exerce un effet notable.

INTRODUCTION

Introduction

L'émergence et l'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème alarmant de santé publique à l'échelle mondiale [1,2]. Ce phénomène est favorisé par le mésusage des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire [3,4].

Il paraît ainsi primordial de se mobiliser pour la maîtrise de l'antibiothérapie ce qui suggère une optimisation des conditions d'administration en fonction des caractéristiques du patient, de l'agent responsable, du site de l'infection et des caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (PK/PD) de la molécule [4, 5,6].

Le microbiologiste y joue un rôle essentiel, car il permet une identification bactérienne rapide et la mise en évidence des gènes de résistance, le dosage des antibiotiques dans le sang et la détermination rapide et fine de la sensibilité aux antibiotiques par différents tests parmi lesquels la détermination de la concentration minimale inhibitrice qui est un déterminant crucial des stratégies d'optimisation de la thérapie antimicrobienne [4,7].

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance visible d'une culture bactérienne sur un intervalle de temps défini.

La connaissance de la valeur de la CMI permet une adaptation plus personnalisée de la thérapie antimicrobienne grâce à un meilleur choix de l'agent guidé par une compréhension de l'agent pathogène et de sa distribution de CMI [8].

L'objectif de notre travail est : d'abord la description des différentes techniques de détermination de la valeur de la CMI ,mais aussi l'évaluation de la performance de la technique de micro dilution en milieu liquide par rapport à la dilution en milieu gélosé . Et ce pour ce qui est de la

détermination de la CMI de la vancomycine (molécule à large spectre à usage hospitalier exclusif) chez les souches *Staphylococcus aureus*, dont la détermination est obligatoire car l'antibiogramme n'est pas contributive [9].

LA PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :
**«LA CONCENTRATION MINIMALE
INHIBITRICE : définition ; indications et
apports»**

CHAPITRE I : LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE : définition, indications et apports.

I.1. Notion de la bactéricide et de la bactériostase :

Les interactions bactérie/antibiotique dans le temps, en présence de concentrations croissantes d'antibiotique, peuvent se traduire soit par un effet létal de l'antibiotique (bactéricidie) ; Soit par un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase).

La bactéricidie est quantifiée par la concentration minimale bactéricide (CMB) et la bactériostase est quantifiée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) ; les deux concentrations sont exprimées en mg/l. (figure 1).

Un antibiotique est bactéricide si la CMI et la CMB sont proches.

Si le rapport $CMB/CMI \geq 32$, l'antibiotique est bactériostatique, ou s'il s'agit d'un antibiotique habituellement considéré comme bactéricide, la souche est dite tolérante [10].

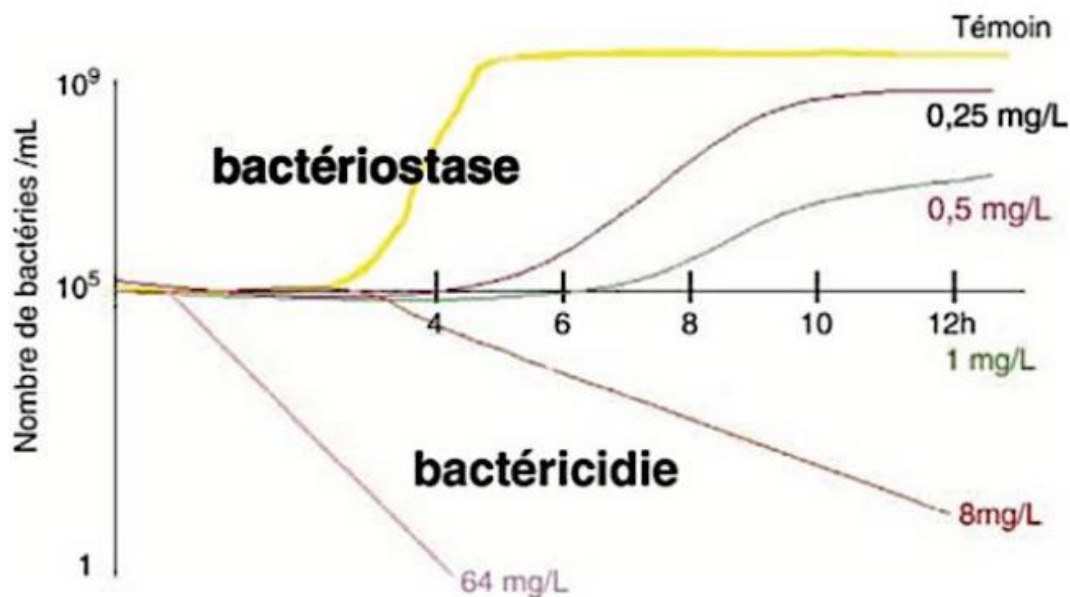


Figure 1 : Courbes de croissance d'un inoculum bactérien en présence d'antibiotique en concentrations croissantes [10]

_croissance d'un inoculum bactérien en concentration de 0.25 mg/l d'antibiotique (témoin).

_croissance d'un inoculum bactérien en concentration de 0.5mg/l d'antibiotique.

_croissance d'un inoculum bactérien en concentration de 1 mg/l d'antibiotique.

_croissance d'un inoculum bactérien en concentration de 8 mg/l d'antibiotique.

_croissance d'un inoculum bactérien en concentration de 64mg/l d'antibiotique.

I.2.Définition.

La CMI est défini comme la plus faible concentration d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance visible d'une bactérie après 24 h d'incubation [10]. Elle traduit le phénotype d'une bactérie en évaluant l'activité bactériostatique d'un antibiotique, mais elle ne permet pas d'évaluer la concentration qui prévient l'apparition de mutants.

- La CMI50 est la plus faible concentration inhibant, 50% de la population étudiée ;
- La CMI90 est la plus faible concentration inhibant, 90% de la population étudiée [11].

Parmi les techniques de détermination de la CMI on cite :

- La méthode de dilution en milieu liquide qui peut se décliner en 2 techniques distinctes : soit en tube, appelée « macro méthode en milieu liquide » ; soit en plaque à 96 puits (fond en « U »), appelée « micro méthode en milieu liquide ». La gamme de concentrations est réalisée par dilution .Après cette dilution, l'inoculum bactérien est ajouté dans les tubes/puits correspondants pour les incubés. La croissance bactérienne, si elle a lieu, se traduit par l'apparition d'un trouble.

L'interprétation est la suivante : s'il y a un trouble, cela signifie que l'antibiotique, aux concentrations testées, n'a pas d'activité antibactérienne ; à l'inverse, s'il y a absence de ce trouble, cela signifie que l'ATB à la concentration correspondante possède une activité antibactérienne [12,13].

Il est nécessaire de réaliser des «contrôles négatifs» afin de vérifier que l'expérience se déroule dans de bonnes conditions opératoires (en particulier la stérilité).

- La seconde méthode disponible est la méthode de dilution en milieu gélosé où la gamme de concentration de l'antibiotique à tester est incorporée dans la gélose, et coulée dans les boîtes de Pétri, puis l'inoculum bactérien sera ensemencé.

La CMI obtenue après incubation s'observe à l'œil nu par l'absence de croissance bactérienne à la surface de la boîte de Pétri. Elle sera ainsi fonction de la concentration en antibiotique, mais aussi de la bactérie testée, dans la limite de la gamme de concentrations testée [12,13].

Une autre technique qui peut se réaliser en milieu gélosé, c'est La technique des bandelettes E-test® qui est basée sur la diffusion en milieu solide d'un gradient d'antibiotique pour mesurer la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne [14,15].

I.3.Indications.

Le tableau ci-après montre les différentes indications et circonstances de détermination de la CMI et ce selon les recommandations de l'EUCAST et du CLSI [9 ; 16,17].

Tableau I : Les différentes indications et circonstances de détermination de la CMI et ce selon les recommandations de l'EUCAST/CA-SFM et du CLSI [9, 16,17].

	CMI à déterminer selon EUCAST/CASFM	CMI à déterminer selon CLSI	Circonstances
	Bactéries non exigeantes		
<i>Enterobacterales</i>	-associations penicillines+inhibiteurs de bêta –lactamase(acide clavulanique – tazobactam)		-traitement d'une infection autre qu'une infection du tractus urinaire
	CTX, CRO, CAZ, ATM, ERT		-présence d'une BLSE et une céphalosporinase. -en cas de résistance à ERT.
	CIP		_infection systémique à <i>salmonella spp</i>
	COL	COL	-quand la colistine est utilisée en traitement, parce que les diamètres

			d'inhibition ne permettent pas de détecter toutes les résistances acquises
	-autres antibiotiques		-en cas d'infections sévères
<i>Acinetobacter spp</i>	-COI	COL, NET	-Les diamètres d'inhibition ne permettent pas de détecter toutes les résistances acquises ce qui impose de déterminer la CMI en cas d'utilisation thérapeutique.
		CLOXA	-recherche d'une BLSE.
<i>Pseudomonas spp</i>	COL	FOS	-Ces antibiotiques sont utilisés en thérapeutique.
		CLOXA	-recherche d'une BLSE (<i>P.aeruginosa</i>)
		PEN, C3G	-détection d'une carbapenemase

<i>Staphylococcus spp</i>	TEC, VAN.ORI(S.aureus) TLV(SARM), DAL	VAN	-En cas d'utilisation thérapeutique, car la méthode de diffusion (disque et gradient en bandelette) n'est pas utilisable car elle ne permet pas la différenciation entre les souches sensibles de celles de sensibilité diminuée aux glycopeptides. -détection de la sensibilité diminuée aux glycopeptides.
	OXA CPT (aureus) BPR (aureus)	OXA	-Souches catégorisées intermédiaires ou résistantes. -détection de la résistance à la méticilline.
	TZD		- mesure de la sensibilité au TZD des souches résistantes au linézolide
	DCY, TCY, MNO		-si nécessaire, en cas de la vérification de la sensibilité au TCY et MIN des souches résistantes à la DCY.
		ERY	-recherche de résistance inductible à la

			clindamycine.
<i>Enterococcus spp</i>		TGC	-en cas de multi résistance.
		VAN	-détection des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides.
<i>Stenotrophomonas</i> <i>Maltophilia</i>	CAZ, TCC	CAZ, TCC, CHL	-en cas d'utilisation thérapeutique
Bactéries exigeantes			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PEN G, AMX, MER	AMX, CTX, IPM, PEN	<ul style="list-style-type: none"> - diamètre de la zone d'inhibition ≤ 20mm du disque d'oxacilline à 1ug - en cas de méningite (hors de méningite pour PENG) -en cas d'endocardite -échec thérapeutique -infections sévères -hors le LCR pour AMX -détection de la sensibilité diminuée aux

			β -lactamines.
<i>Neisseria meningitidis</i>	PEN G, AMX, CTX, CFO MER, CHL, RIF, CIP	PENG , AMP	-évaluation de la sensibilité aux ces antibiotiques à cause de l'inexistence des diamètres critiques.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PEN G, AMX, CFO, CTX, CHL, AZT, CIP, TCY, CFM, MNO, SPY	TCY	-en cas d'utilisation thérapeutique à cause de l'absence des diamètres critiques. -détection d'une sensibilité diminuée aux pénicillines.
<i>Streptococcus A, B, C ou G</i>	DAL, ORI		-en cas d'utilisation thérapeutique
	TGC		-le diamètre d'inhibition est inférieur à 19mm d'un disque de tigécycline à 15ug.
	DCY, TCY, MNO		-si nécessaire, en cas de la vérification de la sensibilité au TCY et MIN des souches résistantes à la DCY.
	DAP		-en cas d'utilisation thérapeutique

<i>Autres streptocoques</i>	PEN G AMX PIP	PEN AMP (streptocoques groupes viridans)	-si besoin et le diamètre d'inhibition est inférieur à 18mm d'un disque de pénicilline à 1 unité.
	(DAL ORI) pour : <i>S.anginosus, S.constellatus, S.intermidis</i> VAN TEI		-évaluation de la sensibilité aux ces antibiotiques
	TZD (<i>S.anginosus, S.constellatus, S.intermidis</i>)		
<i>Haemophilus influenzae</i>	_β-lactamines utilisées en thérapie	VOIR LE GROUPE HACCEK	-le diamètre d'inhibition est inférieur à 12mm d'un disque de pénig à 1 unité. -détection de sensibilité diminuée aux β-lactamines.
	- les antibiotiques destinés à l'usage clinique		-souches résistantes à l'AMC
	CTX CRO		-traitement des infections sévères
	MER		_traitement d'une méningite
	GEN		-traitement d'une endocardite

	DCY MNO		Souches résistantes à la TCY
Autres bactéries			
<i>Helicobacter pylori</i>	AMX LVX CLA – TCY rifabutine MTR	LVX CLA	- utilisation de ces antibiotiques en traitement
	RIF	RIF	- détermination de la sensibilité à la rifabutine
<i>Campylobacter spp</i>	-Différents antibiotiques	ERY, CIP, TCY, DCY	-la corrélation entre CMI et diamètres est difficile à établir -en cas de doute sur les résultats obtenus par diffusion en gélose -en cas de présence d'une zone d'inhibition pour ERY et CIP.
<i>Aerococcus sp</i>	LVX CIP		-souches non sensibles à la norfloxacine
<i>Pasteurella sp</i>	DCY		-souches résistantes à la tétracycline et doxycycline est utilisé en thérapeutique

<i>Listeria monocytogenes</i>		CTX SXT PEN AMP	Infections sévères (méningite)
<i>Bacteroides groupe fragilis</i>	MTR		-si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 15mm d'un disque de métronidazole à 5ug
	CLI		-si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition est compris entre 18 et 23mm d'un disque de clindamycine à 2ug
	LNZ		-si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 27mm d'un disque de linézolide à 30ug
	MXF		-si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition est compris entre 18 et 20mm d'un disque à moxifloxacine à 5ug
<i>Anaerobies strictes à Gram négatif (à l'exception des Bacteroides du groupe</i>	AMX AMC	AMP AMX AMC	-si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition du disque est compris entre 17et20 mm

<i>fragilis</i>	ERT IPM MER	IPM	- si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition du disque est compris entre 18et23 mm
	CLI	CLI	- si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition du disque <15mm
	LNZ		- si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition du disque < 27mm
	MTR	MTR	- si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition du disque <15mm
	MXF	VAN KAN COL CTL CTX	- si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition du disque est compris entre 18et20 mm
	RIF		- si nécessaire et lorsque le diamètre d'inhibition du disque est compris entre 14et20 mm pour les anaérobies strictes à G- et inférieur à21mm.

<i>Groupe HACCEK</i>		PEN AMP AMC CTX IPM VAN AZM CLA CIP LVX TCY CHL RIF SXT	-en cas d'utilisation thérapeutique, parce que la technique d'antibiogramme est non applicable.
<i>Yersinia pestis</i>		STR GEN CIP LVX TCY DOX STX CHL	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Corynebacterium spp</i>	AMX	PEN CTX IPM VAN GEN ERY CLI CIP TCY DOX SXT	-souches résistantes à la PENI G (pour AMX)
<i>Erysipelothrix spp</i>		PEN AMP CTX IPM ERY CLI CIP LVX	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Bacillus anthracis</i>		PEN CIP TCY DOX	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Bacillus mallei</i>		CAZ IPM TCY DOX	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Bacillus pseudomallei</i>		AMC IPM TCY DOX	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Francisellatularensis</i>		STR GEN CIP LVX TCY DOX CHL	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Brucella spp</i>		STR GEN TCY DOX SXT	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Moraxella catarrhalis</i>	DCY MNO	CTX CLI CIP LVX	Souches sensibles à la DCY et

			résistante à la TCY
<i>Lactobacillus spp</i>		PEN AMP IPM GEN VAN ERY CLI	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Leuconostoc spp</i>		PEN AMP GEN MNO	-en cas d'utilisation thérapeutique
<i>Pedicoccus spp</i>		PEN AMP IPM GEN CHL	-en cas d'utilisation thérapeutique

β -LACTAMINES	
Amoxicilline	AMX
Aztréonam	ATM
Ampicilline	AMP
Amoxicilline+ac.clavulanique	AMC
Céfotaxime	CTX
Céftazidime	CAZ
Céftriaxone	CRO
Céfexime	CFM
Ceftaroline	CPT
Ceftobiprole	BPR
Méropeneme	MER
Ertapeneme	ERT
Imipéneme	IPM
Lévofloxacine	LVX
Oxacilline	OXA
Pipéracilline	PIP
Pénicilline	PEN
Ticarcilline	TIC
Ticarcilline+ ac.clavulanique	TCC
AMINOSIDES	
Gentamicine	GEN
Tobramycine	TOB
Nétilmicine	NET
Streptomycine	STR
Kanamycine	KAN
CYCLINES	
Doxycycline	DCY
Minocycline	MNO
Tétracycline	TCY
Tigécycline	TGC
MACROLIDES	
Azithromycine	AZT
Clarithromycine	CLA
Clindamycine	CLI
Erythromycine	ERY
Spiramycine	SPI
PHENICOLES	
Chloramphénicol	CHL
POLYPEPTIDES	
Colistine	COL

Tableau II :

Liste des abréviations des antibiotiques [9].

Glycopeptides	
Daptomycine	DAP
Dalbavancine	DAI
Oritavancine	ORI
Vancomycine	VAN
Teicoplanine	TEC
Télévacine	TLV
QUINOLONES	
Ciprofloxacine	CIP
Moxifloxacine	MXF
SULFAMIDES ET ASSOCIES	
Triméthoprim+ sulfaméthoxazole	SXT
OXAZOLIDINONES	
Linézolide	LNZ
Tédizolide	TZD
Autres	
Rifampicine	RIF
Fosfomycine	FOS
métronidazole	MTR

I.4. Intérêts et apports.

La mesure de la CMI présente plusieurs avantages et son apport peut être apprécié sur le plan technique mais le plus important est son apport du point de vue thérapeutique.

I.4.1. Apports du point de vue thérapeutique :

La détermination de la CMI permet de :

- ❖ mesurer l'index thérapeutique (est le rapport entre la dose curative et la dose maximale tolérée, ou toxique, d'un médicament) dans le cas des méningites, des endocardites ou des infections osseuses, ou toute infection grave au cours de laquelle les concentrations tissulaires doivent se situer largement au-dessus de la CMI de la bactérie pour être efficace [18].
- ❖ affiner un choix thérapeutique, d'inclure les notions de sélection de résistance dans ce choix [18].
- ❖ comparer l'activité des nouveaux agents antimicrobiens [19].
- ❖ surveiller les résistances [19], surtout depuis l'abandon de la nécessité d'interpréter la présence d'une BLSE ou d'une carbapénèmase et donc de statuer systématiquement à la résistance aux C3G-C4G (BLSE ou aux carbapénèmes (carbapénèmases) [20].
- ❖ réaliser la catégorisation clinique qui se fait sur la base de la mesure d'une CMI et de sa comparaison aux concentrations critiques [20].
- ❖ autoriser un suivi thérapeutique indispensable aux ajustements posologiques [21] :

L'atteinte de l'effet antibactérien dépend des interactions entre bactérie, antibiotique et sujet traité. La relation PK/PD rend compte du lien entre le médicament (dose, concentration, exposition) et l'effet antibactérien en fonction du temps.

En antibiothérapie les principaux paramètres PK/PD incluent :

- C_{\max}/CMI : concentration maximale du médicament (C_{\max}) rapportée à la concentration minimale inhibitrice (CMI) ;
- $T > CMI$: pourcentage de l'intervalle d'administration durant lequel la concentration de l'antibiotique est supérieure à la CMI ;

- AUC₀₋₂₄/CMI : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (AUC), rapportée à la CMI ;
- CMP : concentration du médicament prévenant les mutations bactériennes ; c'est la concentration suffisante pour inhiber la croissance de la population bactérienne totale, y compris celle des premiers mutants résistants ;
- Fenêtre de sélection des mutations : compris entre CMI et CMP, c'est l'intervalle de concentrations auquel la sélection de résistance a lieu.

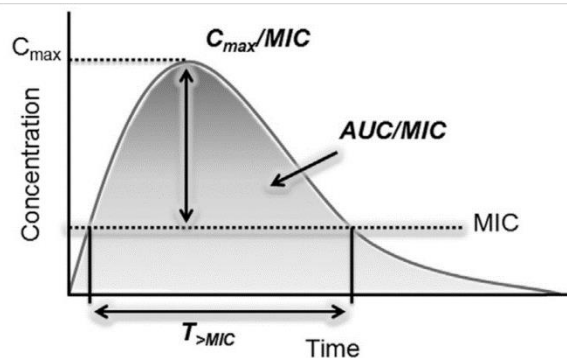


Figure 2 : Les indices PK/PD associés avec l'efficacité des antibiotiques [10].

Les trois premiers paramètres ont été définis comme prédictifs de l'efficacité clinique des antibiotiques. Les deux derniers sont impliqués dans la prévention du risque d'émergence de mutants résistants.

La fourchette thérapeutique optimale est celle qui permet d'atteindre les deux objectifs : il s'agit d'optimiser l'efficacité clinique tout en minimisant le temps pendant lequel la concentration se trouve dans la fenêtre de sélection des mutations.

Par conséquent, la relation PK/PD joue un rôle central dans la démarche d'optimisation posologique de l'antibiotique [22].

Les trois paramètres PK/PD C_{max}/CMI , $T > CMI$ et AUC_{0-24}/CMI , ont récemment permis de classer les antibiotiques de façon nouvelle et de déterminer la surveillance thérapeutique la plus adéquate. L'ajustement optimal des doses doit tenir compte de ces nouvelles notions. (Voir le tableau III).

Tableau III : La relation pharmacocinétique/pharmacodynamique en fonction de la classe thérapeutique [22]

	Bactéricidie concentration-dépendante	Bactéricidie temps-dépendante	Bactéricidie mixte (concentration et temps-dépendante)
Antibiotiques	Aminoglycoside Métronidazole Echinocandines	B-lactamines Linézolide Erythromycine	Fluoroquinolones Glycopeptides Tétracyclines Triazolés
Paramètre d'efficacité à rechercher	Rapport C_{max}/CMI optimale	Concentration en permanence 4 fois supérieurs à la CMI	Rapport aire sous la courbe /CMI optimal
Pour atteindre l'efficacité	Augmenter la dose en ajustant l'intervalle en fonction de l'âge post menstruel	Utiliser une dose de charge et répartir la dose journalière en intervalles plus rapprochés	Augmenter la dose et répartir la dose journalière en intervalles rapprochés

I.4.2. Apports du point de vue technique :

La détermination de la CMI prend une importance particulière dans les situations où l'antibiogramme classique (diffusion en gélose) présente ses limites.

Par exemple :

- ✓ Chez *Pseudomonas aeruginosa*, concernant la fosfomycine (FOS), une souche très résistante peut apparaître « S » sur un antibiogramme par diffusion ; de fait, il est impératif de déterminer la CMI à la FOS, car elle pourra être utilisée dans certaines situations cliniques, par exemple dans les infections urinaires, si la CMI est ≤ 128 mg/L [23].

