

1°/ Définition

L'antibiogramme standard est un test *in vitro* de sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques par la technique de diffusion sur milieux gélosés.

Il a pour but de guider le clinicien dans le **choix d'un antibiotique pour traiter une infection** bactérienne, d'exploiter les données pour la **surveillance des résistances** bactériennes aux antibiotiques (échange de données par le logiciel WHONET) et une indication supplémentaire pour l'**identification du germe** par la mise en évidence de résistances naturelles.

Le Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques applique les techniques de standardisation de l'antibiogramme préconisées par le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) recommandées par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et agréées par de nombreux pays. La standardisation de la technique permet d'échanger des données grâce à un logiciel de saisie et d'exploitation fourni par l'OMS : le WHONET.

Le CLSI et l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) sont en concertation pour tenter d'unifier les techniques, les milieux, les charges des disques et les valeurs critiques. Dans les années à venir, il y aura uniformisation des règles applicables par tous les pays.

Il existe en Algérie un réseau de laboratoires chargé de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, il est dénommé : Algerian Antimicrobial Resistance Network (AARN). Son adresse Web est : <http://www.sante.dz/aarn>

2°/ But de la standardisation

- Dépister rapidement et correctement les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.
- Surveiller l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans un pays.
- Echanger des données sur la résistance des bactéries aux ATB entre laboratoires d'un même pays, d'un même continent puis avec les autres continents.
- Réduire le coût de l'antibiogramme.
- Orienter la prescription d'antibiotique.
- Contrôler la qualité de l'antibiogramme pour éviter les erreurs de lecture et d'interprétation.

3°/ La technique standardisée

3-1 Principe de la technique

Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé préalablement ensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester. Après incubation, les boîtes de Petri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (résistant, intermédiaire, sensible). Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée.

3-2 Paramètres importants

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

3-2-1 Le milieu de culture :

Le milieu de culture doit permettre la croissance de nombreuses bactéries et il ne doit pas contenir d'inhibiteurs des antibiotiques. La teneur en calcium et en magnésium doit être contrôlée, car excès de cations bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) inhibent l'action des polymyxines. Un pH trop acide augmente l'activité des β -lactamines, un milieu alcalin favorise les aminosides et les macrolides, il doit être compris entre 7,2 et 7,4, valeur qui permet une bonne croissance bactérienne et qui réalise un compromis pour l'activité des antibiotiques.

Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton (plus 5% de sang pour les germes exigeants). Il doit être coulé en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4 mm et les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

La standardisation de l'épaisseur de la gélose détermine l'établissement du gradient et valeur de la concentration en antibiotique à une distance donnée du disque. En effet, l'antibiotique contenu dans le disque se solubilise dans l'eau de la gélose. Sa diffusion peut-être schématiquement présentée en deux étapes :

une diffusion verticale (en profondeur) dans le milieu contenu dans le cylindre délimité par le disque pré-imprégné,

une diffusion horizontale (latéralement) qui répartit l'antibiotique selon un gradient de concentrations dont le maximum est situé au niveau du disque (figure 1). Chaque disque est pré-imprégné d'une masse connue d'antibiotique appelée charge du disque.

d : diamètre du disque d'antibiotique (6,35 mm)
 \emptyset : diamètre d'inhibition mesuré

