# Antibiotiques : effet bactériostatique, mesure de CMI

## CMI de différentes souches vis à vis de l'ampicilline : méthode standard de dilution en milieu gélosé

**Définition du terme antibiotique.** Toute substance d'origine naturelle (historiquement, les premiers antibiotiques étaient des molécules synthétisées par des micro-organismes) ou synthétique ayant une toxicité à faible concentration et à mécanisme d'action biospécifique très ciblé (il existe une ou un nombre très limité de biomolécule(s) cible(s) précise(s) de l'antibiotique) envers certaines souches bactériennes. Les molécules cibles sont absentes ou de structure très différente chez les cellules eucaryotes si bien que la toxicité vis à vis des cellules eucaryotes est toujours faible et donc l'administration de l'antibiotique peut être envisagée dans un cadre thérapeutique par voie générale à l'hôte humain, animal, ou végétal (c'est la face thérapeutique du mot).

Sont donc exclus de la définition :

- les antiviraux et les antifongiques à action biospécifique ;
- les désinfectants et antiseptiques qui ont action sans biospécifité ciblée comme définie ci-dessus et qui sont trop toxiques pour envisager toute administration par voie générale.

Sur une cellule souche sensible en culture, la toxicité de l'antibiotique va se manifester par des effets de ralentissement ou d'arrêt de la croissance (bactériostase) ou par des effets létaux (bactéricidie).

**Définitions des termes CMI et CMB**

- CMI (concentration minimale inhibitrice) : concentration minimale en antibiotique inhibant la croissance macroscopique visible d'une souche donnée <u>dans le standard de mesure</u>. Il existe un standard de référence de détermination en milieu solide et des méthodes en milieu liquide.
- CMB (concentration minimale bactéricide) : concentration minimale en antibiotique conduisant à un taux de survie 0,01% de l'inoculum de la souche testée <u>dans le standard de mesure</u>. Il existe deux méthodes classiques de détermination : une en milieu solide et une en milieu liquide.

## 1. Détermination de CMI par méthode standard de dilution en milieu gélosé, présentation de la méthode

La méthode de dilution en milieu solide consiste à incorporer l'antibiotique à une concentration finale donnée dans du milieu de culture standard gélosé maintenu en surfusion à 45°C. Une série de boites de Pétri est préparée avec des concentrations d'antibiotique variant selon une progression géométrique de raison $\frac{1}{2}$.

Les inoculums des différentes souches à tester sont réalisés sur les différentes boites de Pétri contenant les différentes concentrations de l'antibiotique à tester. L'inoculum standard est un dépôt d'environ $10^4$ bactéries (à partir d'une suspension ajustée) pour la plupart des souches (voir aussi biblio.).

Les boites ensemencées sont incubées. La lecture est alors effectuée : il s'agit de repérer l'emplacement de chaque souche et de noter une croissance visible ou une absence de croissance visible. CMI (concentration minimale inhibitrice) = concentration minimale en antibiotique inhibant la croissance macroscopique visible d'une souche donnée dans le standard de mesure.

## 2. Travail proposé : antibiotique à tester, souches à tester, mode opératoire

L'antibiotique à tester est l'ampicilline.

9 souches pures à tester sont disponibles disponibles, cultures en bouillon de 18h sur milieu de Mueller-Hinton. Souches des groupes de risque 1 ou 2 (souches opportunistes sans risque par voie aéroportée).

Le milieu de culture standard pour ces 9 souches est le milieu Mueller-Hinton (MH). Les dépôts standards des inoculums sont de 2 µL, à la strie quantitative. Souches Enterobactéries, Bacillus : travail avec une dilution vers 1/2000 (5 $10^5$ /mL) d'un bouillon 18 H sur MH. Staphylocoques, Entérocoques : travail avec une dilution vers 1/200 d'un bouillon 18 H sur MH. La durée d'incubation standard est de 24 heures à 37°C.

- Préparer une série de tubes (dilutions de l'antibiotique, série géométrique de raison $\frac{1}{2}$) :
  Attention : choisir des tubes adaptés à la manipulation ...

| Tubes $T_i$ | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Solution d'ampi. à 250 µg/mL (mL) | 2,5 | | | | | | | | | |
| NaCl 9 g/L stérile (mL) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Volume redistribué (mL) | | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |

- Dans un tube de 18 mL de milieu de Mueller-Hinton (MH) en surfusion, introduire 2 mL de solution stérile NaCl à 9g/L. Homogénéiser. Couler en boite de Pétri. Étiqueter comme témoin.
- Dans un tube de 18 mL de milieu de Mueller-Hinton (MH) en surfusion, introduire 2 mL de solution d'ampicilline à 250 µg/mL. Homogénéiser. Couler en boite de Pétri. Etiqueter B1.
- Dans chacun d'une série de 10 tubes de 18 mL de milieu de Mueller-Hinton (MH) en surfusion, introduire 2 mL de solution Ti. Homogénéiser. Couler en boite de Pétri. Étiqueter Bi.
- Inoculer les différentes boites par stries de 2 µL des suspensions ajustées des souches à tester (4 souches sont déposées, testées pour chaque boite). Incuber 24 heures à 37°C. (Attention, lorsqu'on travaille avec plusieurs souches inoculées par boite, il faut évidemment proscrire les souches envahissantes.)
- Lire les CMI.

## 3. Compte-rendu

Manipulations réalisées, résultats obtenus, conclusions.

---

***Bibliographie*** *: D'après les anciennes recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). Documents pdf qui étaient téléchargeables à http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2011.pdf et* http://*www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2010.pdf. Ce n'est plus possible aujourd'hui. L'EUCAST (*http://www.eucast.org/documents/external_documents/*) renvoi aux normes ISO 20776-1 et 2 payantes ce qui est très très désagréable.*