- ✓ Colistine : c'est mieux de ne plus évaluer la sensibilité à la colistine par des méthodes de diffusion en milieu solide en raison de la mauvaise diffusion de cette molécule de haut poids moléculaire en gélose [24].

Les méthodes par diffusion en gélose donnent fréquemment des résultats erronés avec non détection de souches résistantes (fausses sensibilités et erreurs très majeures dans 2% à 3% des cas) [25,26].

- ✓ Dans le cas des souches des *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides : la méthode de diffusion en disque ne devrait pas être utilisée pour tester la sensibilité des Staphylocoques à la vancomycine.

En effet, certaines souches de staphylocoques ayant une concentration minimale inhibitrice égale à 8µg/ml (classées comme étant de sensibilité intermédiaire) ne sont pas détectées par la méthode de diffusion en disque ; ceci est due au fait que d'une part la vancomycine est une molécule de haut poids moléculaire, et d'autre part que la résistance peut être hétérogène (c'est –à-dire que seule une partie minoritaire de la population d'un clone bactérien exprime cette résistance).

Les recommandations Française du comité de l'antibiogramme (CASFM) proposent la mise en évidence de ce mécanisme la détermination de concentration minimale inhibitrice(CMI) [27,28.29].

- L'antibiogramme détecte mal les résistances suivantes :
 - ✓ Résistance de bas niveau à la teicoplanine des Staphylocoques à coagulase négative. [30]
 - ✓ Sensibilité diminuée aux pénicillines du Gonocoque [30].
 - ✓ Résistance de bas niveau aux fluoroquinolones [30].

CHAPITRE II
<<METHODES ET TECHNIQUES DE
DETERMINATION DE LA
CONCENTRATION MINIMALE
INHIBITRICE >>

CHAPITRE II : METHODES ET TECHNIQUES DE DETERMINATION DE LA CMI.

On distingue les techniques en milieu liquides et celles en milieu solide.

II.1. Méthodes de la détermination de la CMI en milieu solide :

II.1.1. La technique de dilution en milieu gélosé :

II.1.1.1.Principe :

Cette méthode consiste à incorporer l'antibiotique étudié à une concentration donnée dans la gélose .Une série de boites est préparée avec différentes concentrations en antibiotique, procédant de la plus faible concentration en antibiotique à la concentration la plus élevée.

La surface de gélose est ensuiteensemencée avec des inocula des souches bactériennes étudiées.

Une boite de gélose sans antibiotique est faite, elle servira comme contrôle de croissance et de pureté.

Après une période d'incubation, de 16-20h à $35\text{C}^{\circ}\pm 2\text{C}^{\circ}$,

La CMI sera la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible.

Les résultats obtenus sont comparés, aux valeurs critiques, et la bactérie sera classée dans l'une des catégories (sensible, intermédiaire, résistante) [31]. (Figure 3)

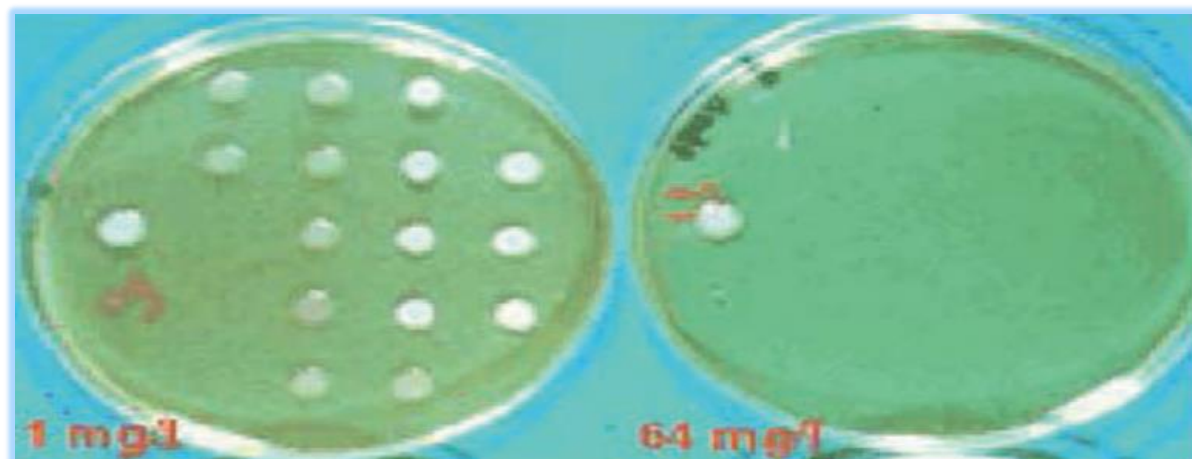


Figure 3 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé [9]

(La figure représente deux concentrations différentes en antibiotique à tester l'une à 1mg /l et l'autre à 64mg/l, par la technique de dilution en milieu gélosé.)

II.1.1.2.Avantages :

- Plusieurs souches bactériennes peuvent être testées pour un seul antibiotique au même temps [32].

II.1.1.3.Inconvénients :

- Méthode non recommandée pour certains antibiotiques diffusant mal en gélose, exemple : la colistine [32].
- Méthode laborieuse [33].

II.1.2.La technique E-test :

II.1.2.1.Principe :

La mesure de la sensibilité aux antibiotiques par la technique E-test repose sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient d'antibiotique [34].

Ce sont des bandelettes en plastique avec une concentration croissante d'antibiotique, placée sur une gélose inoculée avec la bactérie à étudier, la diffusion de l'antibiotique crée une série continue de gradient de concentration dans la gélose, plus on s'éloigne du haut de la bandelette,

moins il y a d'antibiotique qui diffuse à partir de celle-ci ; le gradient ellipsoïde ainsi créé se traduit par une zone d'inhibition autour de bandelette [35].

Après 18 à 24 heures d'incubation, l'ellipse permet la lecture visuelle de la CMI à l'intersection basse avec la bandelette. Cette méthode a été évaluée pour de nombreux antibiotiques et est largement utilisée dans les laboratoires [36]. (Voir figure 4)

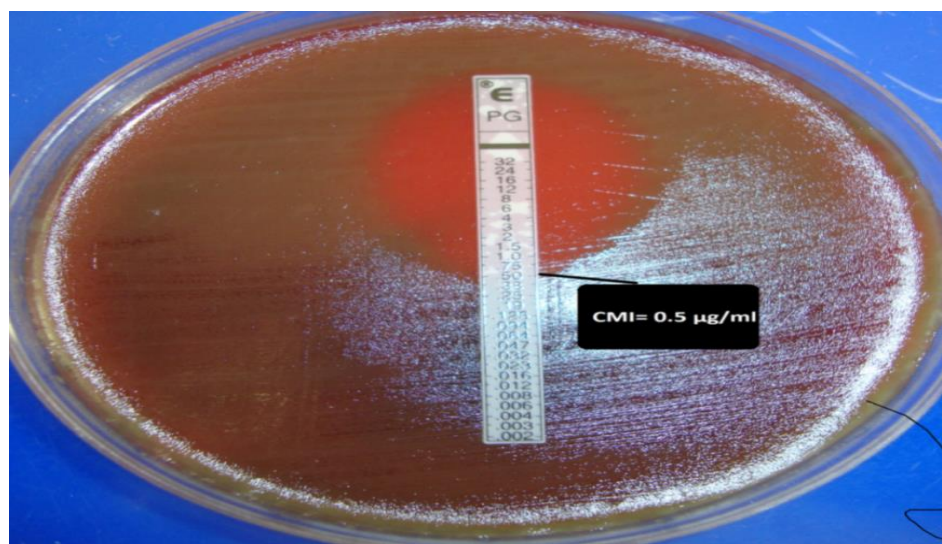


Figure 4 : Détermination de la CMI par la technique E-test [9]

(La figure représente la technique E-test ou' la CMI=0,5µg/ml)

II.1.2.2. Avantages :

- Technique rapide, facile à réaliser [23].
- Les résultats sont bien corrélés aux méthodes de référence [23].
- Cette méthode peut également être utilisé dans l'objectif de mettre en évidence un mécanisme de résistance comme : la résistance aux glycopeptides chez *Staphylococcus aureus*, ici l'antibiogramme n'est pas une méthode suffisamment sensible pour mettre en évidence des variations de CMI ou des mécanismes de résistance hétérogène.

En effet lorsque seule une petite partie de la population exprime cette résistance, il faut utiliser un inoculum plus lourd pour le mettre en évidence .le E-test permet de résoudre ces problèmes techniques [23].

- Permet de contrôler et valider les résultats obtenus par les techniques d'antibiogramme automatisé [34].

II.1.2.3.Inconvénients :

- Technique onéreuse [34].
- Certains travaux montrent que l'E-test donne des valeurs supérieures de CMI par rapport aux méthodes de référence, exemple : cas de vancomycine pour le genre streptococcus [34].
- Lecture et interprétation doivent effectuées par des opérateurs expérimentés [34].

II.2.Méthodes de la détermination de la CMI par dilution en milieu liquide :

Elle est réalisée soit en macro méthode (méthode en tubes), soit en micro méthode (en microplaque) [37].

II.2.1. La technique de macro dilution :

II.2.1.1.Principe :

Cette méthode permet de mesurer précisément la CMI, utilise une série des tubes stériles.

Un volume constant de diluant est réparti dans une dizaine de tubes. Un inoculum d'une suspension bactérienne standardisé et des dilutions doubles d'antibiotique sont ensuite ajoutés dans chaque tube.

Après une incubation, pendant 24heures à 35C°.

La CMI correspond au 1ère tube dans lequel il n'y a plus de croissance bactérienne visible [38].
(Voir figure 5)

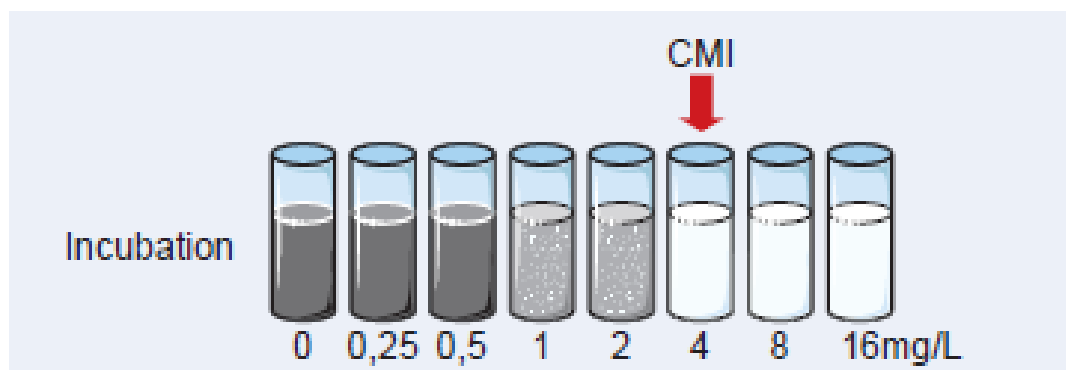


Figure 5 : Détermination de la CMI par la macro méthode [10].

(Figure représente une gamme de concentration en antibiotique allant de 0,25 mg /l jusqu'au 16 mg/l, avec un tube témoin sans antibiotique, la CMI=4mg/l).

II.2.1.2. Avantages :

- Cette méthode permet de mesurer précisément la CMI [38].
- Méthode facile à interpréter [38].

II.2.1.3. Inconvénients :

- Méthode exige beaucoup de temps et de matériel pour effectuer plusieurs échantillons [38].

II.2.2. La technique de micro dilution (la micro méthode):

II.2.2.1. Principe :

Le principe est le même que celui de la méthode en macro-dilution mais ici les volumes sont de l'ordre du microlitre.

Les suspensions bactériennes sont distribuées dans des plaques à puits de micro titrage, contenant 96 puits (12×8) comme un tableau, chaque rangée contenant un antibiotique donné à des concentrations croissantes. Une foisensemencée les plaques sont incubées pendant 24h, à la température optimale de la souche, la CMI correspond à la première cupule dans laquelle la croissance bactérienne a été inhibée à l'œil nu [37]. (Voir figure6)

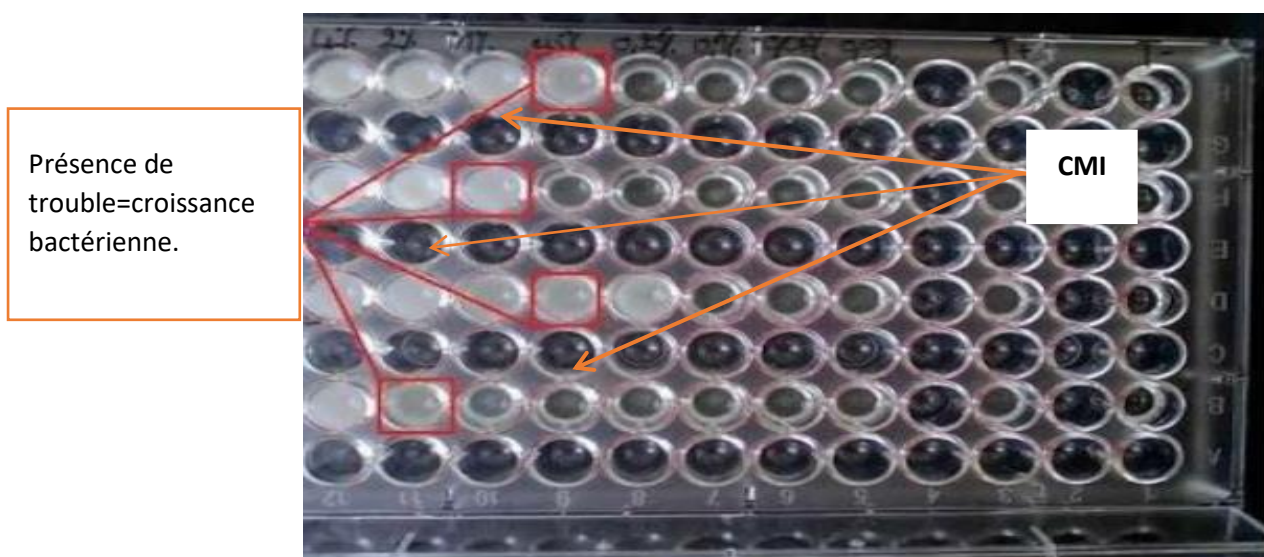


Figure 6 : Détermination de la CMI par Micro dilution manuelle en plaque [39]

Chaque ligne de la plaque correspond à un antibiotique/souche .la CMI est donnée par la première cupule dans laquelle la croissance de la bactérie a été inhibée [37]

II.2.2.2.Avantages :

- C'est une technique standardisée, précise, peu couteuse et facile à mettre en œuvre [32].
- De multiples antibiotiques ou des bactéries peuvent être testé simultanément sur une seule plaque [36].

II.2.2.3.Inconvénients :

- Difficulté d'accès aux poudres d'antibiotiques [36].
- Exigences élevées du contrôle de qualité [36].

II.2.3. Les variantes de la micro méthode :

Des plaques de micro dilution incluant plusieurs antibiotiques à différentes concentrations peuvent être préparées au laboratoire, mais la procédure est contraignante. C'est pourquoi des microplaques prêtes à l'emploi sont commercialisées.

Ces microplaques contiennent des dilutions d'antibiotique, sous forme congelée (ex : Micro Media systems,PASCO)ou déshydratée(ex :Sensititre ,Sceptor,API-ATB) .

Les microplaques qui contiennent les antibiotiques sous formes déshydratée sont plus faciles à stocker (température ambiante) et ont une plus longue durée de vie (en moyenne 12-18 mois) que les microplaques contenant des antibiotiques sous forme congelée [40].

II.2.3.1. Microplaque à antibiotique sous forme déshydratée :

II.2.3.1.1. Technique UMIC :

La société BIOCENTRIC a développé ce qu'on appelle des box avec des barrettes permettant la mesure des CMI selon la norme ISO 20776.



Figure 7 : La barrette UMIC [41]



Figure 8 : UMIC BOX [41]

Ces barrettes concerne la mesure des CMI de la vancomycine, teicoplanine ,daptomycine pour les bactéries à Gram positif ou de la pipéracilline/tazobactam ,colistine pour les germes à Gram négatif.

UMIC est un test manuel de détermination de la CMI par micro dilution en milieu liquide basé sur la réhydratation des antibiotiques contenus en concentration croissante dans les puits d'une barrette, par l'ajout d'une suspension standardisée de la souche à tester.

Après incubation, le résultat est lu et interprété visuellement. Cette galerie de 12 cupules comporte un témoin de pousse, et des concentrations en antibiotique de 0 ; 0,06 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 ; et 64 mg /l

Mode opératoire, lecture et interprétation :

Utiliser des colonies fraîchement isolées à partir d'une culture de 18-24 heures.

Homogénéiser les colonies dans la solution saline jusqu'à l'obtention d'une suspension d'une turbidité équivalente à 0,5 Mc Farland. Soit 20ul de solution à 0,5 McF dans 1980 ul de MH liquide.

Dans les 15 minutes suivant la préparation de l'inoculum, inoculer chaque puits de la barrette UMIC avec la dilution préparée, en raison de 100ul par puits.

Après inoculation, placer la (les) barrette(s) dans une boîte en atmosphère humide (UMIC box) et incuber dans l'étuve à 35C° ±1C° pendant 24 h.

La lecture des résultats est à effectuer dans l'heure suivant la sortie de l'incubateur.

Lire visuellement la barrette :

- Trouble =croissance (positif)
- Limpide =absence de croissance (négatif)
- Le puits de contrôle de croissance doit être positif .dans le cas contraire, le test doit être répété

La CMI obtenue doit être interprétée selon les critères d'interprétation de la version en vigueur de l'EUCAST.

Notes (selon le Guide de lecture EUCAST) :

- Sauts de puits : puits ne présentant pas de croissance entouré de puits présentant une croissance. de nombreux phénomènes peuvent en expliquer l'origine : par exemple, une contamination, une homogénéisation insuffisante de la suspension ou une souche hétéro résistante. Un saut unique peut être ignoré : la CMI est la plus haute concentration au-delà de laquelle aucune croissance n'est détectée. Dans le cas de plusieurs puits sautés sur une même barrette, le test doit être répété.
- Contamination : croissance dans un puits entouré de puits ne présentant aucune croissance. Une telle contamination dans un puits unique peut être ignorée. Néanmoins, si de nombreux puits sont suspectés de contamination, le test doit être répété [42].

Un autre système commercialisé permet la détermination de la CMI :

II.2.3.2.1.2. Technique SENSITITRE :

Des microplaques à 96 puits, disponibles en version standard ou personnalisée, conforme aux recommandations de Food and Drug Administration(FDA), Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing(EUCAST) ; utilisant le principe de méthode micro dilution en bouillon pour déterminer la CMI.

Une plaque personnalisée comportant plus de 20 antibiotiques, ce qui permet de réduire le cout de test par rapport aux méthodes en routine, offre un meilleur suivi de la résistance aux antibiotiques.

Après, ensemencement et incubation dans une étuve standard, les CMI peuvent être lues visuellement avec une platine à miroir ; ou semi automatiquement par le vizon : un système qui affiche sur un écran une image agrandie de la microplaque, image facile à lire qui élimine les erreurs des lectures manuelles et permet d'enregistrer automatiquement les images de tous les échantillons [43].

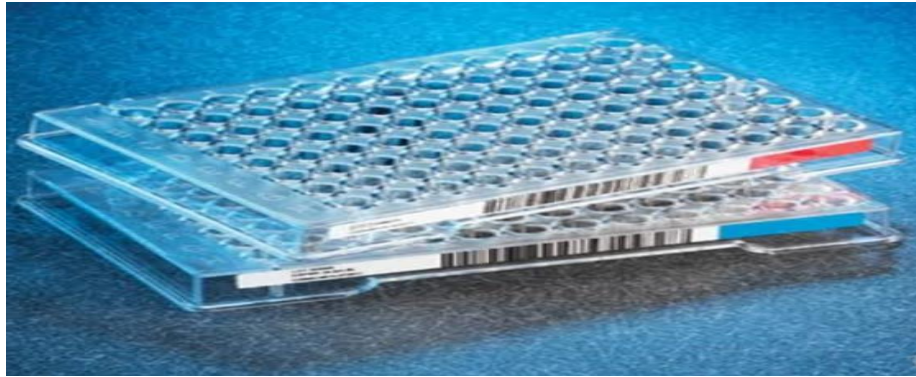


Figure 9 : La plaque sensititre [44]

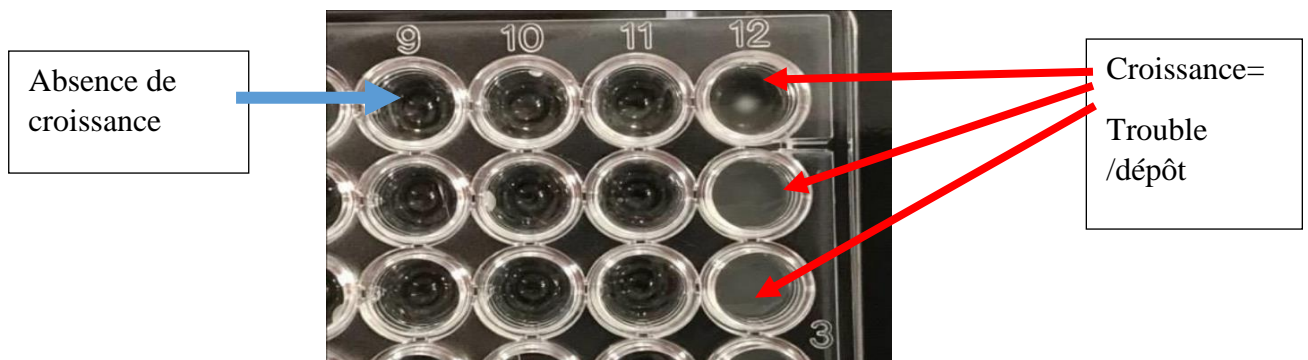


Figure 10 : Cupule Sensititre avec trois puits présentant une croissance [45].

II.2.3.2. Microplaque à antibiotique sous forme congelée :

II.2.3.2.1. Technique Trek Sensititre :

Est une méthode de micro dilution qui utilise la technologie de fluorescence : suite à la croissance bactérienne, les bactéries vont produire une enzyme qui va cliver un substrat libérant ainsi le fluorophore, émettant une fluorescence directement proportionnelle à la croissance bactérienne [32,46].

II.2.4. Les systèmes automatisés :

Pour pallier aux inconvénients des techniques manuelles, l'automatisation des techniques de dilution en milieu liquide a été envisagée, les principaux automates utilisés sont :

Le Phoenix (Becton Dickinson), le Vitek 2 (biomérieux), le Microscan WalkAway (siemens) et le sensistire Aris (thermo scientific) [47].

II.2.4.1. L'automate Microscan WalkAway :

Ce système automatisé a été validée pour l'identification et les tests de sensibilités aux antibiotiques à l'aide de microplaques à 96 puits [48].

28 antibiotiques déshydratés sont incorporés sur pour déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques.