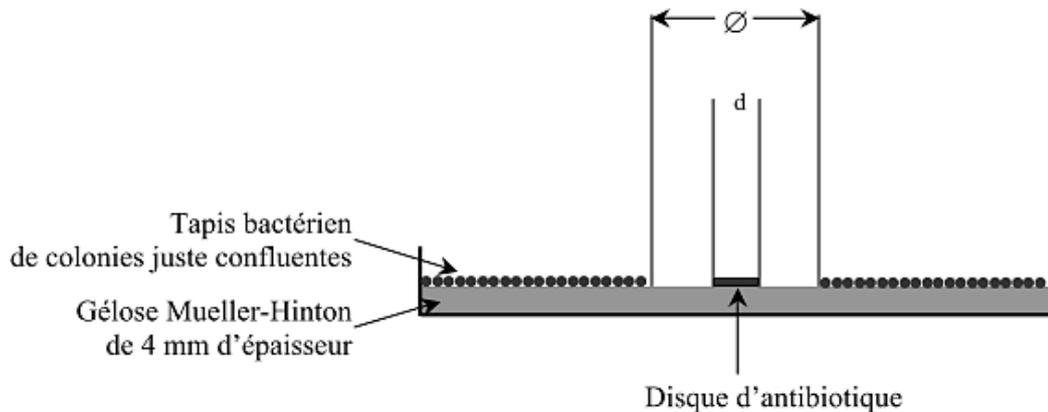


Figure 1 : schéma en coupe d'une gélose Mueller-Hinton utilisée pour un antibiogramme standard

Il existe pour chaque antibiotique une relation linéaire entre le logarithme de la concentration en antibiotique et le diamètre du cercle concentrique au disque d'antibiotique appelée droite de concordance (figure 2).

On peut placer sur cette droite de concordance les concentrations critiques en antibiotique et en déduire les diamètres de diffusion correspondants.

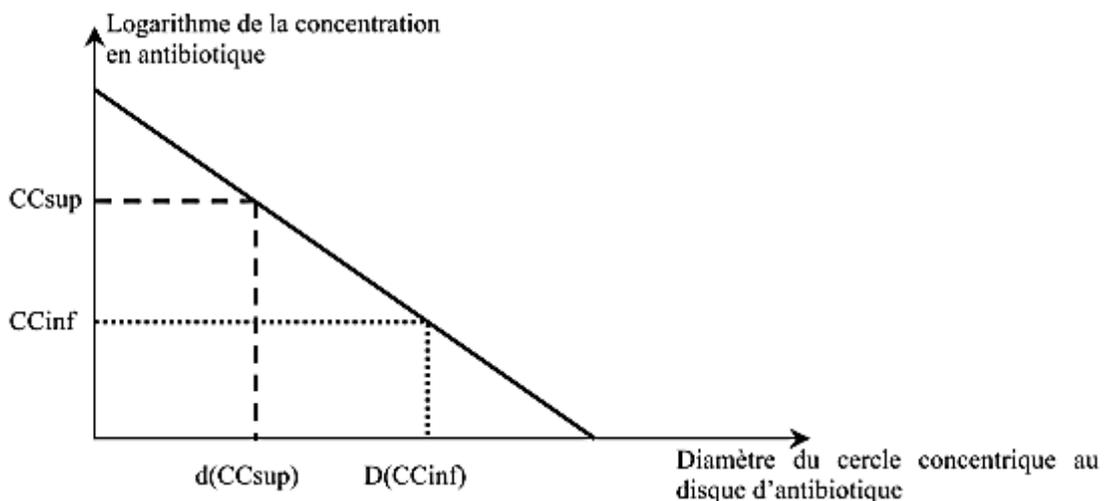


Figure 2 : droite de concordance entre logarithme de la concentration en antibiotique et diamètre de diffusion de l'antibiotique

Plus on s'éloigne du disque d'antibiotique plus la concentration en antibiotique diminue.

La CC_{inf} est plus petite que la CC_{sup} donc $D(CC_{inf})$ est plus grand que $d(CC_{sup})$.

3-2-2 Les disques d'antibiotiques

Les disques sont fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure imprégnés d'agents antimicrobiens à des concentrations précises. Ils sont clairement identifiés par un sigle, comportant 1 à 3 lettres, imprimé de chaque côté du disque (tableau 1).

Tableau 1 : exemples d'abréviation de quelques antibiotiques.

Sigle	Antibiotique	Famille
AM	Ampicilline	Aminopénicilline
AMC	Amoxicilline + acide clavulanique	Aminopénicilline
AMX	Amoxicilline	Aminopénicilline
AN	Amikacine	Aminosides
ATM	Aztréonam	Monobactame
AZM	Azithromycine	Macrolides
B	Bacitracine	Polypeptides
C	Chloramphénicol	Phénicolés

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

Les cartouches de disques doivent être conservées dans leur container entre +2 et +8°C au sec. Le laboratoire a pour responsabilité de stocker les disques dans des conditions optimales et de ne pas utiliser des disques périmés.

