

Uc3facMedPharm année universitaire 2023/24

4eme année Pharm.

ALLAG H. ANTIBIOTIQUES III

ROLE DU LABORATOIRE DANS LA SURVEILLANCE ET SUIVI DU TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE.

ETUDE IN VITRO DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

I/ INTRODUCTION :

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également :

- A la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne ;
- A l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

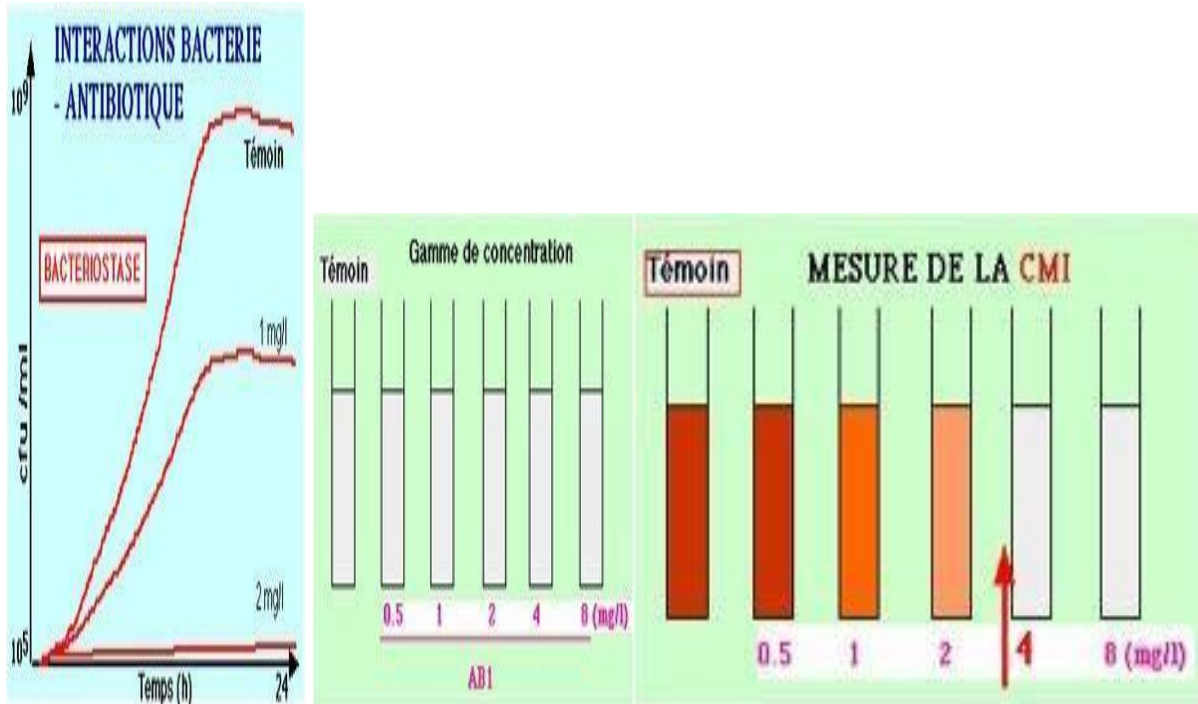
Le laboratoire de bactériologie dispose de nombreux tests de sensibilité des bactéries vis-à-vis des molécules d'antibiotiques, en particulier celles inscrites dans la nomenclature nationale.

Ces tests permettent de détecter des résistances bactériennes et d'aider ainsi le médecin praticien dans sa prescription.

Leur réalisation dépend, bien entendu, de données cliniques et épidémiologiques.

Selon les circonstances, sont effectués les tests suivants :

- **Antibiogramme ou test de diffusion de disque en gélose,**
- **Dosage de la concentration minima inhibitrice (pour les bactéries isolées d'hémoculture, de liquides biologiques ou de suppurations profondes),**
- **Recherche de la Bêtalactamase : enzyme produite par certaines bactéries : Haemophilus, Neisseria.,**
- **Recherche de la résistance à l'oxacilline (ou méthicilinorésistance) des Staphylocoques aureus et Staphylocoques coagulase négative si pathogènes).**
- **Dosage des antibiotiques pour la surveillance des traitements.**
- **Etude des associations bactéricides d'antibiotiques.**



Interaction bactérie-antibiotique ; bactériostase, : détermination de la cmi

II/ BACTERIOSTASE

Définition :

Arrêt de la croissance bactérienne

Un antibiotique bactériostatique provoque l'arrêt de la croissance bactérienne à des concentrations thérapeutiques.