La préparation des plaques, l'inoculum et l'inoculation des panneaux ont été réalisées manuellement en suivant les instructions du fabricant.

Le système Microscan incube automatiquement les panneaux à 35°C pendant 16_24h. L'identification est basée sur des tests conventionnels et chromo géniques, dans lesquelles un substrat est lié à un fluor chrome, la croissance bactérienne entraînant la libération du fluorochrome. Les tests de sensibilité sont basés sur un test de dilution en bouillon.

la CMI est sera déterminer par un système expert (Labro EX logiciel) [49].

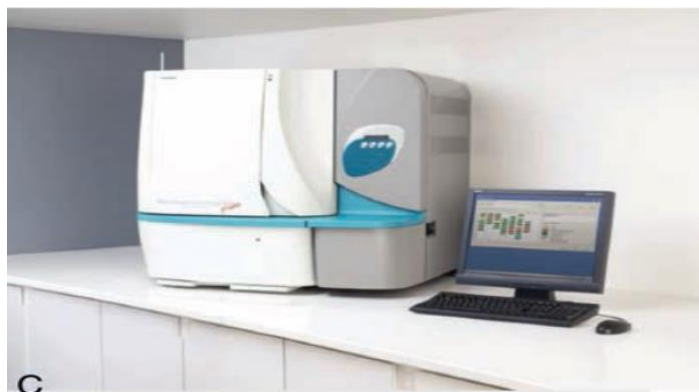


Figure 11: L'automate Microscan Walkaway [10]

II.2.4.2.L'automate Phoenix BD:

C'est un système semi automatisé d'identification et de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. L'ensemencement s'effectue dans des galeries fournies par le fabricant, portant chacune 136 micro-puits contenant des réactifs lyophilisés.

Les galeries sont divisées en deux parties, un servant à l'identification, l'autre à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Cette dernière repose sur le principe de la micro-dilution en bouillon .l'automate effectue une lecture en « continue » (toutes les 20 minutes) de la croissance bactérienne en incubation constante à 35C° [50].



Figure12 : L'automate Phoenix (Becton Dickinson) [10]



Figure13 : La galerie d'identification bactérienne et de détermination de CMI de l'automate Phoenix BD [51]

II.2.4.3.L'automate Vitek 2(biomérieux) :

Dans ce système les microplaques sont remplacées par des cartes en plastiques contenant des antibiotiques sous forme déshydratée.

Le système utilise des « cartes AST », qui contient des micro puits avec des connexions fluidiques pour remplir automatiques les échantillons dans les puits, la carte comporte également un puits sans antibiotiques utilisé comme témoin positif [30].

L'inoculum est préparé manuellement, aucun réactif n'est ajouter.

Avec ce système la CMI n'est pas lue mais calculée grâce à un algorithme par comparaison de la croissance en l'absence d'antibiotique (témoin) et en présence d'une concentration test de chaque antibiotique [40].



Figure14 : L'automate Vitek2 biomérieux [52]

Le tableau ci-après montre les caractéristiques de chaque automate de mesure de la CMI et permet une comparaison entre les différents automates disponibles (tableau III).

Tableau IV : Comparaison entre les différents systèmes automatisés [40]

Paramètre	Microscan (Beckmancoulter)	Phoenix (Becton Dickinson)	Vitek 2(bioMérieux)
Préparation de l'inoculum	Prompt, Renok, SH2000	Phoenix AP	
Modèle (capacité)	MicroscanwalkA way(40 ou 96 microplaques)	BD Phoenix (100 galeries)	Vitek2 (60 cartes)
Panels	CMI+ ID ou CMI ou cC microplaque à 96 puits CMI : gammes de concentration d'antibiotiques de raison de 2	CMI +ID ou CMI Galeries à 2 rangées ,136 puits CMI : gammes de concentrations de raison 2 centrées sur cC	CMI ou ID cartes à 64 puits CMI : 1-6 concentration testée à couverture des cC
Principe de la détermination de la CMI	Lecture direct basée sur l'inhibition de la croissance bactérienne	Lecture indirecte basée sur une modification de couleur liée à l'inhibition de la croissance bactérienne	Calcul grâce à un algorithme basé sur la vitesse de croissance en l'absence d'antibiotique et en présence de concentrations d'épreuve
Lecture : méthode rythme de lecture	Turbidimètre en point final	Colorimétrie (indicateur red-ox)	Néphélométrie toutes les 15 minutes

		toutes les 20 minutes	
Temps moyen de détermination de la CMI	16-18 heures	12 heures	6-8 heures
Système Expert	LabProAlert Validation thérapeutique	BDXpert Validation thérapeutique	Advanced expert system(AES) Validation biologique et thérapeutique

c : concentration critique basale **C** : concentration critique haute **ID** : identification

II.2.4.4. Avantages de l'automatisation :

- Systèmes rapides, réduisent le temps de travail et le délai de réponse au clinicien [40].
- L'automatisation vue sous un aspect quantitatif permet d'augmenter l'efficacité c'est-à-dire la performance [53].
- L'automatisation de certaines tâches répétitives permet une meilleure reproductibilité. (ensemencement, mise en incubation) [53].
- Permet d'éviter la variabilité des résultats associée aux manipulations et aux différences d'interprétations subjectives [54].
- L'informatique gérant ces automates permet la traçabilité, les statistiques, les alertes contre les BMR ainsi que le suivi de l'épidémiologie [54].

II.2.4.5. Inconvénients d'automatisation :

- Coût élevé [52].
- Nécessite d'avoir un support technique et informatique efficace et opérationnel [55].
- Ces systèmes ont une mauvaise détection des contaminations [47].

CHAPITRE III

**«Interprétation de la concentration
minimale inhibitrice»**

CHAPITRE III : INTERPRETATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE.

III.1.Principes de l'interprétation de la concentration minimale inhibitrice :

III.1.1.Concentrations critiques :

La comparaison de la valeur de la CMI aux concentrations critiques, va permettre de déterminer le caractère sensible ou résistant de la souche étudiée (*Figure15*).

- Si la CMI mesurée est en deçà de la concentration critique inférieure, la souche est dite sensible.
- Si elle est supérieure à la concentration critique supérieure, elle sera alors résistante.
- Entre les deux, elle est intermédiaire [37].

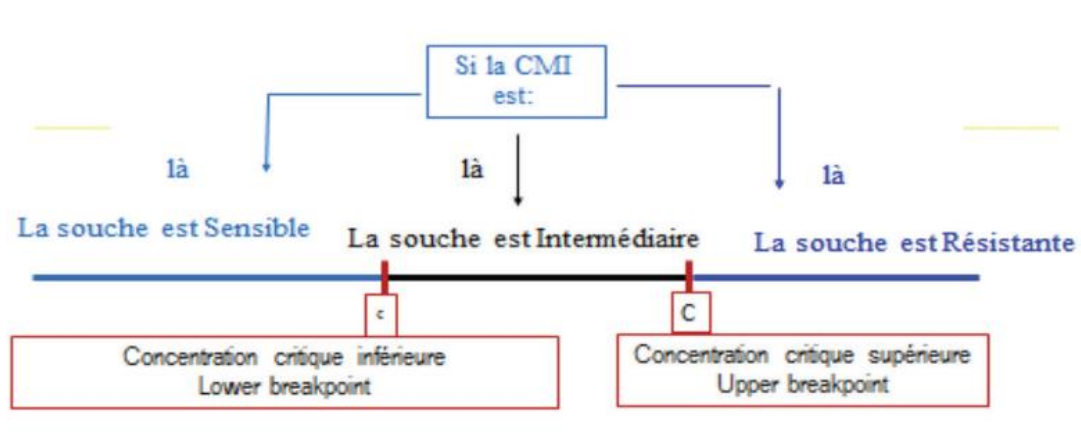


Figure 15 : Les concentrations critiques inférieures et supérieures [37]

•la concentration critique inférieure (CCinf ou c) représente la concentration plasmatique moyenne minimale habituellement obtenue chez un patient suite à l'administration d'une posologie recommandée d'antibiotique.

•la concentration critique supérieure (CCsup ou C) représente la concentration plasmatique moyenne maximale habituellement obtenue chez un patient suite à l'administration d'une posologie recommandée d'antibiotique [56].

Pour certains couples antibiotiques/bactéries, ils n'existent qu'une seule concentration critique, on parle alors de CMI seuils, des bornes, qui permettent de statuer sur la sensibilité ou la résistance d'une bactérie donnée à un antibiotique. Par ex : le couple colistine /Enterobactérie ;*Pseudomonas sp* ;*Acinetobacter sp*, il y a une seule concentration critique 2 mg/l au-dessous de laquelle la souche est sensible et au-dessus de la souche est résistante[16].

III.1.2.L'importance des concentrations critiques :

Dans une population donnée, plus une CMI est éloigné de la concentration critique, plus le risque d'erreur de catégorisation clinique s'amenuise.

L'amplitude de la distribution des CMI d'une population ou résistotype spécifique d'une espèce devient un paramètre influant de manière significative sur le risque d'erreur lors de l'étude de la sensibilité de cette population à un antibiotique.

Si la distribution des CMI est étalée, le risque d'erreur dans l'évaluation de la sensibilité d'une de ses souches est supérieur à ce qui advient avec une population dont la distribution est plus resserrée.

D'autre part, pour une population donnée face aux concentrations critiques de plusieurs antibiotiques, le positionnement respectif de ces concentrations critiques face à la CMI modale de cette population a également son importance.

Toute diminution de la distance entre la CMI modale (C'est la valeur de CMI dominante c'est-à-dire la valeur de la CMI la plus représentée d'une variable quelconque dans une population donnée) et la concentration critique va se traduire par un risque majoré de mauvaise catégorisation d'une partie de la population.

Le degré d'amplitude des répartitions des CMI d'une population va ainsi dépendre de la diversité des phénotypes de résistance composant cette population, les résistotypes, et du niveau de prévalence, de chacun de ces résistotypes.

Ces deux éléments influent sur la répartition des CMI des souches de cette population par rapport à la concentration critique.

Or on sait que le positionnement de la CMI par rapport à la concentration critique peut être décisif sur au moins deux aspects :

- plus la CMI est éloigné du break-point, plus le risque d'erreur d'interprétation est faible, et devient nul pour les valeurs très éloignées.
- plus la CMI est basse, plus les paramètres PK/PD, prédictifs de l'efficacité bactérioclinique des antibiotiques (C_{res}/CMI , C_{pic}/CMI , ASC/CMI) et de leur capacité à prévenir l'émergence de résistance (C_{pic}/CMI et ASC/CMI) prennent des valeurs élevées, favorisant les chances de succès thérapeutiques et minimisant le risque de résistance, et se plaçant ainsi en adéquation avec le bon usage des antibiotiques[18,37,57].

Par ailleurs il est à savoir qu'il existe deux types de concentrations critiques : les concentrations critiques épidémiologiques et les concentrations critiques cliniques.

III.1.2.1. Les concentrations critiques épidémiologiques :

Les histogrammes (courbes) de distribution des CMI des antibiotiques vis-à-vis des espèces bactériennes aboutissent à l'établissement des « concentrations critiques épidémiologiques » (e-coff : « epidemiological cut-off values »), séparant les populations sauvages sensibles de celles ayant acquis des mécanismes de résistance [18, 37, 57] (VOIR l'annexe II)

III.1.2.2. Les concentrations critiques cliniques :

Les concentrations critiques cliniques des antibiotiques ont considérablement évolué ces dernières années du fait d'une maîtrise croissante des facteurs pharmacodynamiques impliqués dans leur détermination.

Ce sont des « bornes » qui permettent de statuer sur la sensibilité ou la résistance d'une bactérie à un antibiotique par comparaison de la CMI à cette borne.

De nombreux paramètres sont pris en considération dans la définition des valeurs seuils [18, 38, 57] (voir l'annexe II) :

- données bactériologiques/épidémiologiques
- données pharmacocinétiques (PK/PD) et pharmacodynamique.
- les données cliniques.
- le site infectieux

En plus des concentrations critiques il ya des différent paramètres sebasant sur :

- ✓ l'âge, par exemple chez les sujet âgés la fonction rénale est diminuée ce qui va influencer l'adaptation de la posologie des médicaments à élimination rénale en fonction de la clairance de la créatinine ; c'est le cas par exemple de la vancomycine (si : Cl créatinine <50 ml/min : 15 mg/kg toutes les 24—96 h,

Cl créatinine <10 ml/min : 1ère dose de 15—20 mg/kg puis mesure quotidienne de la concentration avec ré-administration quand la concentration est <15—20 mg/l)[58].

- ✓ la posologie et l'espèce bactérienne : l'exemple le plus significatif est relatif aux céphalosporines de 3 ème génération vis-à-vis des Entérobactéries, de *Pseudomonas sp.* et des Pneumocoques (Tableau V).

Tableau V : Les concentrations critiques PK/PD peuvent varier en fonction de la posologie et de la nature des bactéries [20].

	PK/PD	Entérobactéries	Pseudomonas	Pneumocoques
Céfipime	4 - 8 2×2g 3×2g	1 - 4	8 3×2g	1 - 2
Céfotaxime	1 - 2 3×1g 3×2g	1 - 2		0.5 - 2
Ceftazidime	4 - 8 3×1g 3×2g	1 - 4	8 3×2g ou 4g cl	

_ Concentration critique. Posologie associée.

- ✓ l'état de santé de l'organisme : la multiplicité des défaillances d'organes entraînant des modifications physiopathologiques influençant les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des antibiotiques utilisés en réanimation, et susceptibles d'en diminuer l'efficacité car toutes les étapes pharmacocinétiques sont concernées :

une diminution du débit sanguin hépatique secondaire à une diminution du débit cardiaque entraîne une diminution du métabolisme des médicaments à fort coefficient d'extraction hépatique. L'activité métabolique met en jeu des systèmes enzymatiques qui peuvent être influencés par certains médicaments inducteurs enzymatiques (rifampicine) qui vont accélérer le métabolisme et ainsi diminuer l'activité si les métabolites sont inactifs.

À l'inverse, d'autres substances peuvent diminuer l'activité des cytochromes P450 par liaison irréversible (macrolides) ou par inhibition réversible non compétitive (fluoroquinolones, kétoconazole, oméprazole [59 ,60].

- ✓ l'écart entre la CMI et la concentration critique.
- ✓ le site d'infection ; par exemple, dans le traitement d'une méningite à *Streptococcus pneumoniae*, une souche avec une CMI basse pour l'antibiotique ceftriaxone pourrait

tout de même être considérée comme résistante étant donné la faible capacité de pénétration de l'antibiotique au travers des membranes hémato-encéphaliques (barrière méningo-encéphalique).

- ✓ Les effets secondaires possibles du médicament, son prix ainsi que la fréquence et la voie d'administration constituent également des facteurs importants ;

Par exemple : Une souche de *Escherichia coli* présente une CMI de 2 µg/ml pour l'amoxicilline et pour la céphalexine. En examinant les dilutions pour l'amoxicilline à 2 µg/ml, cette souche d'*E. coli* se situe à quatre dilutions de la concentration critique. Pour la céphalexine, cette même souche d'*E. coli* dont la CMI est de 2 µg/ml se situe à deux dilutions de la concentration critique. Donc, d'après les CMI, cette souche de *E. coli* est plus sensible à l'amoxicilline qu'à la céphalexine[61,62].

III.2. La catégorisation bactérienne :

A chaque agent antimicrobien correspond une interprétation de la sensibilité : S (sensible), I (intermédiaire) ou R (résistante), suivie par la CMI en µg/ml.

- Le terme « sensible » s'applique lorsque le microorganisme est inhibé par une concentration sérique du médicament atteinte lors de l'utilisation de la posologie habituelle ;
- Le terme « intermédiaire » est utilisé lorsque le microorganisme est inhibé seulement par la posologie maximale recommandée ;
- Le terme « résistant » signifie que le microorganisme demeure résistant à des taux sériques du médicament généralement atteints.

Ces normes d'interprétation ont été établies par le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

En plus de ces catégories (S-I-R), la catégorie **SDD** (de l'anglais : *Susceptible Dose Dependant*) a été intégrée à la catégorie « Intermédiaire ».

Cette catégorie suggère que la sensibilité du pathogène est dépendante de la concentration d'antibiotique à atteindre le site d'infection.

Pour pouvoir considérer le microorganisme « sensible », il est donc nécessaire d'obtenir une exposition plus élevée au médicament. C'est-à-dire d'utiliser des doses plus importantes, des doses plus fréquentes ou les deux à la fois.

Cette catégorie s'applique donc principalement aux antibiotiques pour lesquels plusieurs dosages sont approuvés.

Et la catégorie « **NS** », pour non-susceptible, s'applique aux organismes pour lesquels uniquement le groupe susceptible peut être identifié. Cela est causé par un manque ou une absence de souches résistantes [63].

III.3.Importance de la valeur de la CMI dans la détermination des posologies :

L'établissement des bases rationnelles d'un traitement antiinfectieux implique l'étude des paramètres prédictifs de son activité, qui incluent la sensibilité des germes en cause, d'une part, et le profil pharmacocinétique des agents proposés, d'autre part. Le lien entre ces deux paramètres constitue ce qu'on appelle la pharmacodynamie, qui décrit comment une concentration et un temps d'exposition donnés conduisent à l'effet pharmacologique souhaité, dans le cas présent le contrôle du processus infectieux et, si possible, l'éradication de l'agent causal [64].

Trois niveaux de réflexion sont à prendre en compte : le choix de la molécule, la posologie et la nécessité d'une surveillance des concentrations sériques [65].

Exemple des états pathologiques des patients :

Exemple 1 : En cas d'EER (épuración extra rénale) en réanimation :

L'objectif pharmacodynamique des antibiotiques temps dépendant (β -lactamines, glycopeptides, macrolides, linézolide..) est un taux résiduel avant réinjection supérieur à la CMI pour garantir une efficacité permanente.

L'administration continue de ces antibiotiques en cas d'EER (épuración extra rénale), doit prendre en compte d'une part les objectifs de concentration plasmatique au-dessus du multiple de la CMI nécessaires pour avoir une concentration tissulaire bactéricide, et d'autre part la compensation de la clairance rénale résiduelle et extracorporelle de l'antibiotique.

Lors d'une administration discontinue de l'antibiotique, la réinjection se fait avant que le taux plasmatique ne soit inférieur à la CMI. Cela incite à obtenir le résultat de cette CMI ou par défaut il faut se référer à la CMI maximale rapportée pour les souches sensibles.

La bactéricidie des antibiotiques concentration-dépendante est rapide, intense et augmente avec la concentration de l'antibiotique [66].

Exemple 2 : En cas d'insuffisance rénale chronique (IRC) :

L'adaptation posologique peut être réalisée de différentes manières :

1. Selon la méthode de dose, c'est-à-dire en réduisant les doses unitaires sans modifier l'intervalle d'administration. Cette méthode est préférée pour que les antibiotiques «en fonction du temps» se maintiennent le plus longtemps possible les concentrations supérieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur 24 heures, selon la gravité de l'infection ;
2. Selon la méthode de l'intervalle, c'est-à-dire le maintien des doses unitaires et l'espacement des administrations. Cette méthode est préférée pour les antibiotiques «dépendant de la concentration», car la concentration maximale (Cmax) est le principal paramètre pharmacocinétique corrélé avec l'efficacité ;
3. Selon la méthode mixte, c'est-à-dire lorsque la méthode de dosage n'atteint pas des concentrations suffisantes ou lorsque la méthode d'intervalle ne conduit pas à une couverture thérapeutique suffisante entre deux administrations.

L'objectif principal est d'obtenir une concentration d'antibiotique dans l'intervalle thérapeutique (c.-à-d. efficace et non toxique).

Cette adaptation est d'autant plus nécessaire que le suivi thérapeutique des médicaments n'est souvent pas facilement disponible dans la plupart des hôpitaux, sauf les aminosides et la vancomycine.

Dans la pratique clinique de routine, l'évaluation de la fonction rénale doit être réalisée avec la formule CKD-EPI (chronic kidney disease) pour l'ajustement de la posologie. Le DFG (débit de filtration glomérulaire) est obtenu en $\text{ml} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$ et doit être rapportée à la surface corporelle réelle du patient et exprimé en ml / min [67]. (Tableau VI)

Tableau VI : Recommandations et conséquences sur l'adaptation posologique de vancomycine [67]

antibiotiques	Recommandations	Ajustement posologique chez les patients atteints d'IRC
vancomycine	<p>Prophylaxie chirurgicale : dose unique de 15 mg / kg en perfusion IV d'une heure</p> <p>Traitement curatif : CIVIP doit être préféré : dose de charge 30 mg / kg en perfusion de 2 heures, puis 20 à 30 mg / kg / jour pour les infections faibles ou 30 à 40 mg / kg / jour pour les infections sévères.</p> <p>Les doses doivent être adaptées à la CMI du micro-organisme et les concentrations résiduelles.</p>	<p>Dose de charge, puis ajustement de la dose en fonction des concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre.</p>

Exemple 3 : En cas de neutropénie :

À gravité équivalente, le terrain peut avoir également un impact sur l'efficacité des antibiotiques. Ainsi, par exemple les patients neutropéniques semblent nécessiter des $T > CMI$ plus élevés de céfépime que les patients non neutropéniques. Tam et al. ont ainsi montré chez 20 patients neutropéniques traités par céfépime, que le succès microbiologique (90 % de succès) était possible si les concentrations étaient au-dessus de 4 fois la CMI pendant 95 % du temps. Pour ce qui est des carbapénèmes, un travail d'Ariano et al. portant sur 50 patients neutropéniques fébriles traités par méropénème retrouve que les patients évoluant favorablement avaient en moyenne un $T > CMI$ de plus de 85 %, versus 59 % pour les non-répondeurs ($p = 0,04$). Avec un $T > CMI$ au-delà de 75 %, 80 % des patients évoluaient favorablement, alors qu'en cas de $T > CMI$ inférieur à 50 %, seuls 36 % des patients évoluaient favorablement ($p = 0,01$).

Ces données suggèrent que les niveaux d'exigence de temps passé au-dessus de la CMI varient selon le couple bactérie antibiotique en cause, mais également le terrain [65].

LA PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE IV

«MATERIEL ET METHODES»

CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES

IV.1.Présentation de l'étude :

IV.1.1.Type et Période d'étude :

Il s'agit d'une étude prospective réalisée au niveau de l'unité de bactériologie du laboratoire central du Centre Hospitalier Universitaire de Blida unité FRANTZ FANON.

L'étude a été conduite sur la période allant du 1 Janvier au 10 Mars 2020.

IV.1.2.Objectifs :

Les objectifs de notre étude sont les suivants :

-mise en place de la technique de micro dilution en milieu liquide au niveau de l'unité de microbiologie.

- évaluation de la performance de la technique de micro dilution en milieu liquide par rapport la méthode de référence à savoir la dilution en milieu gélosé et ce pour la détermination de la CMI de la vancomycine chez les souches *Staphylococcus aureus* ; avec une comparaison des deux méthodes suscitées sur le plan de la reproductibilité, de la simplicité de réalisation ;

Le but ultime de savoir si l'on peut envisager de remplacer la technique de dilution en milieu gélosé par la technique de dilution en milieu liquide en micro méthode.