Avant utilisation, les disques doivent être amenés à température ambiante. Toute cartouche ouverte doit être utilisée dans les cinq jours.

3-2-3 La taille de l'inoculum

La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial. La suspension cellulaire doit être préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune et pure sur milieu d'isolement approprié. Dans le cas de *Neisseria gonorrhoeae*, la suspension est préparée dans du tampon phosphate stérile à pH 7,2.

Elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de McFarland) (figure 3). L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

En Algérie, l'antibiogramme par diffusion est réalisé avec une suspension calibrée à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm contenant environ 10^8 bactéries par ml.

Ce nombre est porté à 10^9 pour *Helicobacter pylori* équivalente au standard McFarland 3.



Figure 3 : les standard McFarland servent de standards de turbidité pour préparer les suspensions de microorganismes.

3-2-4 La technique d'ensemencement

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par écouvillonnage ou par inondation de telle façon à avoir après incubation des colonies distinctes mais jointives. Il faut respecter les mesures de sécurité nécessaires.

3-3 Contrôle de la technique

3-3-1 Objectifs

Le contrôle de qualité permet de garantir :

- la précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité,
- la performance des réactifs utilisés dans les tests,
- la performance du personnel qui effectue les tests et la lecture.

3-3-2 Procédure de contrôle

Selon les recommandations du Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (2011), le contrôle de qualité doit se faire à chaque nouveau lot de Mueller-Hinton et ou d'antibiotiques.

Le laboratoire devrait vérifier la validité de sa technique en testant, au moins une fois par mois, la sensibilité des souches de référence et vérifier que les diamètres des

zones d'inhibition obtenues vis-à-vis des divers antibiotiques sont conformes aux valeurs publiées par le comité de l'antibiogramme.

Les souches de référence devant être obligatoirement testées sont : *E. coli* ATCC 25922 ; *S. aureus* ATCC 25923 ; *P. aeruginosa* ATCC 27853 ; *S. pneumoniae* ATCC 49619 et *H. influenzae* ATCC 49247.

Si les résultats ne sont pas satisfaisants, il faudra contrôler chacun des paramètres suivants :

- la lecture et l'interprétation des diamètres des zones d'inhibition,
- le milieu de culture,
- l'inoculum,
- les disques d'antibiotiques,
- les souches de référence.

3-4 Lecture des résultats

Après incubation à la température et sous atmosphère recommandées, les diamètres des zones d'inhibition seront mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse. Les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Petri fermée.

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par les instances en vigueur (RASRBA et CLSI) afin de classer la bactérie dans l'une des catégories Résistant, Intermédiaire, Sensible.

Ces critères de catégorisation clinique selon les diamètres critiques sont remis à jour périodiquement par le CLSI.

3-5 Rédaction des résultats

Le compte-rendu des résultats d'un antibiogramme standard sera réalisé en reportant les diamètres d'inhibition mesurés \emptyset pour chaque antibiotique et les diamètres critiques dans un tableau (Tableau 2). Une colonne permettra d'interpréter la résistance ou la sensibilité de la souche pour chaque antibiotique.

Tableau 2 : exemple de tableau de rendu des résultats d'un antibiogramme standard

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

4°/ Les catégories cliniques

4-1 Définition des catégories cliniques

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : **Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I)**.

- Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de **succès** thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.
- Les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'**échec** thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
- Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est **imprévisible**. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches :
 - peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie S. Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement ;
 - peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R, mais suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues) ;

La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

4-2 Etablissement des valeurs critiques délimitant les catégories cliniques

Deux concentrations critiques sont définies pour chaque antibiotique :

La **concentration critique basse c** et la **concentration critique haute C** auxquelles correspondent des diamètres critiques **D**, et **d**, respectivement.

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

Chaque antibiotique a ses concentrations critiques propres.

Pour une bactérie et un antibiotique donnés, le diamètre d'inhibition mesuré est comparé aux diamètres critiques (tableau 3) :

- en dessous d'un diamètre critique inférieur d, la souche est classée R.
- au-dessus du diamètre critique supérieur D, la souche est classée S.