1) CMI :

La plus faible concentration en antibiotique capable d'inhiber toute culture visible après 18 h d'incubation...
Valeur indicatrice du **pouvoir bactériostatique** d'un antibiotique.

2) Méthodes de détermination de la CMI :

a) La méthode de dilution en milieu liquide :

Consiste à préparer une série de tubes à hémolyse avec le même milieu de culture liquide (deux ml) puis constituer une gamme de concentrations de l'antibiotique à tester, par exemple 0,5 mg/l 1, 2, 4, 8, 16 (raison géométrique de base 2).

Il reste un tube (contrôle) ou témoin de croissance de la souche à tester.

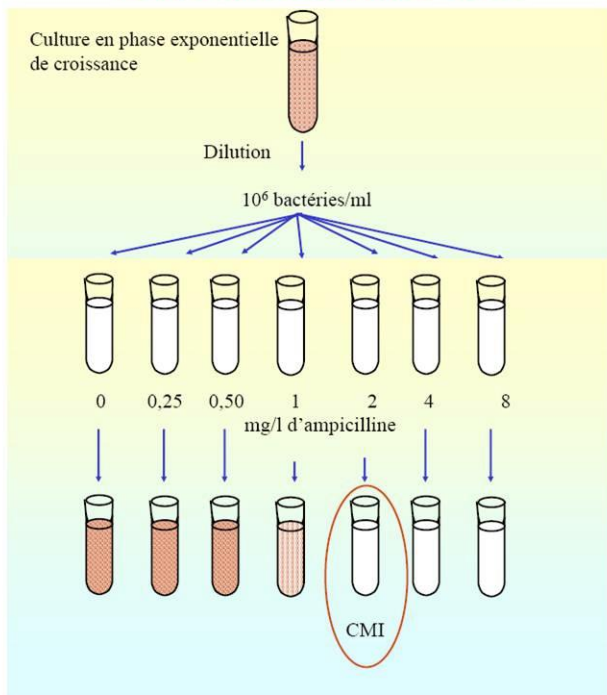
Enfin on ajoute la même quantité de germes dans chacun des tubes (inoculum).

La galerie ainsi préparée sera incubée à 37°C pendant 18 heures. Enfin elle sera examinée à l'œil nu.

Le principal inconvénient de cette méthode est la quantité de tubes à manipuler, soit 100 tubes pour une dizaine d'antibiotiques à examiner.

La CMI sera la concentration en antibiotique la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. Une **variante** de cette méthode consiste à utiliser des **microcupules** en plaque au lieu de tubes. Il s'agit d'une **microméthode** en milieu liquide.

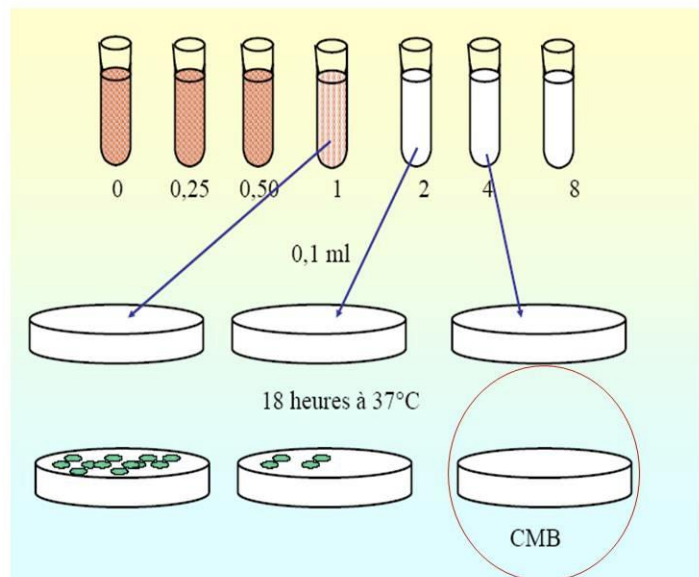
Détermination des CMI



Effet Bactériostase :

La plus faible concentration de l'antibiotique qui empêche une croissance visible après une incubation de 18-24h => CMI (concentration minimale inhibitrice).