IV.1.3.Critères d'inclusion :

- Notre échantillonnage est constitué des souches de l'espèce *Staphylococcus aureus*, incriminées dans diverses infections diagnostiquées au laboratoire (bactériémies, infections urinaires, suppurations...)

-La taille de l'échantillonnage est de 30 souches.

IV.1.4.Critères d'exclusion :

Ont été exclu de notre étude toute souche n'appartenant pas à l'espèce *Staphylococcus aureus* ainsi que les souches redondantes.

IV.2.Matériels :

IV.2.1.Appareillage :

Balance, autoclave, bec bunsen, bain-marie, réfrigérateur, étuve, séchoir, densitomètre.

IV.2.2. Matériels non biologiques :

Les milieux de culture (annexe V), les tubes en verre stérile, seringues, boîtes de pétri, pipettes pasteur stériles, écouvillons stériles, pince, portoirs, poudre de vancomycine, eau physiologique, eau distillée, micropipettes (5µl ,20µl, 25µl, 70µl ,100µl ,1000µl) et microplaques.

IV.2.3. Matériels biologiques :

- Les souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, constituant notre échantillonnage.
- Les souches de référence : utilisées pour valider la technique effectuée :
 - ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sensible à la vancomycine.
 - ❖ *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (il s'agit d'une souche connue résistante à la vancomycine avec une valeur de CMI supérieure à 128µg/ml).
 - ❖ *Escherichia coli* ATCC25922 (naturellement résistante à la vancomycine).

IV.3 .Méthodes :**IV.3.1. Collecte des souches :**

La collecte des souches et la constitution de l'échantillonnage a été effectuée après l'isolement des souches à partir des divers prélèvements reçus dans un but diagnostique et leurs identification par les tests suivants : Gram, catalase et coagulase ,et une conservation sur GN inclinée.

IV.3.2. Etude de la sensibilité des souches *Staphylococcus aureus* à la vancomycine**IV.3.2.1. Détermination de la CMI de la vancomycine par technique de dilution en milieu gélosé :**

La détermination de la CMI de la vancomycine par technique de dilution en milieu gélosé (qui est la méthode de référence) a été réalisée selon les recommandations nationales en vigueur selon le mode opératoire suivant :

Mode opératoire :Préparation de la gélose :

- Le milieu Mueller-Hinton gélosé est liquéfié par ébullition puis maintenu à la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.

-Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique :

-Peser 16mg de poudre titrée de vancomycine. Diluer dans le volume de 15.625 ml d'eau distillée pour obtenir une concentration de 1024 µg/ml (solution-mère).

-prendre 1ml de la solution mère et le diluer dans 11.8ml d'eau distillée pour obtenir une solution de concentration de 80µg/ml.

-Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 (4ml /4ml), dans l'eau distillée, jusqu'à la concentration finale de 2.5 µg/ml.

-Répartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Ne pas changer de pipette.

-Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires.

La dilution obtenue (1/10ème) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 8µg/ml à 0,25 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées (tableau VI).

-Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.

-Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

Tableau VII : Schéma de préparation des dilutions d'antibiotiques (adapté).

Etape	Concentration µg/ml	ATB (ml)	Diluant (ml)	Concentrations intermédiaires (µg/ml)	Concentrations finales dans la gélose (µg/ml)
Solution mère	1024	/	/	1024	102.4
1	1024	1	11.8	80	8
2	80	4	4	40	4
3	40	4	4	20	2
4	20	4	4	10	1
5	10	4	4	5	0.5
6	5	4	4	2.5	0.25

Préparation de l'inoculum bactérien :

- Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 MF.
- Diluer l'inoculum au 1/100ème en eau physiologique (100µl de l'inoculum dans 10ml d'eau physiologique).

Dépôt des spots bactériens :

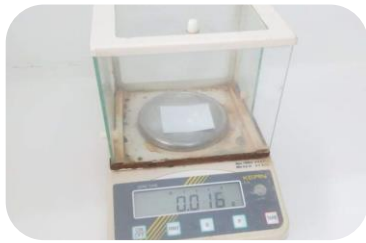
- Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose à l'aide d'une micropipette 20µl par spot, (la taille du spot est de 5 à 8 mm)
- Cette opération d'effectue dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum.

Incubation :

- Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn).
- incuber les boîtes couvercle vers le haut à $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ pendant 16-20 heures.

Lecture des CMI :

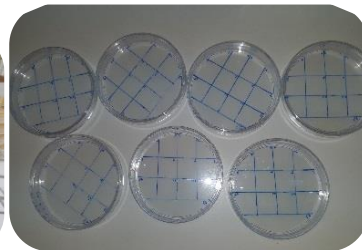
- Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive
- Noter la CMI (la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible).
- Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film
- Si on note plus de 2 colonies persistantes ou si l'on constate une réapparition de la culture au-delà de la CMI, vérifier la pureté de l'inoculum et refaire le test.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories « sensible, intermédiaire ou résistante»



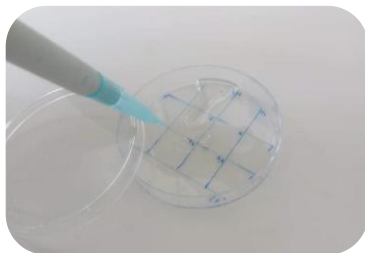
1-la pesée de 16mg de vancomycine



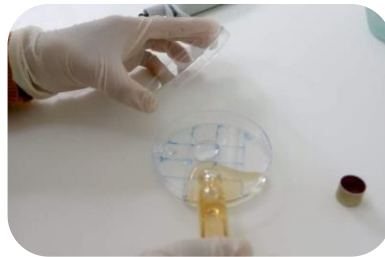
2-préparation des dilutions de vancomycine



3-préparations des boîtes de pétri



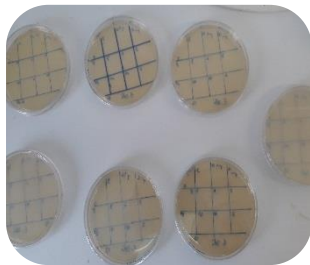
4-l'ajout de 2ml de vancomycine



5-l'ajout de 18ml de Muller-Hinton



6-homogénéisation



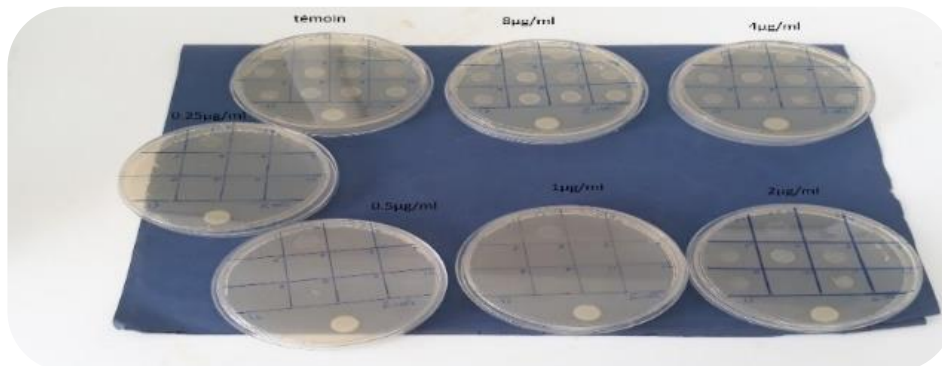
7-solidification



8-préparation de l'inoculum bactérien



9-incubation à 37°C pendant 24h



10-lecture des CMI après 24h

Figure16 : Les étapes de la réalisation de dilution en milieu gélosé (originale)

IV.3.2.2. Détermination de CMI de la vancomycine par technique de micro dilution en milieu liquide : (méthode en microplaque)

La méthode de micro dilution en milieu liquide en microplaque à 96 puits a été effectuée selon la méthode standard du CLSI2014.

Il s'agit d'une technique non automatisée qui nécessite la préparation préalable des gammes d'antibiotiques et des inocula.

Mode opératoire :

La technique a été réalisée comme suite :

a) **milieu de culture utilisé :** c'est le milieu Mueller-Hinton liquide (MHL)

b) **préparation des gammes de concentration d'antibiotiques :**

- peser 16 mg de poudre titrée de vancomycine. Dans un tube stérile, dissoudre dans 15,625 ml de l'eau distillé pour obtenir une solution mère à 1024 μ g/ml.

Nous sommes partis d'une solution de vancomycine à 64 μ g/ml. Afin d'obtenir une gamme de concentration de 8 μ g/ml à 0,25 μ g/ml. (Voir tableau VII)

Qui a été réalisée comme suite :

- dans un tube stérile, et à l'aide d'une seringue prélever 15 ml d'eau distillée, puis ajouter 1ml de la solution mère d'antibiotique à 1024 μ g/ml. pour obtenir une concentration à 64 μ g/ml.

c) **préparation de la microplaque :**

- le travail a été effectué devant le bec bunsen
- à l'aide d'une micropipette, 25 μ l de Mueller-Hinton liquide ont été distribués dans chaque cupule de la microplaque.
- Ensuite, à partir de la solution d'antibiotique 64 μ g/ml ,25 μ l ont été prélevés puis mélangés au 25 μ l de Mueller-Hinton liquide contenu déjà dans la première cupule.
- Par la suite 25 μ l du contenu de première cupule ont été prélevés puis déposés dans la cupule adjacente et ainsi de suite. Ces dilutions permettant d'obtenir des concentrations décroissantes d'antibiotiques (32 μ g/ml à 1 μ g/ml).
- Une rangée de cupules sans antibiotique est utilisée comme témoin pour vérifier la croissance bactérienne.

- La souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible à la vancomycine) a été utilisée comme témoin négatif et les souches : *Enterococcus faecium* (souche connue résistante à la vancomycine avec une valeur de CMI supérieure à 256 µg/ml) et *E.coli* (résistante naturellement à la vancomycine) ont été utilisées comme témoin positif.

d) préparation de l'inoculum bactérien :

- préparer à partir d'une culture pure de 24 heures sur gélose nutritive(GN) (voir l'annexe V).
- Ensuite, prélever à l'aide d'une pipette à pasteur stérile 1 à 2 colonies qui seront introduites dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile dans un tube stérile, pour obtenir une suspension bactérienne d'une turbidité 0,5 MCF.
- Diluer la suspension d'opacité 0,5 McF au 1/10^{ème}.
- Dans les 15 minutes suivant la préparation de l'inoculum, inoculer 5µl de suspension bactérienne dans chaque cupule de la microplaque.

e) distribution du milieu Mueller-Hinton liquide :

- Repartir dans chaque cupule 70 µl de MH. la concentration d'antibiotique obtenue va ainsi de 8µg/ml à 0,25µg/ml. (Voir tableau VII)

f) incubation :

- Recouvrir la plaque d'un couvercle en plastique et l'incuber à 37°C pendant 24 heures.

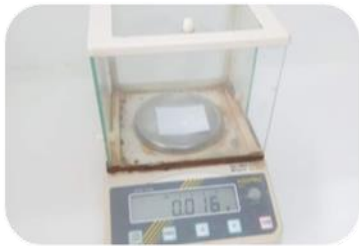
g) lecture :

- Sur un fond noir, et à l'œil nu la CMI de chaque souche correspond au 1^{ère} cupule claire (pas de culture visible par rapport au témoin sans antibiotique).
- comparer la CMI lue aux CMI critiques.
- classer ensuite les bactéries dans les catégories S, I ou R selon le résultat.

Tableau VIII : La gamme des concentrations d'antibiotique pour la détermination de la CMI par technique de micro dilution en milieu liquide [9].

N° de cupule	Volume de MHI ajouté (µl)	Volume de solution d ATB à rajouter (µl)	Concentration Intermédiaire (µg/ml)	Inoculum (µl)	Volume MH ajouté (µl)	Concentration final dans chaque cupule : 100µl
1	25	25	32	5	70	8µg /ml
2	25	25	16	5	70	4µg/ml
3	25	25	8	5	70	2µg /ml
4	25	25	4	5	70	1µg/ml
5	25	25	2	5	70	0,5µg/ml
6	25	25	1	5	70	0,25µg/ml
Témoin	25	–	–	5	70	–

La lecture des CMI obtenues par chaque technique est faite par 4 opérateurs, pour évaluer la variation inter-opérateurs et l'exprimer par pourcentage de concordance inter-opérateur.



1-préparation de la solution d'ATB



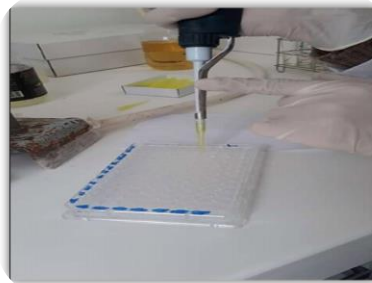
2-une microplaque prête au remplissage



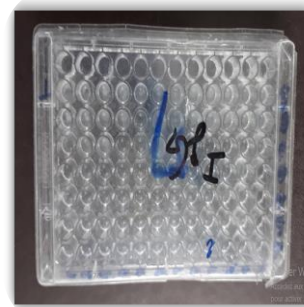
3-le milieu Muller Hinton liquide



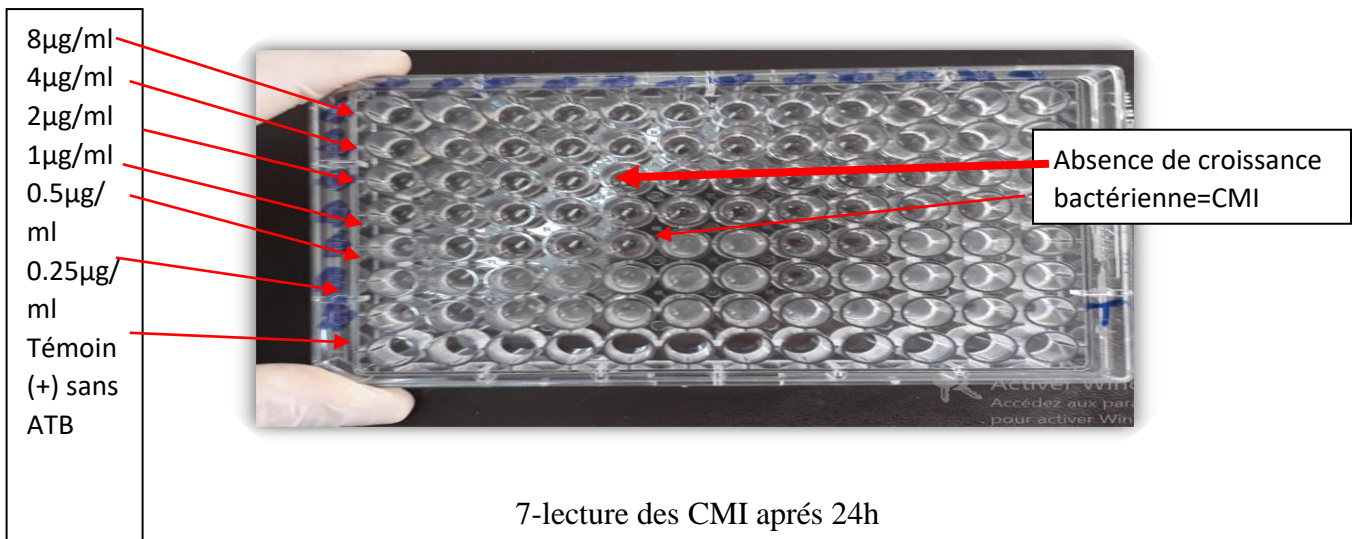
4-préparation des suspensions bactériennes



5-remplissage de la micropipette



6-incubation de la microplaque à 37°C pendant 24h



7-lecture des CMI après 24h

Figure17 : Les étapes de la réalisation de la micro dilution en milieu liquide (originale)

V.3.2.3. Comparaison des techniques :

Avant toute comparaison des résultats obtenues après validation de la technique de référence, une catégorisation des souches est faite et ce en accord avec les recommandations en vigueur du CLSI2014 (Tableau ci-dessous).

Tableau IX : Concentrations critiques et souches témoins de la vancomycine [9].

Antibiotiques	Concentrations critiques En ($\mu\text{g/ml}$)			Souches témoins
	Sensible	Intermédiaire	Résistant	
<i>S.aureus</i>	≤ 2	4-8	≥ 16	<i>S.aureus</i> ATCC 25923 (sensible)

Les résultats obtenus pour la technique de micro dilution en milieu liquide sont par la suite comparés aux résultats obtenus avec la méthode de référence et les critères d'acceptation calculés *selon la norme ISO 20776-2 :2007* comme indiqué dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X : Les critères d'acceptation selon la norme ISO 20776-2 :2007 .

Critères de validation	CMI obtenues /référence	Souches	Seuils
Agrément catégorique(AC)	Même catégorie clinique(S, I, R)	Toutes	≥ 90
Agrément essentiel(AE)	$\neq 1$ dilution \log_2	Toutes	≥ 90
Ecart très majeur(ETM)	S au lieu de R	Résistantes	≤ 3
Ecart majeur(EM)	R au lieu de S	Sensibles	≤ 3
Ecart mineur(EN)	R ou S au lieu de I ou l'inverse	Toutes	

L'agrément catégorique (AC) est obtenu quand les valeurs de CMI classent la souche dans la même catégorie clinique (S ou R) que la méthode de référence.

$$AC = \frac{\sum (\text{résultats concordants entre les techniques})}{\text{nombre total de souches testées}}$$

L'agrément essentiel (AE) :

AE = (nombre de souches avec un écart de CMI < deux dilutions entre les deux méthodes) / nombre total de souches testées.

Un écart majeur (EM) correspond à un résultat classant la souche résistante quand elle est sensible par la méthode de référence (faux résistant).

Un écart très majeur (ETM) correspond à une souche catégorisée sensible alors qu'elle est trouvée résistante par la méthode de référence (faux sensible).

Si l'ensemble des critères d'acceptation sont satisfaits, la méthode testée est considérée comme performante comparativement à la méthode de référence.

Concernant l'analyse statistique des résultats, pour comparer les valeurs de CMI obtenues par les deux méthodes différentes, nous avons opté pour l'utilisation du test de corrélation de Pearson r .

Ce test permet d'évaluer la puissance de la relation entre deux séries de valeurs discontinues (CMI) non indépendantes (même inocula bactériens).

Le coefficient de corrélation r peut avoir une valeur comprise entre -1 et +1. Plus la valeur absolue du coefficient est importante, plus la relation linéaire entre les variables est forte. Une valeur absolue de 1 indique une relation linéaire parfaite. Une corrélation proche de 0 indique l'absence de relation linéaire entre les variables.

Pour déterminer si la corrélation entre les techniques est significative, nous utiliserons un seuil de signification $\alpha = 0,05$ auquel nous comparerons notre valeur-p.

- Valeur de $p \leq \alpha$: la corrélation est statistiquement significative.
- Valeur de $p > \alpha$: la corrélation n'est pas statistiquement significative

CHAPITRE V

«RESULTATS»

CHAPITRE V : RESULTATS

V.1. Évaluation des performances analytiques :

V.1.1. souches de référence :

Le tableau suivant (XI) présente les résultats de l'étude des performances analytiques pour l'antibiotique testés par les deux techniques : dilution en milieu gélosé et la micro dilution en milieu liquide, en fonction des limites d'acceptabilité pour les souches de références.

Les CMI obtenues ont été lues par 4 opérateurs différents pour chaque souche testée.

Ce tableau (XI) montre une concordance des résultats pour l'antibiotique testé par rapport aux limites d'acceptabilité définies pour les matériaux de référence.

Tableau XI : Les résultats de vancomycine testé par rapport aux limites d'acceptabilité définies pour les matériaux de référence.

	Valeurs attendues(CMI)	CMI en µg/ml à24h
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	1-4	1
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Résistance naturelle	>8
<i>Enterococcus faecium</i>	>8µg/ml	>8

Ainsi les contrôles de qualité positive et négative ont pu être validés, ce qui revient à dire que les deux techniques entreprises ont été validées.

V.1.2. Résultats des valeurs de CMI obtenues pour les 30 souches de *Staphylococcus aureus* constituant notre échantillonnage :

V.1.2.1 : Résultats des valeurs de CMI obtenues par dilution en milieu gélosé : méthode de référence

Le tableau suivant(XII) présente les lectures des CMI obtenues (par 4 différents opérateurs) par la technique de dilution en milieu gélosé.

L'ensemble des souches constituant notre échantillonnage sont classées sensibles à la vancomycine par cette technique. Soit 100 % de l'effectif total.

Tableau XII : Valeurs de CMI en $\mu\text{g/ml}$ obtenues par dilution en milieu gélosé (lecture par 4 opérateurs)

Souches issues d'isolats cliniques (n = 30 essais)	CMI obtenue ($\mu\text{g/ml}$)			
	Opérateurs			
	01	02	03	04
Souche 1	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 2	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 3	0.5(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 4	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 5	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 6	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 7	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 8	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 9	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 10	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 11	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 12	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 13	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 14	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 15	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 16	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 17	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 18	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 19	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 20	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 21	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 22	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)

Souche 23	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 24	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 25	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 26	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 27	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 28	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 29	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 30	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)

La figure qui suit montre la répartition des CMI chez les *Staphylococcus aureus* obtenues par dilution en milieu gélosé

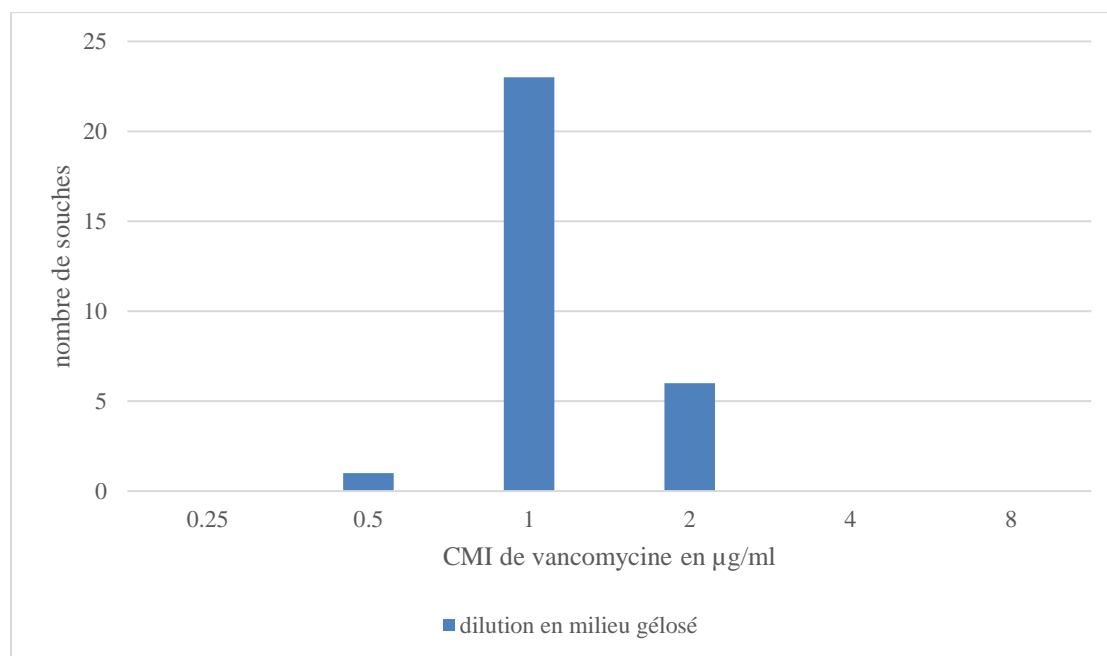


Figure 18 : La répartition des CMI chez les souches de *Staphylococcus aureus* obtenues par dilution en milieu gélosé.