Tableau 3 : interprétation de la sensibilité et de la résistance d'une souche à un antibiotique

\emptyset mesuré $\geq D$ (CCinf)	Sensible
\emptyset mesuré $< d$ (CCsup)	Résistant
$d(\text{CCsup}) \leq \emptyset$ mesuré $< D$ (CCinf)	Intermédiaire

4-3 Procédure et critères de catégorisation des souches

Aux regards des concentrations et des diamètres critiques sont considérées comme :

- sensibles (S), les souches pour lesquelles la CMI de l'antibiotique testé est inférieure ou égale à la concentration critique basse (c), ce qui équivaut à un diamètre supérieur ou égal au diamètre critique D ;
- résistantes (R), les souches vis-à-vis desquelles la CMI de l'antibiotique testé est supérieure à la concentration critique haute C, correspondant à un diamètre inférieur au diamètre critique d ;
- de sensibilité intermédiaire (I), les souches vis-à-vis desquelles la CMI de l'antibiotique testé et du diamètre correspondant sont compris entre les deux concentrations critiques et les deux diamètres critiques (tableau 4).

Tableau 4 : Critères de catégorisation selon les valeurs critiques

Catégories	CMI (mg/L)	Diamètre mesuré \emptyset (mm)
Sensible	$\text{CMI} \leq c$	$\emptyset \geq D$
Résistant	$\text{CMI} > C$	$\emptyset < d$
Intermédiaire	$c < \text{CMI} \leq C$	$d \leq \emptyset < D$

5°/ La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

5-1 Définition

L'importance de la résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est évaluée par détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et par comparaison de celle-ci avec celle d'une souche dite « sensible ».

La CMI est définie comme la concentration minimale d'un antibiotique qui inhibe la croissance *in vitro* de 99% de la population bactérienne testée.

En pratique, la CMI est la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible. Elle explore donc l'effet bactériostatique seulement, ce qui n'est pas limitatif sachant qu'en bactériologie clinique, le but le plus souvent recherché est l'inhibition de la prolifération bactérienne, dans la mesure où l'organisme est capable de se défendre contre les bactéries. Il faut noter que la CMI ne prédit pas toujours l'effet observé *in vivo*. De même, la CMI déterminée peut varier en fonction du milieu utilisé pour la réalisation du test.

Elle s'exprime en général en $\mu\text{g/ml}$ et peut être réalisée par différentes méthodes et sur différents milieux de croissance.

5-2 Techniques de la détermination de la CMI

5-2-1 Méthodes de dilution

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

- En milieu liquide (figure ...), l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.

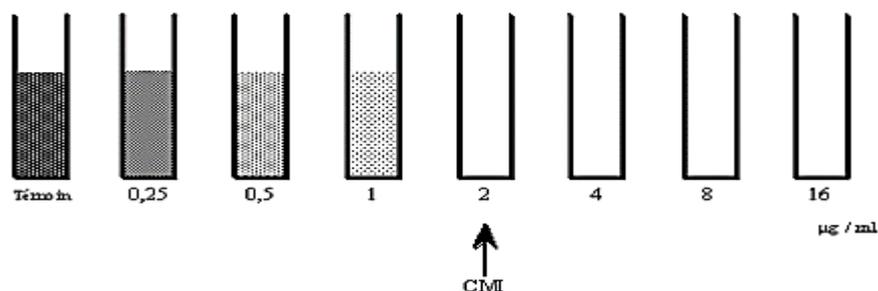


Figure 4 : détermination de la CMI en milieu liquide.

La CMI de la souche testée est de 2 $\mu\text{g/mL}$ (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu).

- En milieu solide (figure 5), l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Petri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.