Détermination des CMB



Effet Bactéricide:

La plus faible concentration de l'antibiotique qui produit une réduction de 99,9% du nombre de bactéries= CMB (concentration minimale bactéricide).

b) La méthode de dilution en milieu solide :

Consiste à incorporer l'antibiotique à une concentration donnée dans la gélose, maintenue liquide à 42°C.

Une série de boîtes de Pétri est préparée avec des concentrations d'antibiotique variant selon une progression géométrique de base de 2, comme précédemment.

Puis sont préparées les suspensions des différentes bactéries à examiner qui sont alors distribuées sous forme de spots grâce à des distributeurs spécifiques ou en utilisant des écouvillons.

Après avoirensemencé la série de boîtes, celles-ci sont incubées dans une étuve jusqu'au lendemain. La lecture est alors effectuée: il est facile de repérer l'emplacement de chaque souche et de noter croissance ou absence de croissance.

Cette méthode permet d'examiner des séries de 20 souches en même temps.

c) La méthode de diffusion ou des disques en milieu solide : ou ANTIBIOGRAMME

STANDARD : technique la plus simple

- **Définition :**

C'est la détermination de la **sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques**.

- **Principe :**

Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture => compétition entre la diffusion de l'antibiotique et la croissance bactérienne.

A la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations d'antibiotiques égales aux CMI.

- **Technique : la technique standardisée par l'OMS est la suivante(normes CLSI) :**

Milieu :

- Gélose Mueller Hinton (HM), coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm.
- Les géloses sont **séchées** avant l'emploi.

Inoculum :

-A partir d'une culture pure de 18H sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

-Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologie stérile à 0,9%.

-Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à **0,5 Mc Farland** ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

-L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

-L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

NB : L'inoculum est dilué au 1/100 pour les molécules suivantes : cefalexine, pristinamycine, acide fusidique.

Ensemencement :

-Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

-L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

-Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

-Répéter l'opération deux 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.

-Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Application des disques d'antibiotiques :

-Il ne faut pas mettre plus de **6 disques d'antibiotiques** sur une boîte de 90mm de diamètre.

-Les disques d'antibiotiques doivent être **espacés de 24 mm, centre à centre**.

-La liste des antibiotiques à tester, selon la bactérie isolée est pré-listée.

Incubation :

-20 à 24 Heures, à 35°C.

-L'incubation se fait en atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

-La durée D'incubation peut être prolongée pour la lecture des macrolides.

Lecture :

-Mesurer avec précision, le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne et non pas celle de l'hémolyse, à l'aide **d'un pied à coulisse métallique**, boîte ouverte et bien éclairée.

- La zone d'inhibition circulaire est mesurée par le **diamètre en mm**, puis il sera possible de calculer la CMI de l'antibiotique pour la souche examinée en reportant ce diamètre sur une **courbe de concordance**

- Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans des **tables de lecture**.

- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire, ou Résistante.

Interprétation des catégories S,I,R :

- la souche est dite **RESISTANTE** : la *CMI* ne peut être atteinte par un traitement réalisé à l'aide de cet antibiotique sans être toxique.
- la souche est dite **SENSIBLE** : la *CMI* peut être atteinte par un traitement usuel réalisé à l'aide de cet antibiotique.
- La souche est dite **INTERMEDIARE** : la *CMI* ne peut être atteinte qu'en augmentant les doses.

- **NB/L'objectif de l'antibiogramme est de catégoriser cliniquement la sensibilité des bactéries aux antibiotiques afin de prédire une efficacité chez le malade.**

L'ancienne catégorisation clinique (S pour sensible, I pour intermédiaire et R pour résistant) a été redéfinie par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – organisme européen d'uniformisation des pratiques de l'antibiogramme) en 2018 en lien avec les comités nationaux européens (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie ou CA-SFM pour la France). Cette catégorisation clinique est directement reliée au niveau d'exposition de la bactérie à l'antibiotique sur le site infectieux. Cette exposition dépend du mode d'administration, de la posologie, des intervalles entre plusieurs administrations, mais aussi des caractéristiques pharmacocinétiques de l'antibiotique.

