

TESTS DE SENSIBILITE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES

I. Introduction

La conduite d'une antibiothérapie dépend de la clinique et des données bactériologiques, pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicologiques.

La connaissance des résistances naturelles et acquises des bactéries en milieu communautaire et hospitalier est fondamentale dans le traitement de première intention.

Dès l'isolement du germe, le laboratoire a pour rôle de déterminer les concentrations d'antibiotiques qui *in vitro* inhibent ou tuent les bactéries. Cette évaluation aide le clinicien à cibler la thérapeutique.

Le laboratoire de bactériologie dispose de nombreux tests de sensibilité des bactéries vis-à-vis des molécules d'antibiotiques. Le choix des antibiotiques à étudier et des méthodes d'étude dépendent de la nature et de la gravité de l'infection.

II. Rappel sur la bactériostase et bactéricidie :

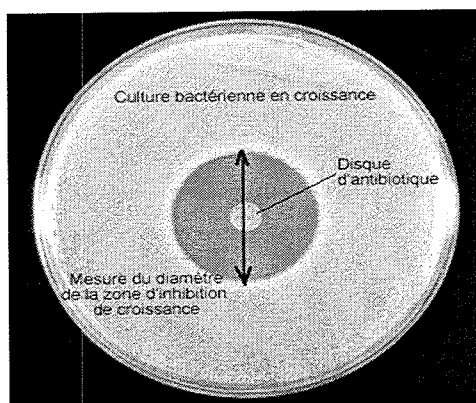
- ✦ Les interactions bactérie-antibiotique peuvent se traduire soit par un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase), soit par un effet létal de l'antibiotique (bactéricidie).
- ✦ La bactériostase est quantifiée par la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la bactéricidie par la CMB (concentration minimale bactéricide).
- ✦ La **CMI** est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures d'incubation. Elle s'exprime en mg/l ou µg/ml.
- ✦ La **CMB** est la plus faible concentration de l'antibiotique laissant après 18 h d'incubation un pourcentage de survivant $<$ ou $=$ à 0,01 % de l'inoculum de départ.
- ✦

III. Les tests de sensibilité :

1) *Antibiogramme* :

La méthode utilisée est la méthode de diffusion en gélose avec des disques.

- ✦ Le principe du test consiste à utiliser des disques en papier buvard imprégnés d'une concentration fixe d'antibiotique.
- ✦ Ces disques sont déposés à la surface d'une gélose (Muller Hinton) inoculée par une suspension bactérienne contenant une quantité fixe de bactéries (inoculum bactérien qui doit être équivalent à 0,5 McFarland).
- ✦ Après une incubation à 35° pendant 18-24 heures, il s'établit un gradient de concentration entre la culture bactérienne et la diffusion du disque et qui s'exprime par un diamètre d'inhibition de la culture.
- ✦ Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en mm et des courbes de concordance sont réalisées.



La mesure de ce diamètre permet de classer la bactérie après comparaison des diamètres à une table dans 3 catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistant (R).

- ❖ **Sensible(S)** : signifie que la probabilité de succès thérapeutique est forte, à condition que les autres paramètres pharmacologiques (diffusion au site de l'infection), toxicologique et clinique soient pris en compte.
- ❖ **Résistant(R)** : signifie que le risque d'échec thérapeutique est grand quelque soit le traitement.
- ❖ **Intermédiaire (I)** : signifie que l'action de l'antibiotique se situe dans la zone d'incertitude qui ne peut pas prédire du succès ou de l'échec thérapeutique.

Exemple :