On constate que les valeurs obtenues varient de 0.5 à 2 µg/ml et que la plupart des souches ont une CMI égale à 01µg/ml.

V.1.2.2. Résultats des valeurs de CMI obtenues par micro dilution en milieu liquide :

Le tableau suivant (XIII) présente les lectures des CMI par différents opérateurs par la technique de micro dilution en milieu liquide.

L'ensemble des souches testées sont classées sensibles à la vancomycine par cette technique. Soit 100% de l'effectif total.

Tableau XIII : lectures de CMI en µg/ml obtenues par micro dilution en milieu liquide (lecture de 4 opérateurs).

Souches issues d'isolats cliniques (n = 30 essais)	CMI obtenue (µg/ml)			
	Operateurs			
	01	02	03	04
Souche 1	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 2	≤0.25(s)	≤0.25(s)	≤0.25(s)	≤0.25(s)
Souche 3	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 4	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)
Souche 5	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)
Souche 6	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 7	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 8	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)
Souche 9	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 10	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 11	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)
Souche 12	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)
Souche 13	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)
Souche 14	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 15	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 16	≤0.25(s)	≤0.25(s)	≤0.25(s)	≤0.25(s)
Souche 17	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)

Souche 18	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 19	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 20	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)
Souche 21	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 22	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)	0.5(s)
Souche 23	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 24	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 25	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 26	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 27	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 28	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)
Souche 29	2(s)	2(s)	2(s)	2(s)
Souche 30	1(s)	1(s)	1(s)	1(s)

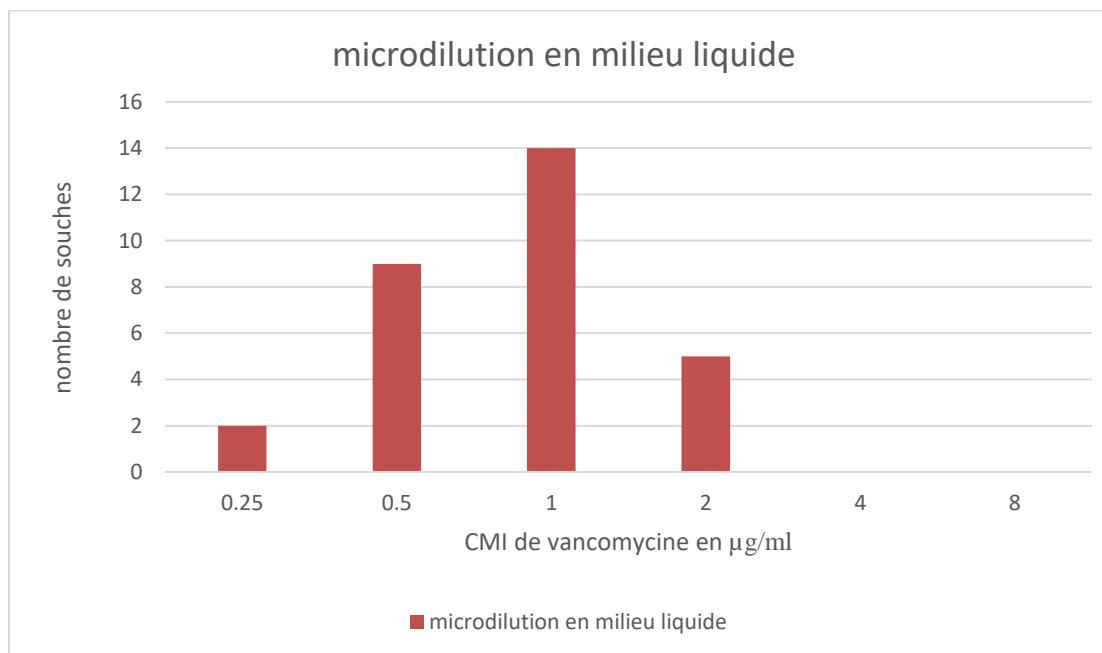


Figure 19 : La répartition des CMI chez les souches de *Staphylococcus aureus* obtenues par microdilution en milieu liquide.

On constate que les valeurs obtenues varient de 0.25 à 2 µg/ml et que la plupart des souches ont une CMI égale à 01µg/ml

V.2. Bilan de l'évaluation des performances :

L'évaluation des performances analytiques de technique de micro dilution en milieu liquide et la technique de dilution en milieu gélosé, réalisée avec les souches tests , montre des résultats en conformité avec les limites définies.

L'analyse des résultats inter-opérateur est présentée dans le tableau (XIII). Elle est basée sur les recommandations du Quamic 2013 qui classe les discordances observées en trois catégories distinctes :

- Discordance mineure : souche résistante ou sensible répondue à tort intermédiaire ou souche intermédiaire répondue à tort résistante ou sensible.
- Discordance majeure : résultat trouvé résistant (R) alors que la souche est en réalité sensible (S). Ce type de résultat correspond à une perte de chance pour le patient puisque le résultat conduit à ne pas proposer un traitement efficace dont il aurait pu bénéficier, mais n'expose pas le patient à un échec thérapeutique.
- Discordance très majeure : résultat trouvé sensible (S) alors que la souche est en réalité résistante (R). Ce type d'erreur expose le patient à un risque important d'échec thérapeutique.

Pour l'antibiotique testé (souches ATCC de référence et isolats cliniques), la variation des résultats entre les différents opérateurs, évaluée selon la classification ci-dessus, est exprimée par le pourcentage de concordance inter-opérateur.

Par exemple, un pourcentage de 100 % de concordance correspond à aucune variation ou discordance significative.

Le tableau suivant (XIV) ne montre aucune discordance significative.

Tableau XIV : La concordance des lectures visuelles inter-opérateurs.

Antibiotique	Nombres de souches testées	Pourcentage de concordance inter-opérateur (%)	Nombre de résultats de CMI présentant une variation significative			total
			Discordance mineure	Discordance majeure	Discordance très majeure	
Vancomycine	30	100	0	0	0	0

V.3. Comparaison des techniques :

V.3.1. Résultats des valeurs de CMI obtenues par les deux techniques :

Le tableau suivant (XV) présente les lectures des CMI par les 02 techniques de dilution.

Tableau XIV : Valeurs de CMI en µg/ml obtenues par les deux techniques.

Souches issues d'isolats cliniques (n = 30 essais)	CMI obtenue (µg/ml)	
	Méthode de référence	Micro dilution en milieu liquide
Souche 1	1	2
Souche 2	1	≤0.25
Souche 3	1	1
Souche 4	1	0.5
Souche 5	1	0.5
Souche 6	1	1
Souche 7	1	1
Souche 8	1	0.5

Souche 9	1	1
Souche 10	1	1
Souche 11	0.5	0.5
Souche 12	1	0.5
Souche 13	1	0.5
Souche 14	1	1
Souche 15	1	1
Souche 16	1	≤0.25
Souche 17	1	0.5
Souche 18	1	1
Souche 19	2	1
Souche 20	1	0.5
Souche 21	1	1
Souche 22	1	1
Souche 23	2	2
Souche 24	2	1
Souche 25	2	1
Souche 26	1	2
Souche 27	2	2
Souche 28	1	1
Souche 29	2	2
Souche 30	1	1

Selon la méthode de référence : les 30 souches sont catégorisées S avec des CMI allant de 0.5 à >2µg/ml, et aucune souche résistante. (Figure18 ; et tableau XI).

Selon la méthode de micro dilution en milieu liquide : les30 souches sont catégorisées S avec des CMI allant de 0.25 à >2 µg/ml, et aucune souche résistante. (Figure19 ; et tableau XII).

Tableau XVI : Classification des souches de *staphylococcus aureus* selon leurs CMI obtenues par les deux techniques (originale).

CMI Vancomycine chez <i>S.aureus</i>		Technique de référence	
		S	R
Dilution en milieu liquide	S	30	0
	R	0	0

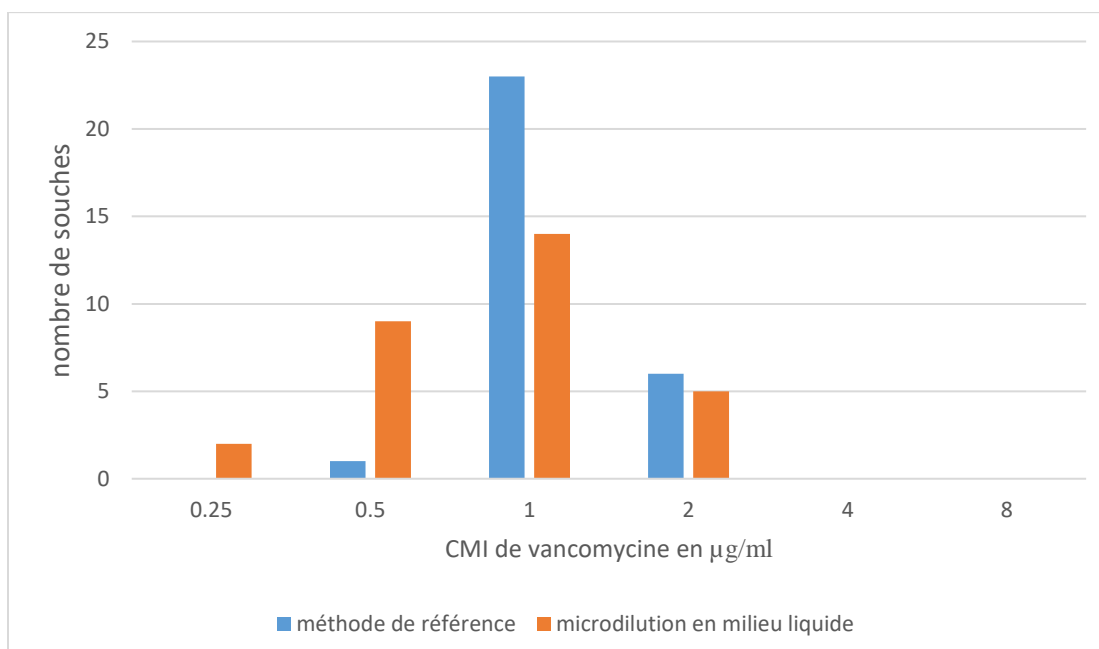


Figure20 : Comparaison entre les CMI obtenues par les deux techniques étudiées.

Suite à l'analyse des résultats, il apparaît que 50% des mesures sont identiques entre les deux méthodes testées. 02 valeurs de CMI mesurée par la méthode de dilution en milieu liquide présentent un écart de deux dilutions par rapport à la méthode de référence.

A noter également l'absence de faux résistant et de faux sensible. Ainsi, l'AC est de 100% et l'AE est de 93% ; l'EM et l'ETM sont de 0,0% (Tableau suivant XVII).

Tableau XVII : Comparaison de la micro dilution vis-à-vis référence : Conformité à la norme ISO 20776 chez les souches de Staphylococcus aureus.

	Résultats calculés	Résultats attendus
AC	100%	$\geq 90\%$
AE	93%	$\geq 90\%$
EM	00%	$\leq 3\%$
ETM	00%	$\leq 3\%$

V.3.2. Résultats du test de Pearson r :

Il existe une corrélation positive (coefficient de corrélation $r = 0.525$) **significative** ($p = 0.03 < 0,05$) entre les CMI obtenues par méthode de micro dilution en milieu liquide par rapport à celles obtenues par la méthode de référence.

CHAPITRE VI
«DISCUSSION»

CHAPITRE VI : Discussion

Pour répondre à nos objectifs et mener à bien cette étude, nous avons suivi une méthodologie précise et nous avons testé la sensibilité des 30 souches bactériennes *S.aureus* vis-à-vis d'un antibiotique à usage hospitalier exclusif qui est la vancomycine ;et ce en utilisant 2 techniques l'une étant la technique en milieu solide et l'autre est la technique de micro dilution en milieu liquide.

La vancomycine est un antibiotique glycopeptidique, qui exerce son activité antibactérienne par l'inhibition de la biosynthèse des polymères glycopeptidiques pendant la deuxième phase de la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries en cours de division [68,69].

Leur structure tridimensionnelle en forme de poche joue un rôle important dans leur mécanisme d'action vis-à-vis d'une cible située à la surface de la bactérie ; la poche vient recouvrir le D-Ala-D-Ala terminal du pentapeptide –disaccharide théoriquement prêt à être incorporé dans le peptidoglycane en cours d'élongation [70].

En raison de leur volume, les glycopeptides vont ainsi empêcher l'action des glycosyltransférases et des transpeptidases et bloquer l'élongation du peptidoglycane [70].

Les valeurs des CMI obtenues par les deux techniques nous ont permis de catégoriser l'ensemble des souches testées comme sensibles à la vancomycine, ce qui est en accord avec l'épidémiologie locale et les données au niveau national.

En effet selon le rapport national d'évaluation de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (de janvier à décembre 2018) : aucune souche non sensible à la vancomycine n'a été isolées de l'ensemble des laboratoires faisant partie du réseau algérien de la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques [71].

Selon les résultats de notre étude : pour un certain nombre de souches la CMI est revenue égale à 2µg/ml, sachant que les souches ayant une CMI de la vancomycine égale à 2 mg/L sont catégorisées comme sensibles mais peuvent parfois être responsables d'échecs cliniques, celui-ci peut être lié aux caractéristiques pharmacodynamiques peu favorables de la vancomycine [72].

Pour ce qui est des avantages et inconvénients des deux techniques utilisées, nos constatations sont les suivantes :

La méthode de CMI sur milieu gélosé montre une clarté des résultats car nous pouvons observer directement la croissance microbienne sous forme de colonies,

En plus, cette technique inclue la possibilité de tester simultanément la susceptibilité d'un certain nombre de souches dans une même boîte.

Cependant elle présente une limite à savoir la nécessité de quantités élevées d'antibiotique.

De son côté, la méthode de micro dilution en milieu liquide offre l'avantage de ne nécessiter que de faibles quantités d'antibiotique, ce qui réduit le coût ;

Ceci dit cette la lecture des CMI se faisant à l'œil nu (on considère une culture positive si on observe un trouble ou un dépôt au fond de la cupule) ce qui en fait des résultats opérateur dépendant, en effet la lecture des résultats est un peu difficile surtout pour les débutants puisque les puits sont petits et l'observation de la croissance microbienne est délicate.

Toutefois, des systèmes automatisés sont disponibles pour pouvoir palier à ce problème.

Pour amoindrir les causes d'erreur possible lors de la réalisation ou l'interprétation des résultats des deux techniques ,Une analyse exhaustive des risques a été faite par l'identification de ceux-ci et la mise en place de facteurs de maîtrise pertinents en termes d'efficience et de réalisation a été proposée ; tout ceci est résumé dans les deux tableaux ci-après,

Le tableau (XVIII) présente l'évaluation et la maitrise des facteurs d'incertitude lors de la réalisation des tests,

Tableau XVIII : Evaluation et maitrise des facteurs d'incertitude lors de la réalisation des tests (originale).

Facteur d'incertitude de mesure	Identification des risques	Facteurs à maîtriser	Facteurs de maîtrise
Milieu	Difficulté d'interprétation : croissance bactérienne hétérogène	Contamination des milieux de cultures	Bio nettoyage des paillasse Surveillance des conditions environnementales (température, hygrométrie) Contrôle de surface Application des précautions standards Audit des bonnes pratiques professionnelles
	Non-respect des conditions de sécurité du personnel du laboratoire	Contamination de l'opérateur	
Méthode	Difficulté d'interprétation : croissance bactérienne hétérogène	Choix des milieux de culture	Respect de la documentation interne, conforme au référentiel CLSI 2014 Résultats des contrôles qualité internes et externes Audits de la paillasse de bactériologie
		Ensemencement des milieux de cultures manuel	
	Croissance bactérienne inconstante : allongement des délais de rendu des résultats, augmentation du risque patient	Préparation de l'inoculum : turbidité (Mc Farland)	
	Rendu de résultats non-valides : mauvaise diffusion du gradient d'antibiotique	Dépôt de la suspension bactérienne (disposition sur le milieu de culture, élimination des poches d'air)	
	Allongement des délais de rendu des résultats, augmentation du risque patient	Choix des antibiotiques à tester	
Matériel	Altération des milieux de culture	Conservation des géloses	Conditions de conservations conformes aux recommandations du fournisseur Test de fertilité (par les souches de contrôle) Métrologie des enceintes de stockage des réactifs : cartographie et système de surveillance des températures
	Rendu de résultats erronés : faux-négatif	Condition de conservation des réactifs (température, humidité)	
	Mauvais isolement des souches pathogènes	Contamination des milieux ensemencés par le matériel d'ensemencement (pipette)	

	Rendu de résultats erronés : turbidité de la suspension bactérienne non-conforme pour la réalisation des analyses	Le densitomètre	Étalonnage mensuel de l'appareil selon les recommandations du fournisseur Résultats des contrôles qualité
Main d'œuvre	Rendu de résultats erronés : ensemencement non-conforme, dépôt de la suspension bactérienne incorrect	Compétence du personnel	Formation (interne et externe)-habilitation- évaluation Respect des fiches d'instruction et notices du fournisseur Résultats de contrôles qualité Audits de la paillasse de bactériologie
Matière	Difficulté et/ou erreur dans l'interprétation des CMI	Contamination des milieux de culture lors de l'ensemencement à J +1 Qualité de l'isolement/ensemencement	Respect de la documentation interne, conforme au référentiel CLSI Audits de la paillasse de bactériologie Compétence du personnel d'ensemencement
	Délais de rendu de résultats non-respectés, augmentation des coûts d'analyse	L'opérateur doit pouvoir disposer après culture de matériel biologique en quantité suffisante pour poursuivre les analyses	Respect des températures et des durées d'incubation définies dans la documentation interne du laboratoire et en conformité avec le CLSI

Le tableau qui suit (XIX) présente l'évaluation et maîtrise des facteurs d'incertitude lors de la lecture et de l'interprétation des CMI :

Tableau XIX : Evaluation et maitrise des facteurs d'incertitude (lecture des CMI et interprétation) (originale).

Facteur d'incertitude de mesure	Identification des risques	Facteurs à maîtriser	Facteurs de maîtrise
Méthode	Détermination de la CMI erronée	Lecture de la CMI par examen visuel	Fiche d'instruction conforme au référentiel CLSI Résultats aux contrôles qualité Audits de la paillasse de bactériologie
Matériel	Altération et/ou perte de stabilité des réactifs utilisés : rendu de résultats non-valides, détermination de la CMI erronée	Condition de conservation des réactifs (MHL, poudre d'ATB..) : température, luminosité	Respect des recommandations de conservation des réactifs Métrologie des réfrigérateurs : cartographie et système de surveillance des températures
	Croissance inhibée des cultures microbiennes : faux-négatif dans le rendu des résultats	Conditions d'incubation : température	Métrologie des incubateurs : cartographie et système de surveillance des températures
Main d'œuvre	Détermination de la CMI erronée	Compétence du personnel	Formation (interne et externe) qualification-habilitation-évaluation Respect des fiches d'instruction et notice fournisseur (notamment Résultats aux contrôles qualité Harmonisation des lectures inter-opérateurs Audits de la paillasse de bactériologie
Matière	Difficulté et/ou erreur dans l'interprétation et l'identification des isolats cliniques	Contamination des milieux de culture lors de l'ensemencement à J +1 Qualité de l'isolement/ensemencement	Respect de la documentation interne, conforme au référentiel CLSI Audits de la paillasse de bactériologie Compétence du personnel d'ensemencement
	Délais de rendu des résultats non-respects, augmentation des coûts d'analyse	L'opérateur doit pouvoir disposer après culture de matériel biologique en quantité suffisante pour poursuivre les analyses	Respect des températures et des durées d'incubation définies dans la documentation interne du laboratoire et en conformité avec le CLSI

D'après la comparaison entre les résultats des concentrations minimales inhibitrices des deux méthodes on constate que 50% des valeurs des CMI sont identiques, et celles déterminées par la méthode de la micro dilution en milieu liquide étaient dans la majorité des cas inférieures à ceux

obtenues par la méthode de dilution en milieu solide. Ce qui indique que la méthode de microplaque est plus sensible que la méthode de dilution en gélose c'est –à-dire qu'une fausse sensibilité n'est pas à exclure, pour infirmer ou confirmer cette constatation lourde en conséquence, une reconduite de l'expérience sur un plus large échantillonnage est plus qu'obligatoire, par ailleurs il serait intéressant de réévaluer ces valeurs de CMI par une autre technique tel que la technique E test ou les méthodes automatisées.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est une étape cruciale de tout examen cytot bactériologique, en effet dresser le profil de sensibilité aux antibiotiques est important pour l'établissement d'une antibiothérapie efficace,

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) occupe une place très importante dans la détermination du schéma thérapeutique, car la CMI apporte les données nécessaires quand l'antibiogramme se montre peu contributif et aide dans le choix de la molécule antibiotique à utiliser préférentiellement et à l'ajustement des posologies.