La catégorisation clinique « **I** » **intermédiaire** disparaît. Les lettres « S », « SFP » et « R » prennent désormais les significations suivantes :

« S » pour « **sensible à posologie standard** » ou plus simplement **sensible**. Une bactérie est catégorisée sensible à posologie standard lorsqu'il y a une probabilité élevée de succès thérapeutique à posologie standard de l'antibiotique ;

« SFP » pour « **sensible à forte posologie** ». Une bactérie sera catégorisée sensible à forte posologie lorsqu'il y a une forte probabilité de succès thérapeutique due au fait que l'exposition de la bactérie à l'antibiotique est augmentée par l'utilisation de posologies élevées ou si l'antibiotique est fortement concentré au site de l'infection ;

« R » pour « **résistant** ». Une bactérie est catégorisée résistante lorsqu'il y a une forte probabilité d'échec thérapeutique même en cas de forte exposition de la bactérie à l'antibiotique.

Le CLSI (OMS) commence à appliquer cette actualisation depuis 2019 de façon restreinte intéressant certains genres bactériens comme les entérobactéries et les C4G cefepime.

Parmi les principales recommandations : on peut citer les points suivants :

- Le milieu de culture doit permettre la croissance de nombreuses bactéries et il ne doit pas contenir **d'inhibiteurs des antibiotiques**. Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton.

La gélose de Mueller-Hinton + 5% de sang de mouton pour les streptocoques et les campylobactéries, de 10% de sang de cheval pour *Helicobacter pylori* .

- Les **teneurs en calcium et en magnésium** doivent être contrôlées, car des concentrations trop élevées inhibent l'action des aminosides, tétracyclines et polymyxines.

- La **teneur en thymidine** doit être fixe, car elle nuit à l'activité des sulfamides.

- Le **pH** influence l'activité de plusieurs antibiotiques, il doit être compris entre 7,2 et 7,4.

- Pour les méthodes de diffusion, la source d'antibiotique est en fait constituée par le disque et le cylindre de gélose sous-jacente. L'**épaisseur** de la gélose va donc conditionner la concentration de la source d'antibiotique et elle doit être de **4 mm**.

- Les **antibiotiques**, ainsi que les **disques** doivent être standardisés et 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.

- La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial et elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de McFarland).

- Une phase de pré-diffusion des antibiotiques peut conduire à l'obtention de zones d'inhibition plus importantes. Selon les pays, une pré-diffusion est ou non préconisée.

- La température et la durée d'incubation doivent être fixes. Pour la majorité des bactéries l'incubation est effectuée à 35-37 °C durant 18-24 heures dans une atmosphère normale.

- La technique doit être régulièrement contrôlée avec des souches de référence.

Les souches les plus couramment utilisées sont la souche ATCC 25922 de *Escherichia coli*, la souche ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* et la souche ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*.

d) E-test :

Est caractérisé par sa facilité et sa rapidité de réalisation mais surtout par sa précision dans la détermination de la CMI. Son principal inconvénient est son coût élevé.

Un gradient de concentrations d'antibiotique est obtenu dans une bandelette plastifiée. Il suffit de déposer l'une de celle-ci (une bandelette par antibiotique) à la surface d'une boîte de Pétriensemencée par la