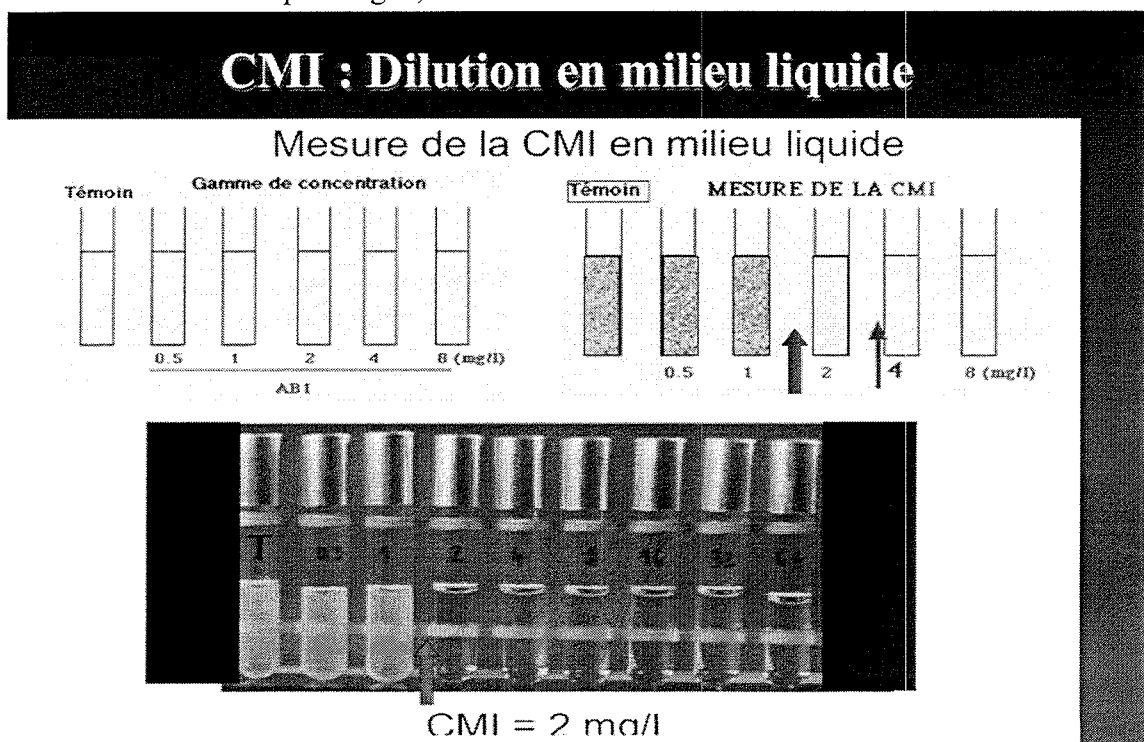
Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Penicilline	10 UI	28	---	29	0,25	-----	0,12
Oxacilline (<i>S.aureus</i>)	1 µg	10	11 – 12	13	4	-----	2
Oxacilline (<i>S.lugdunensis</i>)	1 µg	----	-----	-----	4	-----	2
Cefoxitine (<i>S.aureus</i> et <i>S.lugdunensis</i>)	30 µg	21	---	22	8	-----	4
Oxacilline (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>)	1 µg	----	---	-----	0,5	-----	0,25
Cefoxitine (S.C.N.sauf <i>S.lugdunensis</i>)	30 µg	24	---	25	---	-----	---
Gentamicine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4
Kanamycine	30 µg	13	14 – 17	18	64	32	16
Amikacine	30 µg	14	15 – 16	17	64	32	16

- ✦ La réponse S/I/R est suffisante dans la majorité des infections.
- ✦ Les avantages de l'antibiogramme sont : sa rapidité et sa reproductibilité.
- ✦ Les inconvénients de ce test sont :
 - ✓ l'étude de la bactériostase uniquement,
 - ✓ le manque de précision,
 - ✓ l'absence de détection de certaines résistances telles que certaines β -lactamases,
 - ✓ la réponse ne tient pas compte du site de l'infection mais seulement des concentrations sériques pour des posologies usuelles et d'interprétation pouvant être complexe.

2) Techniques de détermination de la CMI :

a) Dilution en milieu liquide : méthode de référence

- ✦ Principe du test : consiste à mettre un inoculum bactérien fixe dans une série de dilutions de l'antibiotique (gamme de concentration en progression géométrique de raison 2). Un tube sans antibiotique servira de témoin.
- ✦ Elle se pratique en milieu liquide (en tubes ou en microplaques)
- ✦ La CMI est déterminée puis comparée à un tableau pour classer la bactérie dans l'une des catégories S, I ou R.
- ✦ Avantage :
 - ✓ technique précise, donne un résultat quantitatif.
 - ✓ Utile pour les antibiotiques ayant les meilleures CMI dans les infections sévères ou quand les foyers infectieux sont peu accessibles. •
- ✦ Inconvénient : technique longue, lourde et coûteuse.