La détermination de la CMI de la vancomycine chez les souches de l'espèce *Staphylococcus aureus* est obligatoire, l'antibiogramme ne permet pas de mettre en évidence des variations de CMI ou des mécanismes de résistance hétérogène ; cette détermination se fait selon les recommandations nationales en vigueur par technique de dilution en milieu gélosé, néanmoins la technique de micro dilution en milieu liquide qui offre plusieurs avantages semble intéressante ;

Même si l'analyse des résultats de la présente étude est favorable au remplacement de la technique de dilution en milieu gélosé par la micro dilution en milieu liquide, ceci n'est envisageable qu'après la reconduite de cette même expérience sur un échantillonnage plus large.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Matthieu Boissona, Olivier Mimosz.** Les nouveaux antibiotiques : qu'apportent-ils aux cliniciens ? *Le Praticien en anesthésie réanimation* ; 22 : 289—295 (2018)
- [2] **Z. Baba Ahmed-KaziTani a, G. Arlet b.** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie ; *Pathologie Biologie* ; 62 :169–178 (2014)
- [3] **Dr CRISTINA BELLINI a ; Pr Nicolas Troilletb.** Résistance aux antibiotiques : état des lieux en Europe et en Suisse et impact pour le praticien. *Rev Med Suisse* ; 12 : 1699-702 (2016)
- [4] **CAROLE EMILE** Biologiste, rédactrice scientifique. Conseil thérapeutique en bactériologie : apport et impact des CMI. n° 507 ; mardi 29 avril 2014
- [5] **Dr Roger GENET.** le cahier de la recherche N° 10 : résistance et méthodes alternatives . agence national de sécurité sanitaire, alimentation, environnement et travail (octobre 2017)
- [6] **Garnotel, Hélène Astier, Corinne Surcouf, Jérémy Bayette, Aurélie Bouige, Alexandre Dieudonné, et al .**Sensibilité aux antibiotiques d'Escherichia coli isolé des infections urinaires communautaires : étude AFORCOPI-BIO, *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* • N° 496 • (NOVEMBRE 2017)
- [7] **Yann Dumont, Anne-Laure Michon, Chrislène Laurens, Lucas Bonzon, Sylvain Godreuil, Hélène Jean-Pierre, et al.** Rôle du laboratoire de biologie médicale dans le diagnostic microbiologique des bactéries anaérobies *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* • N° 505 • (SEPTEMBRE-OCTOBRE 2018)
- [8] **Warren lowman .**Minimum inhibitory concentration-guided antimicrobial therapy – the Achilles heel in the antimicrobial stewardship agenda , Vol. 108, No. 9 :108(9):710-712.(September 2018)
- [9] **Rahal K, Benslimani A, Talimaamar. H, Missoum.M.F, Kechich.K, Bounar.S,et al .** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 7ème édition (2014)

- [10] **O. Barraud, N. Hidri, M.-C. Ploy, V. Cattoir** .chapitre 38 : Instauration et surveillance d'un traitement antibiotique.in **François Denis,Marie Cécile Ploy ,Christian Martin ,Vincent Cattoir**. bactériologie médicale techniques usuelles 3 eme édition. 531-539 (2016)
- [11] **Huet C**. Principes de mesure de la sensibilité aux antibiotiques .CMI/CMB. EMC Elsevier Masson SAS Paris. Encyclopédie Médico-Biologique, 90-60-0270, (2007)
- [12] **Stéphane Fontanay, Marie-Eugénie Mougnot, Raphaël E. Duval** .Evaluation of antibacterial properties of essential oils and/or of their major components .Hegel Vol. 5 N° 2 (2015)
- [13] **Karan Syal, Manni Mo, Hui Yu, Rafael Iriya, Wenwen Jing, Sui Guodong, et al** .Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests ; 7(7): 1795-1805. (2017)
- [14] **Pham Hong Nhung , Tohru Miyoshi-Akiyama , Doan Mai Phuong , Kayo Shimada ,Nguyen Quoc Anh , Nguyen Gia Binh et al** .Evaluation of the Etest method for detecting colistin susceptibility of multidrug-resistant Gram-negative isolates in Vietnam. J Infect Chemother (2015) 1e3
- [15] **Jose E. Garcia-Sanchez, Enrique Garcia-Sanchez y Maria Inmaculada Garcia-Garcia**.Estudios de sensibilidad en bacterias anaerobias. Enferm Infecc Microbiol Clin .(2014)
- [16] CA SFM/EUCAST société française de microbiologie, recommandations 2019 v.2.0 mai.
- [17] CA SFM/EUCAST société française de microbiologie, recommandations 2019 v .1.0 .
- [18] **warren lowman** .Minimum inhibitory concentration-guided antimicrobial therapy – the Achilles heel in the antimicrobial stewardship agenda , Vol. 108, No. 9 :108(9):710-712.(September 2018)
- [19] **ISO 20776-1:2019** Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des

performances des dispositifs pour antibiogrammes — Partie 1: Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses.juin2019

- [20] **François Jehl, EterneTwizeyimanaa** .Sensibilité des bactéries aux antibiotiques : les CMI sont complémentaires de l'antibiogramme Revue Francophone des Laboratoires - Novembre 2015 - n°476
- [21] **S.Leroux^{abc}W.Zhao^{abe}V.Biran^{bd}E.Jacqz-Aigrain**. Posologie des antibiotiques chez le nouveau-né : variations des pratiques et comment y remédier Archives de Pédiatrie Volume 23, Issue 9, September 2016, Pages 966-973
- [22] **CAROLE EMILE**, L'antibiogramme et ses pièges, OptionBio | octobre 2018 | n° 587-588.
- [23] **M.-L. Joly-Guillou** .Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie E-test method for guiding antibiotic therapy Réanimation 15 ; 237–240 (2006).
- [24] **Bas T. Franssens, Ad C. Fluit ,Rob J. Rentenaar** . Reproducibility between two readout methods of a commercial broth microdilution assay for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with Cystic Fibrosis, Infectious Diseases 51:1, 50-55, (2019)
- [25] http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf
- [26] **Kris Vernelen** .Micro/Séro/Para, rapport global Définitif 2017/2 (04/10/2017) FORM 43/124/F V8)
- [27] **M.L.Joly-Guillou**.le point sur les staphylocoques dorés de moindre sensibilité aux glycopeptides en réanimation. Réanimation 13(3) ,185-189,2004.
- [28] **Claire.Daurel, Roland Leclerq**. l'antibiogramme de *staphylococcus aureus*. revue francophone des laboratoire 2008(407),81-90,2008.

- [29] **E. Forestier, V.Rémy, M.Mohsen-Zadeh, O.Losen,B.Jauhlaç,D.Christmann,Y.Hansmann.***Bactériémies à Staphylococcus aureus* résistant à la métiline :aspect épidémiologique et thérapeutiques récent, la revue de médecine interne 28(2007)746-755.
- [30] **Francois jehl ;Moniquechomarat ,Jacques tankovic.** In :Alaingérard .dir :l'antibiogramme à la prescription. 3 éme édition en 2012.
- [31] Methods for Dilution Antimicrobial susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition M07-A10 ,(CLSI january 2015) ,chapter 3 : susceptibility Testing Proccs .
- [32] **S.Puttaswamy ,SK.Gupta , H.Regunath ,LP.smith ,S.Sengupta,A** comprehensive Review of the Present and future Antibiotic Susceptibility Testing (AST) systems ,Arch Clin Microbiol vol: 9 ,1989-8436 ,2018.
- [33] **M.Elshikh ,S.Ahmed ,S.Funston , P.Dunlop ,Mark McGraw ,R.Marchant ,I.M.Banatal.**Resazurin –based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants , Biotechnology Letters 38(6) ,1015 -1019(2016).
- [34] **jean –Paul Klein, tomas Grosy ;** vérification des performances d'une méthode : l'étude de la sensibilité aux antibiotiques par technique E-test ® ; revue Francophone des laboratoires vol 2014, April2014, p47-58.
- [35] . **Kahlmeter G, TurnidgeJ,** Techniques phénotypiques .In :**P.courvalin.Leclercq,R,dir.** Antibiogramme , 3éme édition. Édition eska, 2012.
- [36] **R. Bonnet, P. Plésiat ,F.Robin,**méthode de détermination de la sensibilité aux antibiotiques .dir. Rémic 5éme édition 2015.

- [37] **F.jehl ,A.Grillo**, L'antibiogramme :diamètre ou CMI ? , journal de l'anti-infection décembre 2015 ,vol :17 ,p :125-139.
- [38] **Jorgensen, J.H.andM.J.Ferraro**(2009). Antimicrobial susceptibility testing :a review of general principales and contemporary practices .clin Infect Dis,49(11) ,p:1749-1755:
- [39] <https://docplayer.fr/110730820-Republique-algerienne-democratique-et-populaire-ministère-de-l-enseignement-superieur-et-de-la-recherche-scientifique.html> (site internet).
- [40] **claudine Quentin-Noury**, vol, Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie,Revue francophone des laboratoires :2016 ;May 2016 ,P :49-59.
- [41] www.biocentric.com/umic(site internet)
- [42] **M.Avellanthomas** , détermination de la sensibilité au linézolide des staphylocoques et enterocoques : comparaison de méthodes .faculté de pharmacie Aix Marseille université(2019).
- [43] [http:// tools.thermofisher.com /sfs/brochureSensititre-brochure-FR pdf](http://tools.thermofisher.com/sfs/brochureSensititre-brochure-FR.pdf).(site internet).
- [44] <https://sknlaos.com>(site internet)
- [45] **Mlle CAUCHIE Anne-Gaëlle**2018 : Résistance des entérobactéries à la colistine : évaluation d'une méthode de CMI en microdilution, prévalence des souches *mcr-1* et description de la population ; Université de Lille.
- [46] **Nadarajah,linda R Post,Liu ;Steven A Miller ,Daniel F Sahn ,Geo F Brooks ,al.**,detection of vancomycin-intermediate staphylococcus aureus with the Updated Trek –Sensititre System and the Microscan system :comparison with Results. American journal of clinicalpathology (2012) vol : 133(6), p : 844-848.

- [47] **Béatrie Demoré, Mrion Grare, Raphaél Duval**, généralités sur les antibiotiques par voie systémique et principes d'utilisation ; chapitre 42, p : 755-789. dir : pharmacie clinique et thérapeutique (2018) .
- [48] **Safina Hafeez, Jaber Aslanzadeh**, biochemical Profile-based Microbial Identification systems. In : **yi-Wei Tang, Charles W. Stratton**. dir : Advanced techniques in diagnostic Microbiology, vol 1 : technique, third édition (2018).
- [49] **L. Pattet, H. Goossens, M. Ieven**, validation of the MicroScan-96 for the species identification and methicillin susceptibility testing of clinical significant coagulase-negative staphylococci, Eur J clin Microbiol Infect Dis (2012) 31.p : 747-751.
- [50] **Gaëtan Bourgoïn**, étude de la sensibilité aux antibiotiques par méthode semi-automatisée en milieu liquide de 293 souches consécutives de Escherichia coli isolées d'ECBU au CHU de Rouen : apport de méthode E-test pour l'évaluation de la sensibilité à l'association amoxicilline-acide clavulanique, juin 2017.
- [51] www.sante.dz/aarn/espace_antibiogramme/etest.html (site internet)
- [52] www.biomérieux_usa.com/vitek-2 (site internet)
- [53] **C. Martin, M.C. Ploy**, automatisation en bactériologie, journal des anti-infection (2014) 16, p : 122-130.
- [54] **Philippe Riegel, Dominique de Briel, Olivier Dauwalder**, Automatisation de l'identification bactérienne, Revue francophone des laboratoires vol 2016, p : 39-47, 2016
- [55] **Hélène Poupet**. L'automatisation en bactériologie : c'est maintenant ? Bull. Acad. vét. France -2016-tome 169. <http://www.academie-veterinaire-defrance.org>.

- [56] **Christelle Larcher.** détermination de la CMI(2016).
- [57] **F. Jehl *, F. Schramm, E. Talagrand-Reboul, A. Grillon.** Staphylococcus aureus méticillino- résistants : concentrations critiques et pharmacodynamie de la vancomycine et des nouvelles céphalosporines) Journal des Anti-infectieux
- [58] **Jacques BUXERAUD ; Sébastien FAURE :** Les antibiotiques divers
Supplément formation au n° 558 • 3e trimestre 2016.
- [59] **R. Garraffo , T. Lavrut :** Signification clinique des corrélations pharmacocinétique/pharmacodynamie des antibiotiques chez les patients de réanimation.Réanimation 14 (2005) 264–275.
- [60] **Amélie Pichot, Olivier Mimoz, William Couet.**Pharmacologie des antibiotiques en reanimation.Pharmacologie des agents anti-infectieux 2013
- [61] IDEEX laboratoires. Guide pour l'interprétation de la concentration minimale inhibitrice (CMI).avril2018.
- [62] **David Lalonde Séguin, MSc.** catégorie ou cmi est là la question ! la revue des technologistes médicaux du québec. mai 2019
- [63] CLSI M100 –S29 ,2019
- [64] **Van Bambeke, F., &Tulkens, P. M.** Pharmacodynamie des antibiotiques dans le LCR : principes et conséquences (facteurs prédictifs d'efficacité). Médecine et Maladies Infectieuses2009, 39(7-8), 483–492.
- [65] **V. de Lastours.** Faut-il proposer une adaptation posologique lors d'une antibiothérapie ? La Revue de Médecine Interne Volume 39, Issue 3, March 2018, Pages 171-177
- [66] **A. Lautrettea , F. Coudoré b, B. Souweine .**Principes de l'adaptation posologique des antibiotiques lors d'une épuration extrarénale en réanimation. réanimation 2010 .19, 339-346.
- [67] **B. Aloya, V. Launay-Vacher a, A. Bleibtreub, P. Bortolotti c, E. Faurec, A. Filali c, R. Gauzit d, M. Gilbert e, P. Lesprif , R. Mahieug, V. Meyssonier**

h, M. Ogielskai , J. Romaruj , D. Salmonk, S. Alfandaril , A.

Lemaigen ,al.Antibiotics and chronickidneydisease: Dose adjustment update for infectiousdiseaseclinical practice .Médecine et Maladies Infectieuses une2020 .Volume 50, Issue 4, Pages 323-331

[68] **Will A. McGuinness, Natalia Malachowa, and Frank R. DeLeo.** Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus* YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE 90 (2017), pp.269-281

[69] **Jessica BaleiroOkado, Juliana SpostoAvaca-Crusca, Alexandre Lima Oliveira, Andrei NicoliGebielucaDabul, Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo,al.**Daptomycin and vancomycinheteroresistance revealed among CC5-SCC*mecII* MRSA clone and *in vitro* evaluation of treatment alternatives 2018

[70] **N.Bourgeois-Nicolas, C.Guillet-Caruba,**Glycopeptides ,EMC maladies infectieuses, volume9,n°2.mai2012.

[71] Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.19 ème Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2018), édition2019.

[72] **Roland Leclercq, Vincent Cattoir .** Bacteries a Gram positif et glycopeptides revue francophone des laboratoires - septembre-octobre 2012 - N° 445.

[73] **Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, et al.** Antibiotic choice may not explain poorer outcome in patient with *Staphylococcus aureus* bacteremia and highvancomycin minimum inhibitory concentration. J Inf Dis 2011 ; 204:340—7.

[74] **Jacques BUXERAUD ; Sébastien.F.**Les antibiotiques divers Supplément formation au n° 558 • 3e trimestre 2016

[75] Comité provincial de gérance des antimicrobiens des régions de la santé du Nouveau-Brunswick : lignes directrices posologie et surveillance de la vancomycine ; septembre 2018.

[76] **C. Daurel, R. Leclercq.** Faut-il abandonner la vancomycine ?2010

[77] agence national de sécurité du médicament et des produits de santé :The saurus

[78] **M.Talbert ,G.willoquet ,R.Gervais** .guide pharmaco 11 édition 2015.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : Les modes opératoires détaillés de la détermination de la concentration minimale inhibitrice.

ANNEXE II : Les concentrations critiques.

ANNEXE III : Les techniques de détermination de la CMI pour certaines bactéries selon les recommandations du CLSI2014.

ANNEXE IV : Caractéristiques d'intérêt clinique de la vancomycine.

ANNEXE V : Les milieux de culture.

ANNEXE I : Les modes opératoires détaillés de la détermination de la concentration minimale inhibitrice.

1 / La détermination de la CMI de la vancomycine par la technique de dilution en milieu solide :

a- Milieu de culture :

- Milieu Mueller-Hinton en gélose liquéfié par ébullition puis maintenu à la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.

b- Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique :

_ Peser 51,20 mg de poudre titrée d'antibiotique. Diluer dans le volume de solvant approprié pour obtenir une concentration stock de 5120 µg/ml (solution-mère).

_ Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 (de demi en demi), dans le solvant approprié, jusqu'à la concentration finale de 1,25 µg/ml.

_ Repartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Ne pas changer de pipette.

_ Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires.

La dilution obtenue (1/10ème) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées. (voir tableau XVIII).

_ Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.

_ Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

c- Préparation de l'inoculum bactérien :

_ Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 MF, ce qui correspond à 1-2.10⁸ CFU/ml en moyenne. Utiliser l'eau physiologique à 0,9% pour la préparation de la suspension directe à partir d'une culture jeune.

_ Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose, 10⁴ CFU/ml par spots de 5 à 8 mm

_ Si on utilise un applicateur de 2 µl par spot, diluer l'inoculum au 1/10ème en eau physiologique.

_ Si on utilise un applicateur de 0,1 à 0,2 µl par spot, ne pas diluer l'inoculum de départ (0,5 MF).

d- Dépôt des spots bactériens :

- _ Déposer les spots dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum.
- _ Marquer la boîte de dilution d'antibiotique pour localiser et identifier chaque spot.
- _ Appliquer chaque spot sur la gélose, en utilisant un appareil de Stères, une anse calibrée ou une pipette automatique à cône stérile.
- _ Commencer par la boîte témoin, puis déposer les spots sur les différentes boîtes en allant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Terminer en appliquant les spots sur une 2ème boîte témoin.
- _ Etaler une goutte de chaque souche testée, sur une gélose non sélective et incuber une nuit (détection des cultures mixtes, obtention d'une culture jeune).

e- Incubation :

- _ Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn).
- _ Renverser les boîtes et incuber à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose 16 à 24 h.

. Lecture des CMI :

- _ Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive
- _ Noter la CMI.
- _ Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film
- _ Si on note plus de 2 colonies persistantes ou si l'on constate une réapparition de la culture au-delà de la CMI, vérifier la pureté de l'inoculum et refaire le test.
- _ Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- _ Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I. [9].

Tableau XX : Schéma pour la préparation des dilutions d'antibiotique en milieu solide [9]

étape	Concentration (µg/ml)	Antibiotique (ml)	Diluant (ml)	Concentration intermédiaire	Concentration finale dans la gélose (µg/ml)
Solution mère	5120	/	/	5120	512
1	5120	2	2	2560	256
2	5120	1	3	1280	128
3	5120	1	7	640	64
4	640	2	2	320	32
5	640	1	3	160	16
6	640	1	7	80	8
7	80	2	2	40	4
8	80	1	3	20	2
9	80	1	7	10	1
10	10	2	2	5	0.5
11	10	1	3	2.5	0.25
12	10	1	7	1.25	0.125

2 /La détermination de la CMI de vancomycine par la technique E. test :

a- Milieu :

- _ Milieu MH coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm
- _ Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

b- Préparation de l'inoculum :

- _ A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- _ Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- _ Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5MFou a une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. Ajuster le plus précisément possible.

L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

c- Ensemencement :

- _ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- _ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- _ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- _ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- _ Ensemencer dans les mêmes conditions la souche de référence.

d- Dépôt de la bandelette E-test :

- _ Prélever la bandelette à l'aide de pinces bactériologiques préalablement flambées au bec Bunsen ; le contact avec les pinces doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E ; à noter que l'utilisation d'un applicateur (à commander auprès du fournisseur de bandelettes Etes) est recommandée.
- _ Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique teste puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées. Eviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.

- _ A noter que l'on ne peut déposer qu'une ou deux bandelettes E-test au maximum par boîte de 90 mm de diamètre (risque de chevauchement des ellipses avec plus d'une bandelette).
- _ Laisser la boîte couvercle en haut pendant 15 mn au plus.
- _ Incuber la boîte dans les conditions requises à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 18_24 h.

La lecture :

- _ La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée.
- _ Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse et la bandelette E-test.
- _ Contrôler la qualité du test par la CMI de la souche de référence.
- _ Lire ensuite la CMI.
- _ Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondante.
- _ Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I [9].

**3 /Détermination de la CMI de vancomycine par la méthode de dilution en milieu liquide :
macro méthode(en tubes) :**

a- Gamme des dilutions d'antibiotique :

- _ Dissoudre 10,24 mg de poudre d'antibiotique dans le volume adéquat du solvant correspondant, pour obtenir une solution mère à concentration 1024 µg/ml.
- _ Repartir dans des tubes stériles le milieu MHLAC, à raison de 0,25 ml par tube.
- _ Réaliser à partir de la solution mère, les dilutions semi-logarithmiques de raison 2 ; on obtient des concentrations intermédiaires allant de 512 µg/ml à 0,063 µg/ml. (Voir tableau XXI)

b- Préparation de l'inoculum bactérien :

- _ Préparer à partir d'une culture pure, une suspension, dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile (ou de bouillon MHLAC), d'une densité équivalente à 0,5 MF (108 CFU/ml)
- _ Diluer la suspension d'opacité 0,5 MF au 1/10ème pour distribuer un inoculum de 5.105 CFU/ml de germe dans chaque tube.
- _ Vérifier par ailleurs, la pureté de chaque souche en effectuant l'isolement sur gélose non sélective.

c- Distribution de l'inoculum bactérien :

- _ Elle doit se faire dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum

_ Inoculer les tubes d'antibiotiques avec 50 µl de suspension bactérienne par tube.

_ Pour chaque série, réaliser un témoin sans antibiotique.

d- Distribution du milieu MHLAC :

_ Repartir dans les tubes 0.70ml de MHLAC ; la concentration d'antibiotique obtenue va ainsi de 128 µg/ml à 0.016 µg/ml. (Voir tableau XXI)

e- Incubation :

_ boucher les tubes.

_ Incuber pendant 35±2°C en aérobiose 16 à 24 h

. Lecture :

_ La CMI de chaque antibiotique correspond au 1er tube clair.

_ Comparer la CMI lue, aux CMI critiques correspondantes à chaque antibiotique testé (tables de lecture).

_ Classer les bactéries dans la catégorie R, I ou S selon le résultat [9].