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

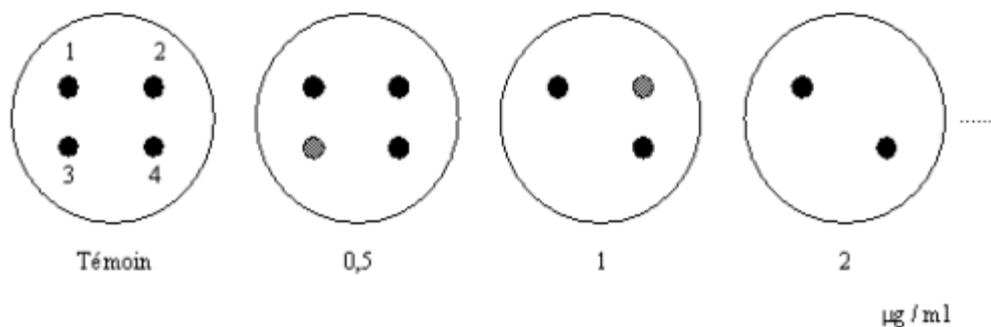


Figure 5: Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.

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

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

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

5-2-2 Le E-test :

La détermination précise de la CMI par les méthodes classiques est difficilement utilisable en pratique quotidienne. La commercialisation d'une technique rapide et simple, le E-test permet à un laboratoire une estimation indirecte de la CMI.

Le Etest®, technique en milieu gélosé, permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Ce gradient couvre une zone qui, en fonction des molécules, va de 0,016 à 256 mg/L ou de 0,002 à 32 mg/L.

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

Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI (figure6). Une échelle de lecture, imprimé sur la bandelette, permet une interprétation rapide.



Figure 6 : CMI de la pénicilline G d'une souche *S. pneumoniae* (technique Etest) (RASRBA, 2011)

Lorsque la zone d'inhibition est nette et parfaitement symétrique, la lecture ne pose aucun problème. Dans tous les autres cas, une interprétation est nécessaire :

- Une zone de décrochage (dip) dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse (figure 7a) ;
- La présence de colonies "squatter" doit être analysée (résistance hétérogène, émergence de mutants résistants, mélange bactérien) (figure 7b) ;
- La présence d'une croissance en ligne le long de la bandelette n'est pas prise en compte et résulte certainement d'un séchage insuffisant de la surface du milieu (figure 7c) ;
- Une asymétrie des points d'intersection de l'ellipse avec la bandelette conduit à lire la CMI au niveau le plus élevé (figure 7d).

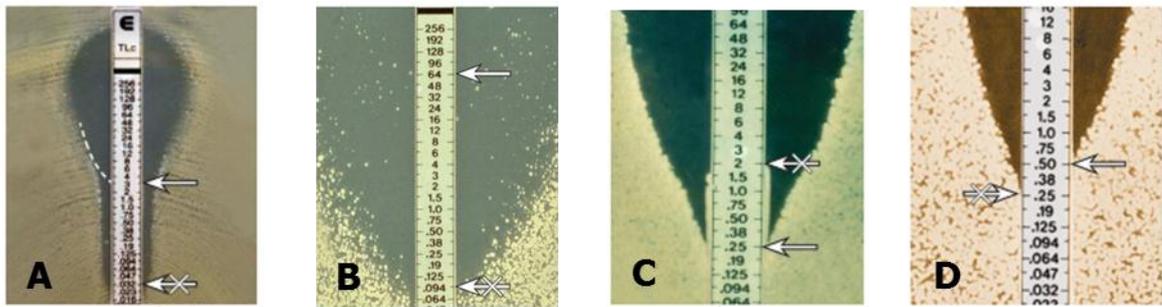


Figure 7 : ETEST® Reading guide. Guide de lecture du ETEST® pour les bactéries aérobies. © Copyright AB BIODISK.

5-3 L'association d'antibiotiques

L'interaction de deux antibiotiques (figure 8) peut produire quatre principaux effets :

- effet synergique : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément. L'effet $(A + B) > \text{effet A} + \text{effet B}$ (figure 9) ;
- effet additif : l'effet de l'association est légèrement supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément. L'effet $(A + B) = \text{effet A} + \text{effet B}$;
- effet indifférent : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre. L'effet $(A + B) = \text{effet A}$ ou effet B ;
- effet antagoniste : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément. L'effet $(A + B) < \text{effet A}$ ou effet B.