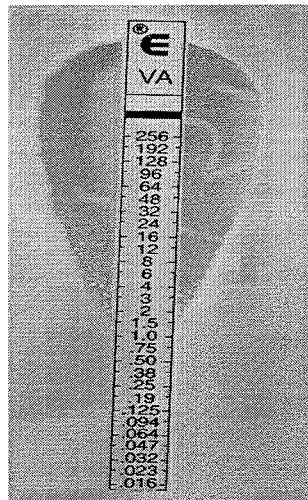


b) Dilution en gélose :

- ✦ Dans ce cas, l'antibiotique est incorporé dans la gélose ; chaque boîte de Petri correspond à une concentration donnée d'antibiotique.
- ✦ L'inoculum est déposé en spot

c) E-Test :

- ✦ Pour alléger la technique, de fines bandelettes de plastique inerte et non poreux imprégnées d'un gradient prédéfini de concentrations croissantes d'antibiotique sont utilisées.
- ✦ La technique d'ensemencement est identique à celle de l'antibiogramme.
- ✦ La bandelette est mise sur la surface de la gélose.
- ✦ Après une incubation à 35° pendant 18-24 heures, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette se forme.
- ✦ La lecture de la CMI est effectuée au point d'intersection de l'ellipse d'inhibition et de la bandelette.



3) *Test rapide* :

- ✦ Ce test est complémentaire à l'antibiogramme et obligatoire pour certaines espèces bactériennes (*Haemophilus*, *Neisseria gonorrhoeae*).
- ✦ Il est dit test à la nitrocéfine, celle-ci est une céphalosporine chromogène qui scindée par une β -lactamase libère une substance chromogène (colorée).
- ✦ Ce test a pour principe de déposer une colonie sur un disque imprégné de nitrocéfine, lorsqu'il y a production de β -lactamase par la bactérie, il y a apparition d'une coloration rouge sur le disque.



4) Détermination de la CMB :

Principe du test : consiste à dénombrer le nombre de bactéries survivantes après incubation par rapport à l'inoculum de départ.

Technique complexe

5) Méthodes génotypiques :

- ✦ Ces techniques consistent à mettre en évidence les gènes codant pour la résistance aux antibiotiques.
- ✦ Exemple de technique : PCR (polymérase chain reaction).
- ✦ Elles sont utilisées pour : exemple : résistance à l'oxacilline chez *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence du gène *mecA*
- ✦ L'intérêt de ces techniques est la détection rapide des résistances en 3 à 4 heures, elles sont spécifiques et sensibles. Elles complètent les méthodes phénotypiques et présentent un intérêt pour les bactéries à croissance lente
- ✦ Elles peuvent être appliquées directement sur les produits pathologiques et permettent d'obtenir une réponse plus rapide, notamment en cas d'infection sévère.

IV. Autres tests :

1. Association d'antibiotiques :

- ✦ On prescrit des associations pour éviter la sélection de mutants résistants et surtout pour obtenir un effet bactéricide maximal donc une synergie lors d'infections graves (endocardites, septicémies, méningites..)
- ✦ Technique complexe réalisée par des laboratoires de référence
- ✦ L'association est dite synergique lorsque l'effet des deux antibiotiques est supérieur à celui de l'antibiotique utilisé seul.
- ✦ Elle est antagoniste lorsque son effet est inférieur à celui de l'antibiotique utilisé seul.
- ✦ Elle est indifférente lorsque son effet est égal à celui de l'antibiotique utilisé seul.

2. Le dosage de l'antibiotique dans le sérum :

✦ Intérêt :

- Apprécier le risque toxique d'un antibiotique ayant un index thérapeutique étroit c'est-à-dire que la dose efficace est proche de la dose toxique, exemple : aminosides et glycopeptides.
- Vérifier que les concentrations sériques sont suffisantes

- ✚ Principe du test : on effectue deux prélèvements de sérum le 1er au pic de la plus forte concentration sérique (entre 1 et 2 h après injection) et le 2eme à la vallée au moment de l'élimination de l'antibiotique (avant une nouvelle injection).
- ✚ Méthodes très diverses (microbiologiques, HPLC, immuno-enzymatiques...)
- ✚ Pour être actif, la concentration locale de l'antibiotique doit être >CMI.

V. Antibiogramme des Mycobactéries :

- ✚ Technique différente de celle l'^{de}antibiogramme standard
- ✚ Méthode des proportions : consiste à déterminer pour la souche à étudier la proportion de mutants résistants à un antibiotique donné. On l'obtient en dénombrant sur des milieux solides contenant la concentration critique d'antibiotiques les colonies qui se sont développées. On compare ce nombre à celui des germes viables contenus dans le même inoculum et dénombrés sur milieux sans antibiotiques.
- ✚ Le rapport des premiers aux seconds permet d'établir la proportion.
- ✚ $\% \text{ de R} = \text{nombre de R} \times 100 / \text{population totale}$
- ✚ Proportion critique = 1 %