Tableau XXI : Schéma pour la préparation des dilutions d'antibiotique milieu liquide (macro méthode)

[9]

Numéro de tube	Volume de la solution d'antibiotique à rajouter	Concentration intermédiaire (ug/ml)	Volume MH	Inoculum	Concentration finale /tube (volume final : 1ml/tube)
1	0.25 ml de la solution à 1024ug/ml	512	0.7 ml	50ul/tube	128ug/ml
2	0.25 ml de la solution à 512ug/ml	256	0.7ml	50ul/tube	64ug/ml
3	0.25ml de la solution à 256ug/ml	128	0.7ml	50ul/tube	32ug/ml
4	0.25 ml de la	64	0.7 ml	50 ul/tube	16ug/ml

**DETERMINATION DE LA CMI D'UN
ANTIBIOTIQUE : METHODES IN INTERETS**

ANNEXE I

	solution à 128ug/ml				
5	0.25 ml de la solution à 64ug/ml	32	0.7 ml	50 ul/tube	8ug/ml
6	0.25 ml de la solution à 32ug/ml	16	0.7 ml	50 ul /tube	4 ug/ml
7	0.25 ml de la solution à 16 ug/ml	8	0.7 ml	50 ul /tube	2 ug /ml
8	0.25 ml de la solution à 8 ug/ml	4	0.7 ml	50 ul/tube	1ug /ml
9	0.25 ml de la solution à 4 ug/ml	2	0.7 ml	50 ul/tube	0.5ug /ml
10	0.25 ml de la solution à 2ug/ml	1	0.7 ml	50 ul/tube	0.25 ug /ml
11	0.25 ml de la solution à 1 ug/ml	0.5	0.7 ml	50 ul/tube	0.125ug /ml
12	0.25 ml de la solution à 0.5 ug/ml	0.25	0.7 ml	50 ul/tube	0.063ug/ml
13	0.25 ml de la solution à 0.25ug/ml	0.125	0.7 ml	50 ul/tube	0.032ug/ml

14	0.25 ml de la solution à 0.125ug/ml	0.063	0.7 ml	50 ul/tube	0.016ug/ml
Témoin	0.25 ml d'eau physiologique		0.7 ml	50 ul/tube	

4/La détermination de la cmi de la vancomycine par la Méthode de dilution en milieu liquide : micro méthode(en plaque) :

a- Gamme des dilutions d'antibiotique :

- _ Dissoudre 10,24 mg de poudre titrée d'antibiotique dans le volume adéquat du solvant correspondant, pour obtenir une solution mère a 1024 µg/ml.
- _ Repartir dans des plaques stériles le milieu MHLAC, a raison de 25 µl par cupule en microplaque à fond rond.
- _ Réaliser à partir de la solution mère, les dilutions semi-logarithmiques de raison 2 ; on obtient des concentrations intermédiaires allant de 512 µg/ml a 0,063 µg/ml.

b- Préparation de l'inoculum bactérien :

- _ Préparer à partir d'une culture pure, une suspension, dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile(ou de bouillon MHLAC), d'une densité équivalente à 0,5 MF (108 CFU/ml)
- _ Diluer la suspension d'opacité 0,5 MF au 1/10eme pour distribuer un inoculum de 5.105CFU/ml de germe dans chaque cupule.
- _ Vérifier par ailleurs, la pureté de chaque souche en en effectuant l'isolement sur gélose non sélective.

c- Distribution de l'inoculum bactérien :

- _ Elle doit se faire dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum
- _ Inoculer les cupules de la microplaque avec 5 µl par cupule.
- _ Pour chaque série, réaliser un témoin sans antibiotique.

d- Distribution du milieu MHLAC :

- _ Repartir dans les cupules 70µl de MHLAC ; la concentration d'antibiotique obtenue va ainsi de 128 µg/ml à 0.016 µg/ml.(voir tableau XXII)

e- Incubation :

- _ Recouvrir la plaque d'un couvercle en plastique.
- _ Incuber pendant $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose 16 à 24 h.

f. Lecture :

- _ La CMI de chaque antibiotique correspond au la 1ere cupule CLAIRE.
- _ Comparer la CMI lue, aux CMI critiques correspondantes à chaque antibiotique testé (tables de lecture)
- _ Classer les bactéries dans la catégorie R, I ou S selon le résultat [22].

Tableau XXII : Schéma pour la préparation des dilutions d'antibiotique en milieu liquide (micro méthode) [9]

Numéro de la cupule	Volume de la solution d'antibiotique à rajouter	Concentration intermédiaire (ug/ml)	Volume MH	inoculum	Concentration finale/cupule (volume final : 100ul/cupule)
1	25 ul de la solution à 1024 ug/ml	512	70 ul	5ul/cupule	128 ug/ml
2	25 ul de la solution à 512 ug/ml	256	70 ul	5 ul/cupule	64 ug/ml
3	25 ul de la solution à 256 ug/ml	128	70 ul	5 ul/cupule	32 ug/ml
4	25 ul de la solution à 128 ug/ml	64	70 ul	5 ul/cupule	16 ug/ml
5	25 ul de la solution à 64 ug/ml	32	70 ul	5 ul/cupule	8 ug/ml
6	25 ul de ma solution à 32 ug/ml	16	70 ul	5 ul/cupule	4 ug/ml
7	25 ul de la solution à 16 ug/ml	8	70 ul	5 ul/cupule	2 ug/ml

**DETERMINATION DE LA CMI D'UN
ANTIBIOTIQUE : METHODES IN INTERETS**

ANNEXE I

8	25 ul de la solution à 8 ug/ml	4	70 ul	5 ul/cupule	1 ug/ml
9	25 ul de la solution à 4 ug/ml	2	70 ul	5 ul/cupule	0.5 ug/ml
10	25 ul de la solution à 2 ug/ml	1	70 ul	5 ul/cupule	0.25 ug/ml
11	25 ul de la solution à 1 ug/ml	0.5	70 ul	5 ul/cupule	0.125 ug/ml
12	25 ul de la solution à 0.5 ug/ml	0.25	70 ul	5 ul/cupule	0.063 ug/ml
13	25 ul de la solution à 0.25ug/ml	0.125	70 ul	5 ul/cupule	0.032 ug/ml
14	25 ul de la solution à 0.125ug/ml	0.063	70 ul	5 ul /cupule	0.016 ug/ml
Témoin	25 ul d'eau physiologique		70 ul	5 ul/cupule	

ANNEX II : Les concentrations critiques

Les concentrations épidémiologiques :

Elles sont établies sur la base des répartitions des CMI d'un antibiotique vis-à-vis d'un grand nombre de souches sauvages n'ayant aucun mécanisme de résistance acquise. Plus la population servant à les définir est grande, plus elles sont précises. On comprend mieux l'importance de colliger toutes les données nationales en une seule banque de données européenne pour définir des break-point communs. C'est là un des rôles de l'EUCAST qui définit les break-point épidémiologiques sur plusieurs milliers, voire dizaine de milliers de souches [37].

Données bactériologiques/épidémiologiques :

Elles interviennent à travers les « cut-off » épidémiologiques. Ceux-ci sont directement concernés dans le sens où la concentration critique inférieure d'un antibiotique (séparant S de I, ou de R) ne doit jamais être inférieure à la concentration critique épidémiologique. Plus elle en est éloignée et plus il sera facile de discriminer les souches résistantes des souches sensibles.

Dans certains cas, elle peut être identique au cut-off épidémiologique, augmentant la difficulté à séparer les phénotypes sauvages des phénotypes de résistance. Le cut-off épidémiologique du céfotaxime est établi 0,25 mg/L alors que le break-point clinique est fixé à 1 mg/L. à l'inverse, le cut-off épidémiologique et le break-point clinique de la vancomycine vis-à-vis de *S. aureus* se superposent à 2 mg/L rendant la catégorisation clinique délicate [37].

Données pharmacocinétiques (PK/PD) et pharmacodynamique : Les données récentes de pharmacocinétique/pharmacodynamie (PK/PD) des antibiotiques ont considérablement influencé la révision des concentrations critiques cliniques des anciennes molécules et l'établissement de celles des molécules nouvellement disponibles.

Les études de corrélation doses/effets menées *in vitro*, ou sur des modèles d'infections expérimentales chez l'animal permettent de définir des paramètres prédictifs de l'efficacité bactério-clinique, à la condition qu'ils atteignent certaines valeurs *a minima* (*prérequis*) en deçà desquelles une activité sub-optimale, voire une inactivité sont à craindre. Ces paramètres sont le temps pendant lequel les concentrations sériques sont supérieures à la CMI ($T > CMI$), le rapport

de l'aire sous la courbe des concentrations sériques par la CMI (ASC/CMI), les rapports pic (Cmax) ou résiduelle Cres) sériques par la CMI (Cmax/CMI ou Cres/CMI)).

Les modalités de bactéricide dynamique des antibiotiques définissent le (les) paramètre(s) qui sera prédictif de l'efficacité bactérioclinique si il atteint à minima une valeur seuil, un prérequis, établi par les différents modèles d'infection expérimentale.

Dans la *figure 22*, il apparaît que l'effet maximal apparaît pour une valeur seuil optimale du rapport ASC (aire sous la courbe)/CMI. L'ASC/CMI optimale pourrait même être qualifiée de valeur minimale optimale puisqu'en effet, toute valeur supérieure sera également active, mais pas plus active.

Il ressort donc que :

a. pour une posologie donnée, la part « pharmacocinétique » (ASC, Cmax, Cres) de ces paramètres étant fixée par cette posologie et éventuellement les voies d'administration utilisées, la CMI devient le facteur limitant dans l'obtention du prérequis *a minima*. Il est ainsi aisé d'établir la CMI maximale que peut prendre l'antibiotique tout en assurant le prérequis pour ASC/CMI : celle-ci devient le break-point clinique, la concentration critique PK/PD (pharmacokinetics-pharmacodynamics des Anglo-Saxons) de la posologie utilisée ;

b. en augmentant la posologie, on augmente l'ASC (ASC1 x 2).

De ce fait, la CMI1 peut également augmenter (CMI1 x 2) tout en permettant de garder une valeur fixe du rapport ASC/CMI. CMI1 x 2 devient donc le break-point PK/PD de la nouvelle posologie. Le break-point PK/PD est bien fonction de la posologie (tout en restant bien sûr dans les valeurs de posologies tolérées).

L'évidence, les concentrations critiques sont étroitement liées à la dose unitaire et aux rythmes d'administration qui déterminent les ASC, les C_{MAX}, les Cres..., donc aux différents schémas posologiques utilisables pour un antibiotique.

Or ceux-ci divergent parfois d'un pays à l'autre, d'où des différences possibles dans les concentrations critiques d'une même molécule entre différents pays. Ceci souligne l'importance d'une harmonisation européenne. à cet égard, le CA SFM (Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie) ainsi que l'EUCAST ont été amenés à établir, pour un antibiotique donné, des concentrations critiques variables en fonction des posologies d'un même antibiotique [37].

Elles peuvent également varier en fonction de la posologie ET de la nature de la bactérie.

Les études cliniques mettant en relation les échecs/succès thérapeutiques avec les CMI des antibiotiques vis-à-vis des bactéries visées sont peu nombreuses.

Les données restent fragmentaires, donc divergentes, et invalident parfois les déterminations basées sur la microbiologie et la PK/PD. Certains travaux cependant soulignent le rôle capital des études cliniques dans l'« affinement » ou la confirmation des concentrations critiques préalablement établies sur la base des autres critères.

Plusieurs exemples sont, à ce titre, significatifs. Ainsi, pour les céphalosporines de troisième génération et l'aztréonam vis-à-vis des entérobactéries productrices de BLSE, l'étude de Paterson *et Al a* permis de proposer un break-point clinique de 2 mg/L, tous les échecs de cette étude ayant concerné des souches caractérisées par des CMI supérieures à 2 mg/L, confirmant la pertinence des break-points établis à 1-2 mg/L par le CA-SFM/EUCAST.

Un travail similaire conclut à un break-point de 1 mg/L pour le céfépime dans le traitement de bactériémies à E-BLSE (alors que le CLSI proposait au même moment une concentration critique à 8 mg/L).

Enfin, un travail récent de Patel *et al.* sur les carbapénèmes dans les infections à entérobactéries a confirmé la pertinence d'abaisser leur break-point à 1 mg/L. Pour ce qui concerne les bactéries à Gram positif, la concentration critique de la vancomycine a été abaissée à 2 mg/L en France suite aux travaux de Ryback montrant que des CMI > 2 mg/L imposaient des concentrations résiduelles efficaces trop élevées en termes de tolérance [37].

Le site infectieux

Pour certains antibiotiques, les concentrations critiques peuvent varier en fonction du site infectieux, selon qu'il s'agisse d'un site anatomique difficile à atteindre pour l'antibiotique (liquide céphalo-rachidien par exemple), ou, à l'inverse, d'un émonctoire où les concentrations seront élevées (urines). Ainsi, l'association amoxicilline-acide clavulanique bénéficie-t-elle de 2 concentrations critiques uniques, l'une pour les infections générales, systémiques (8 mg/L), l'autre propre aux infections urinaires non compliquées (32 mg/L).

En effet les concentrations urinaires élevées d'amoxicilline et d'acide clavulanique justifient cette distinction [37].

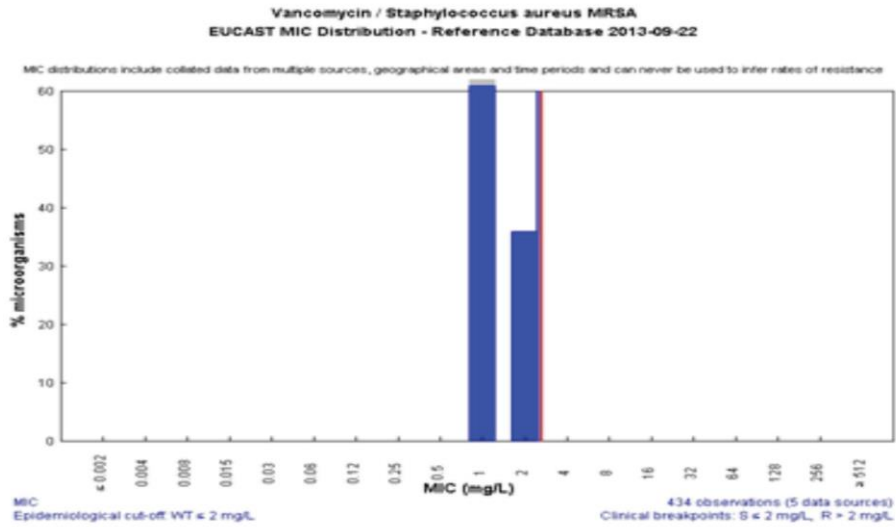
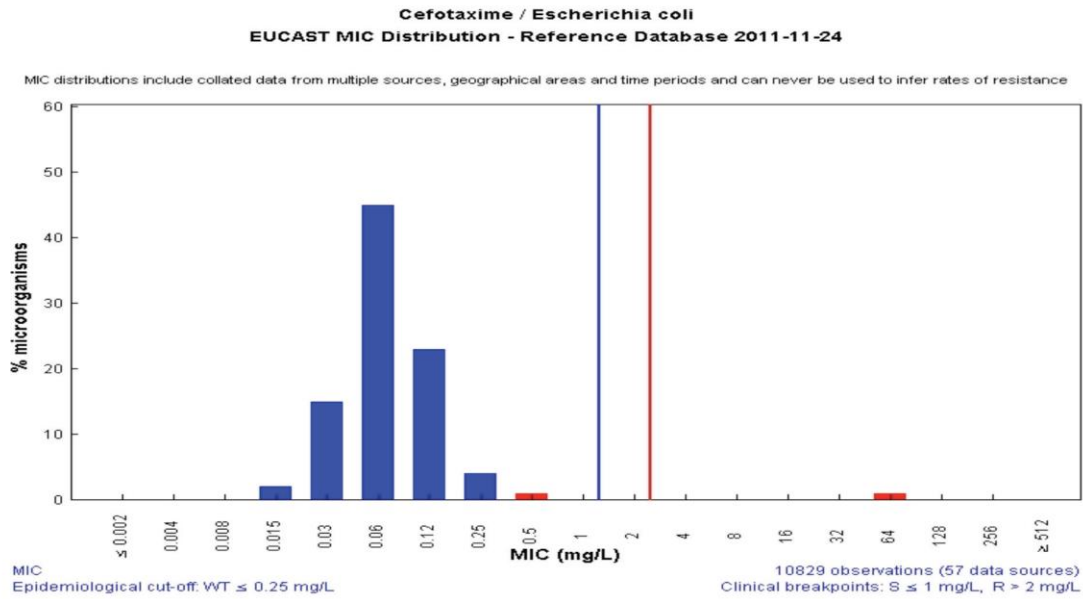


Figure21 : Les concentrations critiques épidémiologiques [37].

Concentrations critiques PK/PD: importance de la posologie

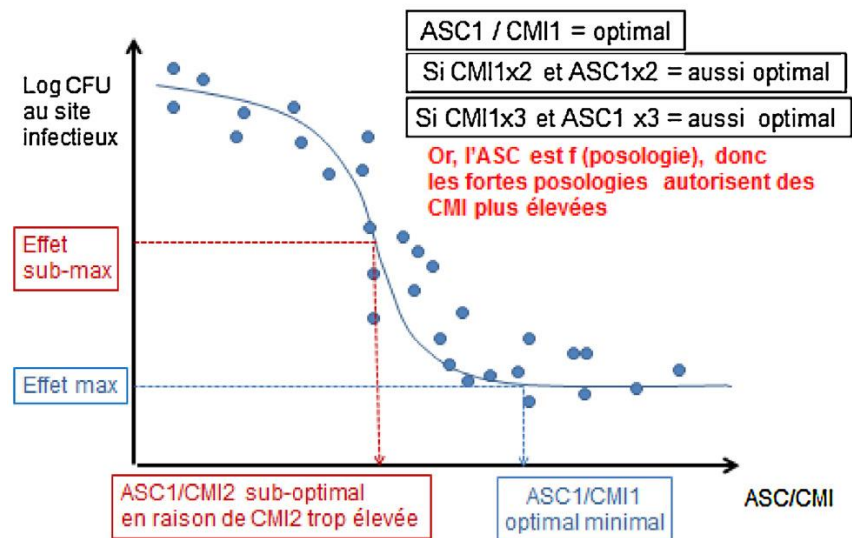


Figure 22 : Les concentrations critiques PK/PD [37].

ANNEX III : Les techniques de détermination de la CMI pour certaines bactéries selon les recommandations du CLSI2014.

Tableau XXIII : Techniques de détermination de la CMI pour certaines bactéries selon les recommandations du CLSI 2014[9].

Microorganismes	Antibiotiques	Techniques Recommandée	Milieu	Inoculum	Conditions d'incubation	Souches de références
<i>Neisseria meningitidis</i>	PEN G AMX	Dilution en gélose	MHBAC+5% sang de mouton frais défibriné	1MF Eau physiologique ou PBS de 1µl	20-24H 35°C ±2°C sous 5% CO2+humidité	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619
		Dilution en milieu liquide	MHLAC +2-5% sang de cheval hémolysé	1MF Eau physiologique ou PBS		
<i>Streptococcus spp</i> .Groupe viridans	PEN G AMP	Dilution en gélose	MH +5% sang de mouton frais	0.5 MF Eau physiologique	20-24H 35°C ± 2°C 5% CO2	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PEN G AMX (sauf LCR) CTX IPM	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2.5-5% (V/V) sang de cheval défibriné	0.5 MF Eau physiologique	20-24H 35°C ± 2°C Air ambiant	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Listeria monocytogenes</i>	PEN G AMP TRIM+ suls	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2.5-5% sang de cheval hémolysé	0.5 MF Eau physiologique	20-24H 35°C ± 2°C	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Bordetella pertusis</i>	ERY JOS AZT CLA	Dilution en gélose	Gélose MH +10% sang de cheval frais	0.5MF en MHLAC dilué au 1/10 ^{ème} Spots de 10 ⁴ UFC/ml (1 à 2µl)	48-72H 35°C	<i>B.pertussis</i> ATCC 9797 <i>S.aureus</i> ATCC 29213
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	ERY CIP	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2-5% sang de cheval	0.5 MF Eau physiologique	36+37°C 48H ou 42°C 24H	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC

**DERMINATION DE LA CMI DUN
ANTIBIOTIQUE : METHODES IN INTERETS**

ANNEXE II

	TCY DCY		hémolysé		microaérophile	33560
--	------------	--	----------	--	----------------	-------

MHLAC : Muller-Hinton liquide ajusté en cations

MHBAC : Muller-Hinton base ajusté
en cations

Tableau XXIV : Tests de sensibilité aux antibiotiques pour les bactéries à croissance difficile ou rarement incriminées

Microorganismes	Techniques De CMI	Milieu	Inoculum	Conditions d'incubation	Techniques d'antibiogramme	Souches de références
<i>Abiotrophia granulatella</i>	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2.5% sang de cheval lysé + 0.01% pyridoxal	0.5MF	20-24H 35°C ±2°C Atm. ordinaire	NA	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619
HACCEK	Dilution en milieu liquide	MHLAC +sang de cheval lysé	0.5 MF	20-24H 35°C sous 5%CO2	NA	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619 <i>E.coli</i> ATCC35218 (AMC)
<i>Bacillus</i> autre que <i>B.anthraxis</i>	Dilution en milieu liquide	MHLAC	0.5 MF	16-20H 35°C Atm. ordinaire	NA	<i>s.aureus</i> ATCC 29213
Corynebacterium	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2.5-5% sang de cheval hémolysé	0.5 MF	24 -48H 35°C Atm. ordinaire	NA	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619 <i>E.coli</i> ATCC 25922
<i>Erysipelothrix rhusiopathie</i>	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2.5-5% sang de cheval lysé (v/v)	0.5MF	24 -48H 35°C Atm. ordinaire	NA	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Lactobacillus</i>	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2.5-5% sang de cheval lysé (v/v)	0.5 MF	24 - 48H 35°C sous 5%CO2	NA	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619 <i>E.coli</i> ATCC 25922 (GEN)
<i>Leuconostoc spp</i>	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2.5-5% sang de cheval lysé (v/v)	0.5 MF	20-24H 35°C Atm. ordinaire	NA	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619 <i>E.coli</i> ATCC 25922 (GEN)
<i>Moraxella catarrhais</i>	Dilution en milieu liquide	MHLAC	0.5MF	20-24H 35°C Atm. ordinaire	MH solide (non supplémenté) 35°C 5% de CO2	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619 <i>E.coli</i> ATCC 25922 (AMC)

**DETERMINATION DE LA CMI D'UN
ANTIBIOTIQUE : METHODES IN INTERETS**

ANNEXE III

					20-24H	
<i>Pedococcus spp</i>	Dilution en milieu liquide	MHLAC +2.5-5% sang de cheval lysé (v/v)	0.5MF	20-24H 35°C Atm. Ordinaire	NA	<i>s.pneumoniae</i> ATCC 49619 <i>E.coli</i> ATCC 25922 (GEN)

HACCEK : *Haemophilus* , *Actinobacillus* , *Capnocytophaga* , *Cardiobacterium* , *Eikenella* et *Kingella*

NA : technique d'antibiogramme non applicable

Tableau XXV : Tests de sensibilité aux antibiotiques pour les bactéries à croissance difficile ou rarement incriminées (suite)[9].

Microorganismes	Technique de CMI	Milieu	Inoculum	Conditions D'incubation	Téchnique d'antibiogramme	Contrôle qualité
<i>Helicobacter pylori</i>	Dilution en milieu solide (spots de 3µ)	MHA +5% sang de mouton vieilli (>2semaines)	2MF Suspension en 0.09 % à partir d'une culture sur FSF de 72H	35°C 3jours Atm.microaérobie (10% CO2 ,5% O2 , 85% N2)	NA	<i>H.pylori</i> ATCC 43504
<i>Aeromonas spp</i> <i>P. shigelloides</i>	Dilution en milieu liquide	CAMHB	0.5MF	35°C 16 20H Air ambiant	MH solide (non supplémenté) 35°C 16-18H Air ambiant	<i>E.coli</i> ATCC 25922 <i>E.coli</i> ATCC (AMC)
<i>Campylobacter jejuni / coli</i>	Dilution en milieu liquide	CAMHB + 2.5-5% sang de cheval lysé	0.5MF	36°C à 37°C 48h Ou 42°C 24h Atm.microaérobie (10%CO2 , 5% O2 , 85% N2)	MH solide + 5% sang de mouton 36-37°C 48h ou 42°C 24h 10%CO2 5% O2 85% N2 Microanaérobie	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 (36 à 37°C 48hou42°C 24h) Microdilution <i>S. aureus</i> ATCC 25923 MH agar 35-37°C 16-18h Air ambiant
<i>Pasteurella spp</i>	Dilution en milieu liquide	CAMHB + 2.5-5% sang de cheval lysé	0.5MF	35°C 18-24h Air ambiant	MH solide + 5% sang de mouton /35°C ; air ambiant ; 16-18h	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 <i>E.coli</i> ATCC 35285(AMP)
Anaérobies strictes	Dilution en milieu liquide	Bouillon Brucella +	10 ⁸ CFU/spot	36°C 46 à 48h	NA	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285

**DETERMINATION DE LA CMI D'UN
ANTIBIOTIQUE : METHODES IN INTERETS**

ANNEXE III

	(pour le groupe <i>B.fragilis</i>)	hémine (5µg/ml) + Vit k1 (1µg/ml)+ sang de cheval lysé (5% v/v)		En anaérobiose		<i>B.thetaiotaomicron</i> ATCC 28741 Les deux souches doivent être testées
	Dilution en gélose	Bouillon Brucella + hémine (5µg/ml) + Vit K(1µg/ml)+sang de cheval lysé (5% v/v)	10 ⁵ CFU/spot	36°C 42 à 48 h En anaérobiose		CI .difficile ATCC 700057 Eub.lentum ATCC 43055 Tester deux parmi les 4 souches tous les 30 isolats

Tableau XXVI : Techniques de détermination de la CMI des antibiotiques pour les bactéries considérées dangereuses [9].