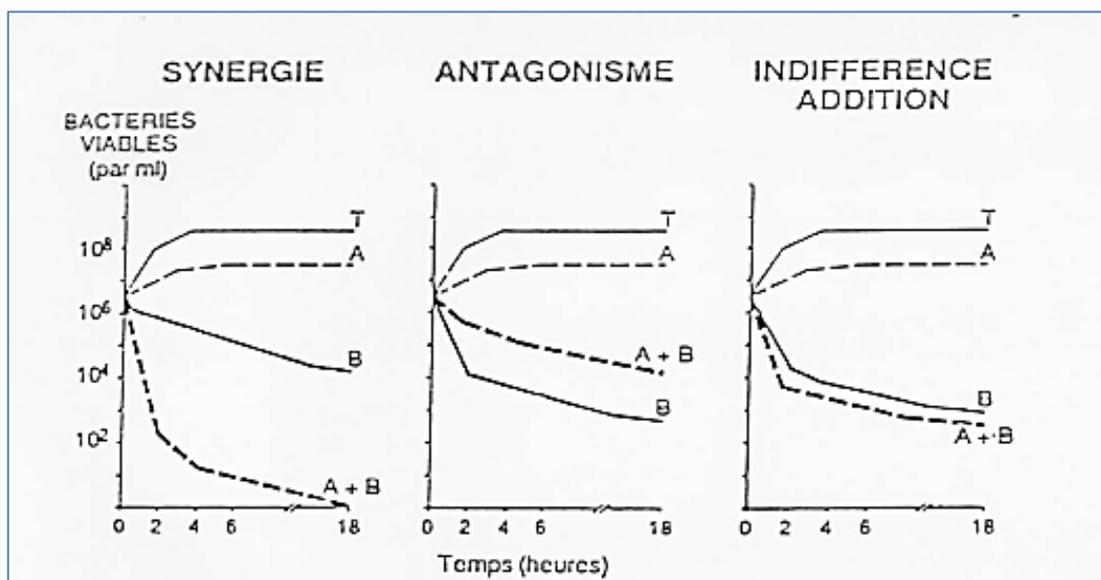


Figure 8 : Association d'antibiotique : cinétique de bactéricidie en fonction du temps.

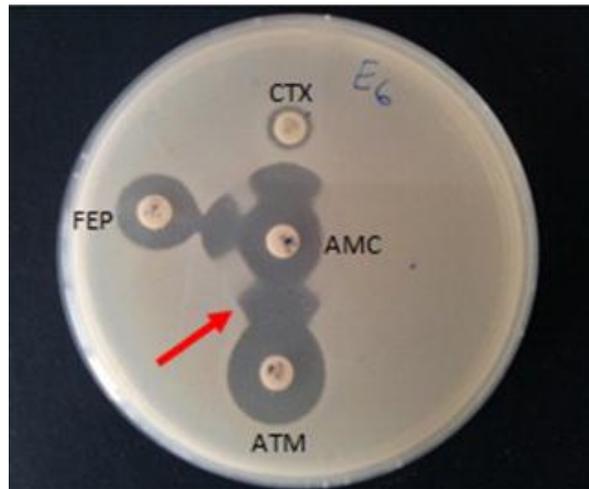


Figure 9 : test de synergie positif (aspect en bouchant de champagne). FEP : céfépime ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; ATM :aztréonam. (El bouamri *et al.*, 2014)