Microorganismes	Technique recommandée	Milieu	Inoculum	Conditions d'incubation	Contrôle de qualité
<i>Bacillus anthracis</i>	CMI par dilution en milieu liquide	CAMHB	0.5 MF dans du CAMHB	35°C±2°C 16 à 20h Air ambiant	<i>E.coli</i> ATCC 25922 <i>S.aureus</i> ATCC 29213
<i>Yersinia pestis</i>	CMI par dilution en milieu liquide	CAMHB	0.5 MF dans du CAMHB	35°C±2°C 24 à 48 h Air ambiant	<i>E.coli</i> ATCC 25922
<i>Brucella spp</i>	CMI par dilution en milieu liquide	Bouillon Brucella non supplémenté pH ajusté à 7.1 ±0.1	0.5 MF dans du CAMHB	35°C±2°C 48h Air ambiant	<i>E.coli</i> ATCC 25922 <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Burkholderia mallei</i>	CMI par dilution en milieu liquide	CAMHB	0.5 MF dans du CAMHB	35°C±2°C 16 à 20h Air ambiant	<i>E.coli</i> ATCC 25922 <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	CMI par dilution en milieu liquide	CAMHB	0.5 MF dans du CAMHB	35°C±2°C 16 à 20h Air ambiant	<i>E.coli</i> ATCC 25922 <i>E.coli</i> ATCC 35218(AMC) <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Francisella tularensis</i>	CMI par dilution en milieu liquide	CAMHB + 2% supplément de croissance défini	0.5 MF dans du CAMHB à partir d'une culture sur gélose chocolat	35°C±2°C 48h	<i>E.coli</i> ATCC 25922 <i>S.aureus</i> ATCC 29213 <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853

ANNEXEIV : Caractéristiques d'intérêt clinique de la vancomycine.

Résistance aux glycopeptides :

le site de fixation normal des glycopeptides est le D-Ala-D-Ala terminal du précurseur du peptidoglycane .chez les entérocoques naturellement résistants à la vancomycine (*E.gallinarum* et *E.casseliflavus*) ce D-Ala-D-Ala est remplacé par le D-Ala –D-Ser ,dipeptide ayant moins d'affinité pour la vancomycine ,mais une affinité normale pour la teicoplanine [68 ;69].

De nombreux types de résistance acquise ont été décrits chez les entérocoques, les plus fréquents étant VanA et VanB . d'autres bactéries à Gram positif sont aussi naturellement résistantes aux glycopeptides : nombreuses espèces de lactobacilles, cocci à Gram positif des genres *Pediococcus* et *Leuconostoc* .

Ces bactéries produisent naturellement un précurseur de peptidoglycane terminé par un dipeptide D-Ala-D-Lac, sans affinité pour les peptidoglycane. le transfert à *S.aureus* de l'opéron de résistance entérocoquique VanA a été rapporté de façon ponctuelle aux USA (pas de cas secondaire). En revanche, *S.aureus* peut présenter une résistance hétérogène, instable et de bas niveau aux glycopeptides, liée à des modifications de structure et d'épaisseur du peptidoglycane (souches anciennement appelées GISA pour (Glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus*)[70].

A/les souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA et hétéro GISA) :

Maintenant, on ne peut plus utiliser le terme GISA et hétéro GISA e raison de la suppression de la catégorie intermédiaire pour les glycopeptides.

Ce sont des souches qui ont accumulé des mutations conduisant à un certain degré de résistance aux glycopeptides .Elles ont des CMI supérieure à 2mg/l qui les font catégoriser comme résistantes .Les souches « hétéro GISA » sont catégorisées comme sensibles mais contiennent des sous –populations résistantes qui ne sont pas détectables par la simple détermination des CMI. Ces souches sont donc difficiles à mettre en évidence .De plus la signification clinique de cette hétéro-résistance est très débattue. Les souches « GISA » ont un peptidoglycane environ deux fois plus épais que les souches normales .La structure et le métabolisme de leur peptidoglycane sont perturbés.

Ces modifications diminueraient la fixation des glycopeptides sur leur cible .Il y aurait également une surproduction de précurseurs du peptidoglycane qui piègeraient l'antibiotique avant qu'in n'atteigne sa cible [70].

B/les souches VRSA (Vancomycin- Resistant *Staphylococcus aureus*) :

Ces souches sont résistantes à haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine .Elles sont heureusement exceptionnelles, encore jamais décrites en Europe (surtout rapportées aux USA) et dénuées pour l'instant de potentiel épidémique .Elles ont acquis l'opéron vanA de résistance aux glycopeptides d'origine entérococcique[30].

Les caractéristiques pharmacocinétiques :

✓ Les glycopeptides ne sont pas absorbés par voie orale. Par voie injectable.

La fixation protéique de la vancomycine est de l'ordre de 55 %.

✓ La vancomycine diffuse correctement dans le milieu interstitiel, le liquide de lavage broncho-alvéolaire. La diffusion dans le liquide céphalo-rachidien est très limitée mais augmente avec l'inflammation méningée. La vancomycine diffuse bien dans le cerveau. La diffusion est moyenne dans l'os.

✓ L'élimination de cet antibiotique se fait essentiellement par voie urinaire 80% et impose une adaptation de posologie en cas d'insuffisance rénale. Sa demi-vie d'élimination est de 6-8 h ce qui permet une administration 2 fois par jour chez les sujets à fonction rénale normale.

Pharmacodynamie, posologie et mode d'administration :

L'activité bactéricide des glycopeptides est lente, concentration- indépendante.

Le paramètre pharmacodynamique le mieux corrélé à l'efficacité des glycopeptides est le rapport aire sous la courbe (ASC)/CMI, correspondant à la quantité d'antibiotique bio disponible dans le sérum du patient rapporté à la CMI de la souche infectante.

Plusieurs études suggèrent que dans des infections respiratoires à MRSA, une réponse clinique et microbiologique à la vancomycine est plus souvent obtenue si l'ASC/CMI est supérieure à 350—420.

Cette valeur correspond à ce qui est obtenu avec 1 g deux fois par jour de vancomycine chez un sujet à fonction rénale normale pour une souche ayant une CMI à 1 mg/L.

Cependant, ce paramètre n'est pas d'usage simple dans la pratique clinique. Il est remplacé par la mesure des concentrations sériques résiduelles ou en plateau, selon que la vancomycine est administrée en injections discontinues ou en perfusion continue.

Les concentrations sériques optimales dépendent du type de l'infection, du germe en cause et de la CMI. Elles tiennent compte du pourcentage de liaison aux protéines et de la diffusion extravasculaire.

La prise en compte de ces divers paramètres, ainsi que les risques de néphrotoxicité ont abouti à recommander des concentrations sériques résiduelles de 15—20 mg/L pour la majorité des infections.

Des concentrations supérieures (20—30 mg/L) ont été proposées par des experts pour des infections dont le site d'accès est difficile (os, endocardie) ou quand la CMI est supérieure à 1 mg/L. Pour autant, et même si les contraintes de site et l'augmentation régulière des CMI de vancomycine chez les MRSA plaident pour des concentrations sériques élevées, il n'a pas été formellement démontré en clinique de relation entre concentration résiduelle et efficacité.

Des concentrations restant en permanence supérieures à 10 mg/L permettraient de réduire le risque d'émergence d'une souche de MRSA moins sensible (VISA) au contraire, la survenue d'une néphrotoxicité semble plus fréquente lorsque les concentrations résiduelles sont supérieures à 20 mg/L, voire supérieures à 15 mg/L. Le risque d'atteinte rénale est indiscutablement majoré par l'instabilité hémodynamique, l'utilisation de produits de contraste, l'administration concomitante de molécules néphrotoxiques.

Enfin, si la cible pharmacodynamique théorique est une ASC/CMI supérieure à 400, il faut considérer que cet objectif ne peut être raisonnablement atteint sans risque toxique lorsque la CMI de vancomycine atteint 2 mg/L.

De même, les infections endocarditiques ou pulmonaires ont pu être identifiées comme des facteurs de risque d'échec de la vancomycine indépendamment de la CMI. Dans les cas complexes, un traitement alternatif doit être proposé.

Le mode optimum d'administration de la vancomycine reste lui aussi largement débattu. La posologie classique et d'ailleurs utilisée dans la plupart des essais comparatifs, est chez le sujet à

fonction rénale normale de 15 mg/kg ou 1 g (administrée sur une heure au moins en raison du risque de libération d'histamine lié aux durées trop courtes) toutes les 12 heures. Compte tenu du caractère concentration-indépendant de la bactéricidie,

Le recours à la perfusion continue apparaît comme logique, bien qu'à ce jour aucune étude n'ait démontré une supériorité clinique ou microbiologique de ce mode d'administration. Toutefois, celui-ci est plus aisé en réanimation, permet d'atteindre plus rapidement les concentrations souhaitables avec une meilleure stabilité des concentrations. En conséquence, il aboutit à réduire le nombre de mesures de concentrations sériques.

Il nécessite une dose de charge, habituellement de 15 mg/kg en une heure ; dans le but d'atteindre plus rapidement une concentration suffisante, il a été proposé d'administrer une dose de charge de 25—30 mg/kg en 1 h 30—2 h 00 mais cette attitude n'est pas validée par des études cliniques.

La fréquence avec laquelle il convient de mesurer les concentrations sériques dépend de la gravité de l'infection, de la stabilité hémodynamique et des facteurs capables de modifier le volume de distribution ou la clairance rénale. Un certain nombre de populations particulières méritent des recommandations spécifiques, notamment les insuffisantes rénaux, patients chez lesquels les concentrations deviennent difficilement prévisibles, exposant au risque de surdosage. En pratique, il convient d'administrer une première dose de 15 mg/kg puis de procéder à des mesures quotidiennes ou toutes les 48 heures de la concentration sérique en ré-administrant lorsque celle-ci devient inférieure à 15—20 mg/L. Alors que l'hémodialyse modifie très peu les concentrations sériques, l'hémodiafiltration continue permet l'élimination d'une quantité substantielle de vancomycine, rendant absolument indispensable la mesure des concentrations.

À l'inverse, les risques de sous dosage sont plus fréquents chez les patients ayant un volume de distribution augmenté (grossesse, pathologies malignes, malades de réanimation ou neutropéniques). Chez les obèses, la posologie devrait être calculée sur le poids réel et non le poids idéal. En cas d'administration intraventriculaire cérébrale, la posologie recommandée est de 10 à 20 mg tous les jours ou toutes les 48 heures. Au cours des péritonites chez les patients en dialyse péritonéale, une dose de charge de 15—30 mg/kg est administrée par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, suivie d'une dose d'entretien intrapéritonéale de 20—30 mg/L lors de chaque échange [73].

VANCOMYCINE ET GROSSESSE

- La grossesse est associée à une accélération de la clairance rénale de vancomycine en raison de l'augmentation du flux sanguin rénal.
- La grossesse est associée à des volumes de distribution accrus.
- Les changements pharmacocinétiques deviennent plus prononcés aux derniers stades de la grossesse et reviennent progressivement aux valeurs observées avant la grossesse quelques jours après l'accouchement.
- La dose et les creux cibles sont les mêmes que pour les autres adultes.
- L'état d'équilibre sera susceptible d'être atteint plus tôt.
- Par rapport aux personnes non enceintes, il faudra peut-être administrer des doses plus élevées à des intervalles de dosage plus courts pour atteindre les taux cibles.
- Il faut recommander des creux de routine chez les patientes enceintes
- S'il est difficile d'atteindre des taux cibles, pensez à prélever les deux paramètres (creux et pic) afin d'établir des calculs pharmacocinétiques personnalisés [74].

Les effets indésirables :

Les limites de la vancomycine sont la tolérance et l'activité parfois insuffisante. La principale manifestation d'intolérance est le syndrome de l'homme rouge, réaction liée au relargage d'histamine lors d'injection trop rapide [75].

Des réactions anaphylactoïdes avec hypotension ont été décrites,. Localement des endoveinites et des phlébites peuvent être observées. Des réactions locales mineures peuvent également être observées (érythème, douleur).

Une ototoxicité et une néphrotoxicité (figure 23), en cas de doses élevées et lorsque la durée du traitement est longue, peuvent survenir, notamment chez les sujets recevant conjointement des aminosides.

Des acouphènes peuvent précéder la survenue de surdité. Une  levation de la créatinine peut être observée ; elle peut être à l'origine d'une insuffisance rénale définitive.

Des perturbations hématologiques (hyper osino philie, neutropénie, thrombopénie) ont été observées. Ces manifestations, parfois sévères, sont rapidement réversibles après l'arrêt du

traitement. Elles nécessitent la réalisation d'une numération-formule sanguine (FNS) avec dosage des plaquettes, durant le premier mois de traitement.

Divers autres effets indésirables ont été décrits comme des élévations transitoires des transaminases.

Enfin, des troubles digestifs (nausées, vomissements et diarrhées) peuvent être constatés sous traitement [73].

Les interactions médicamenteuses :

-Avec les médicaments ayant une toxicité rénale propre ce qui augmente le risque de néphrotoxicité. Si une telle association est nécessaire, il faut renforcer la surveillance biologique rénale.

Les médicaments concernés sont représentés notamment par les produits de contraste iodés, les aminosides, les organoplatines, le méthotrexate à fortes doses, certains antiviraux (tels les "ciclovirs" ou le foscarnet), la pentamidine, la ciclosporine ou le tacrolimus.

(aciclovir, acide amidotrizoïque, acide clodronique, acide ioxaglique, acide ioxitalamique, adefovir, amikacine, amphotericine b, carboplatine, ciclosporine, cisplatine, colistine, foscarnet, ganciclovir, gentamicine, ifosfamide, iobitridol, iodixanol, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopromide, ioversol, isepamicine, methotrexate, netilmicine, oxaliplatine, pentamidine, spectinomycine, streptomycine, streptozocine, tacrolimus, teicoplanine, tenofovir disoproxil, tobramycine, valaciclovir, valganciclovir).

-avec les médicaments ayant une ototoxicité augmente le risque d'atteinte cochléo-vestibulaire. Si une telle association est nécessaire, il convient de renforcer la surveillance de la fonction auditive.

Les médicaments concernés sont, notamment, les glycopeptides tels que vancomycine et teicoplanine, les aminosides, les organoplatines et les diurétiques de l'anse.(amikacine, bumetanide, carboplatine, cisplatine, furosemide, gentamicine, isepamicine, netilmicine, oxaliplatine, piretanide, streptomycine, teicoplanine, tobramycine) [76].

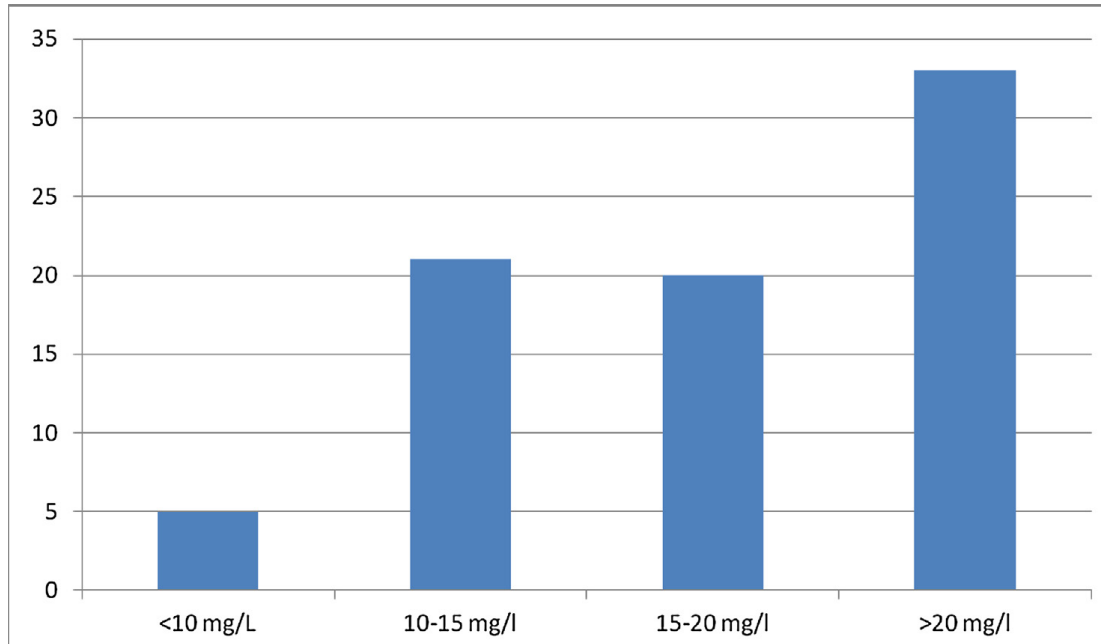






Figure23 : Relation entre risques néphrotoxiques et concentrations résiduelles de vancomycine [77].


Tableau XXVII : Les différentes formes galéniques de la vancomycine [78]

Dénomination commune internationale (DCI)	famille	Dénomination commerciale	Voie d'administration	Posologie (fonction normale)	adulte rénale	Nombre de prise par jour
Vancomycine	glycopeptides	vancocine	Perf.IV 	30mg/Kg /j		2-4
			voie orale pour infection digestives 	1à2 g/j		3-4

Annexe V : Les milieux de culture

Tableau XXVIII : Les milieux de culture.

Milieu	Composition	Utilisation
Gélose nutritive (GN) 	Extrait de viande 1g/L Extrait de levure2,5g/L Peptone.....5g/L Chlorure de sodium5g/L Agar.....15g/L pH=7	Milieu d'isolement des bactéries non exigeantes
Gélose Mueller –Hinton 	Infusion de bœuf.....300ml Peptone de caséine.....17,5g Amidon de maïs.....1,5g Agar17g pH=7,4	Milieu pour la réalisation de l'antibiogramme standard
Bouillon Mueller -Hinton ajusté en cation divalents(MHAC)	Infusion de viande2g Hydrolysate de caséine17,5g Amidon de maïs1,5g Ca+2..... 20-25mg /L Mg+2.....10 -12,5mg/l pH=7,3±0,1	

<p>Bouillon Mueller-Hinton(BMH)</p> 	<p>Extrait de viande2g Hydrolysate acide de caséine...17,5g Amidon soluble.....1,5g pH=7,3 ±0,1</p>	<p>Utilisé pour l'étude de la sensibilité des bactéries vis-à- vis des agents antimicrobiens</p>
--	--	--

RESUME

Le choix d'un antibiotique pour traiter une infection est guidé par l'étude de la sensibilité in vitro de la bactérie responsable de cette infection aux différents antibiotiques pour bien adapter l'antibiothérapie.

Différentes méthodes phénotypiques d'évaluation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques peuvent être mises en œuvre, parmi celles-ci on cite la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après une période d'incubation précise. Elle est déterminée soit en milieu liquide ou bien en milieu solide.

Notre étude porte sur une comparaison entre deux techniques, de mesure de la valeur de la CMI de la vancomycine chez les souches de l'espèce *Staphylococcus aureus*, à savoir : la technique de dilution en milieu liquide en micro méthode, réalisée par des microplaques à 96 puits contenant des concentrations croissantes en vancomycine par rapport à la technique de référence qui est la technique de dilution en milieu gélosé (adoptée au sein de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU Blida), par la préparation d'une gamme de dilution de l'antibiotique à étudier et de son incorporation dans des boîtes de pétri contenant le milieu Mueller Hinton (MH) solidifié.

Les constatations issues de l'analyse des résultats de cette étude préliminaire, réalisée entre le 1^{er} Janvier 2020 et le 10 Mars 2020, au niveau de l'unité sus citée, et portant sur un échantillonnage de trente souches isolées de différents prélèvements cliniques, nous a permis de mettre en évidence les avantages non négligeables de la technique de micro dilution en milieu liquide, du point de vue cout et aisance des manipulations et également gain de temps technicien.

Néanmoins nous ne pouvons envisager de l'adopter qu'après la reconduite de cette même étude sur un plus large échantillonnage.

Mots-clés : Concentration minimale inhibitrice, dilution en milieu gélosé, microdilution en milieu liquide, vancomycine, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The choice of an antibiotic to treat an infection is guided by studying the in vitro sensitivity of the bacteria responsible of this infection to different antibiotics in order to properly adapt the antibiotic therapy.

Different phenotypic methods of evaluating the sensitivity of bacteria to antibiotics can be implemented, among them; we quote the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC).

This last one is defined, as being the lowest concentration of antibiotic, which inhibits any visible culture from a bacterial strain after a specific incubation period .It, is determined either in liquid or solid media.

Our study relates to a comparison between two techniques, for measuring the value of the MIC of vancomycin in strains of the *Staphylococcus aureus* species, namely: the technique of broth microdilution, carried out by microplates with 96 wells containing increasing concentrations of vancomycin, compared to the reference technique which is the technique of dilution in agar medium (adopted within the microbiology unit of the central laboratory of the CHU Blida), by the preparation of a range of dilution of the antibiotic to be studied and its incorporation into petri dishes containing the solidified Mueller Hinton (MH) medium.

The findings resulting from the analysis of the results of this preliminary study, carried out between January 1st, 2020 and March 10th, 2020, at the level of the aforementioned unit, and relating to a sample of thirty strains isolated from different clinical samples, gave us allowed to highlight the significant advantages of the technique of micro dilution in liquid medium, from the point of view of cost and ease of handling and also saving of technician time.

However, we can only consider adopting it after the renewal of this same study on a larger sample.

Keywords: Minimum inhibitory concentration, agar dilution, broth microdilution, vancomycin, *Staphylococcus aureus*.

BRIKI Maria Karsa

brikimaria17@gmail.com

BELOUADAH Imane

mouninice1995@gmail.com

BELKHELFA Ahlam

ahlambelkhelda@gmail.com