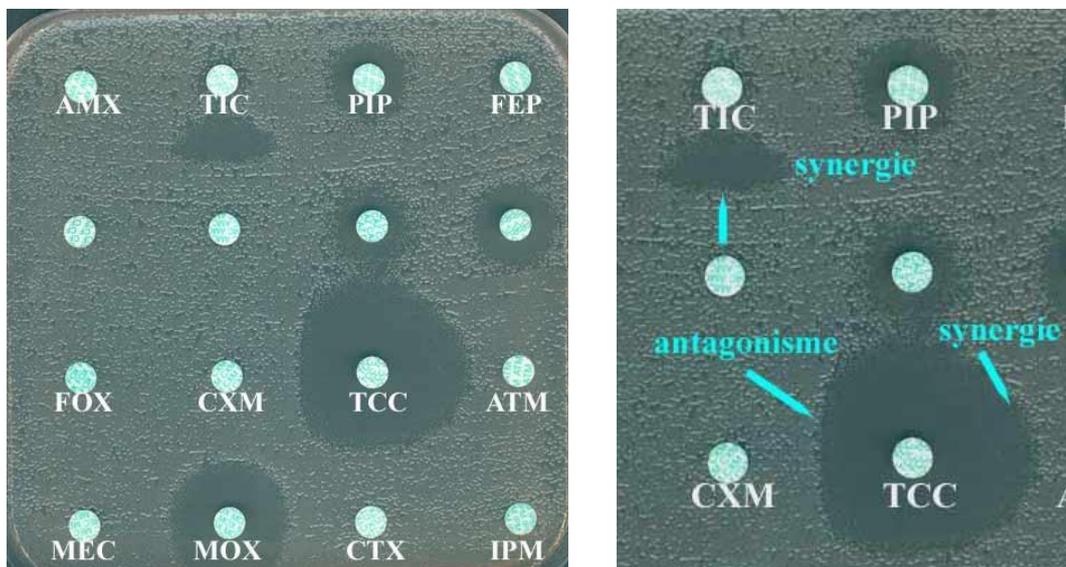


Figure 10 : expression phénotypique caractérisée par une multirésistance à divers antibiotiques associée à une image de synergie-antagonisme autour du disque de ticarcilline-acide clavulanique (TCC) (<http://www.microbes-edu.org>).

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

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

La plus grande efficacité thérapeutique de certaines associations a été démontrée expérimentalement et/ou confirmée par l'expérience clinique.

7°/ Limites de l'antibiogramme

7-1 Limites techniques

La réalisation d'un antibiogramme est soumise au respect de conditions techniques qui sont parfois incomplètement et insuffisamment respectées.

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

Les techniques de l'antibiogramme ont été standardisées **uniquement pour les bactéries cultivant rapidement sur milieux usuels.**

Exemples :

Pour les mycoplasmes : En raison de la petite taille des colonies et de la durée d'incubation souvent longue, la méthode de diffusion en milieu gélosé est inadaptée.

Les espèces des genres *Chlamydia*, *Rickettsia*... sont des parasites intracellulaires obligatoires et l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques nécessite le recours à des techniques particulières rarement effectuées en routine.

La technique des disques s'applique mal à l'évaluation de la sensibilité à des molécules qui diffusent peu dans la gélose (polymyxines ou glycopeptides) et toute résistance devrait être confirmée par la mesure de la CMI.

7-2 Limites dans l'interprétation des résultats

* Incertitude sur l'étiologie de l'infection

L'antibiogramme ne peut apporter une aide que dans la mesure où il est effectué sur la bactérie véritablement responsable de l'infection (Infection documentée).

Parmi les bactéries isolées d'un prélèvement, le laboratoire doit faire un choix et n'effectuer l'antibiogramme que sur l'espèce ou les espèces susceptibles de jouer un rôle étiologique. Ce choix n'est possible que dans la mesure où le bactériologiste possède des connaissances en pathologie infectieuse.

* Absence de parallélisme entre les situations *in vitro* et *in vivo*.

L'antibiogramme ne peut prédire le comportement d'un antibiotique *in vivo*. Celui-ci est fonction de multiples facteurs :

- Choix d'un schéma posologique ;
- Diffusion au site de l'infection ;

- Pénétration dans les cellules ce qui est important à considérer pour les infections dues aux bactéries intracellulaires (les antibiotiques pénétrant bien dans les cellules sont les tétracyclines, le chloramphénicol, la rifampicine) ;
- Influence des facteurs physiologiques ou pathologiques sur la pharmacocinétique de l'antibiotique ;
- Transformation de la molécule *in vivo* ;
- Etat physiologique de la bactérie au sein du foyer infectieux (les bactéries «au repos» sont insensibles aux antibiotiques qui interfèrent avec la biosynthèse du peptidoglycane et de même pour les mutants dépourvus de paroi) ;
- Émergence d'une résistance au cours du traitement ;