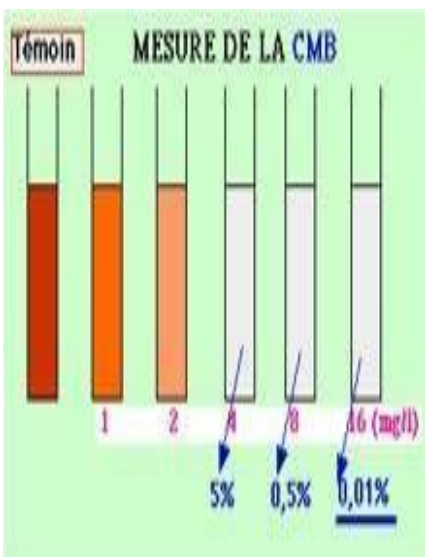
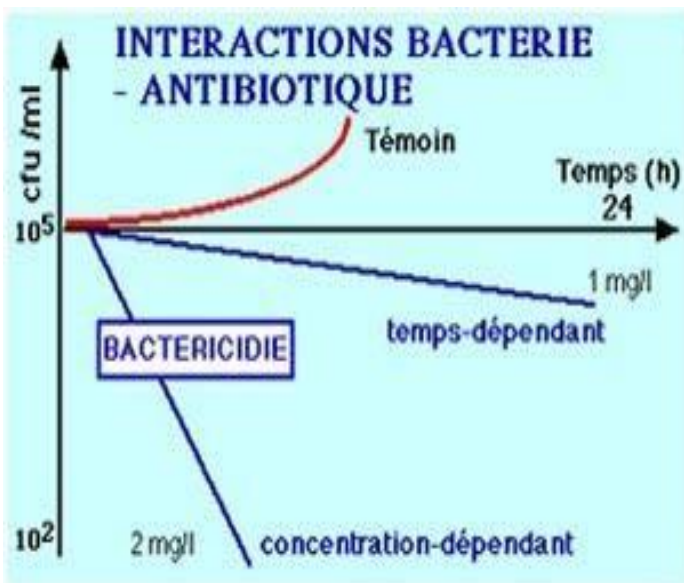
suspension de la bactérie à tester puis après un nuit d'incubation à 37°C dans une étuve, de lire directement la valeur de la CMI au niveau de la zone d'inhibition sous forme d'éclipse dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.

e) Antibiogrammes automatisés

Lecture interprétative de l'antibiogramme

Certains mécanismes de résistance s'expriment faiblement in vitro, alors qu'ils sont inscrits dans l'ADN bactérien. Cette lecture permet une bonne connaissance des phénotypes de résistance : systèmes automatisés dits 'experts'.

III/ BACTERICIDIE :



Détermination de la CMB par dilution,

1) Définition :

Mort des bactéries d'un inoculum

Un antibiotique bactéricide tue les bactéries à des concentrations thérapeutiques.

2) CMB :

La plus faible concentration en agent capable d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries d'un inoculum (< 0,01% de survivants).

Valeur indicatrice du **pouvoir bactéricide**.

3) Méthodes de détermination de la CMB:

La CMB est déterminée après une recherche de CMI en milieu liquide (technique de macrodilution ou de microdilution).

La technique consiste à ensemercer sur un milieu gélosé dépourvu d'antibiotique, une quantité définie de tous les tubes ne présentant pas de croissance visible et à dénombrer les bactéries survivantes. Ce nombre est comparé au nombre de bactéries initialement présentes dans l'inoculum.

N.B :

L'activité intrinsèque d'un antibiotique est définie par le rapport: CMB / CMI

CMB / CMI = 4	Antibiotique bactéricide
CMB / CMI = 8-16	Antibiotique bactériostatique
CMB / CMI = 32	Bactérie tolérante à l'antibiotique

V/ ETUDE DES ASSOCIATIONS BACTERICIDES DES ANTIBIOTIQUES :

L'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre effets principaux :

- Indifférence : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre ;
- Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- Synergie : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- Antagonisme : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Il existe de nombreuses méthodes pour étudier les effets d'une association, mais aucune d'elles n'est standardisée et elles sont généralement de mise en œuvre complexe. Le choix d'une méthode dépend donc des possibilités du laboratoire.

Technique utilisant une méthode de dilution en milieu liquide :

Détermination des CMB de chaque antibiotique seul et des associations à étudier.

Technique par diffusion :

Deux techniques qualitatives permettent une évaluation, théoriquement simple, des effets bactériostatiques des associations :

- Le placement rapproché de deux disques, à la surface d'un milieu gélosé, permet de détecter les synergies ou les antagonismes les plus nets.

Avant d'effectuer le test d'association, on mesure le rayon de chacune des zones d'inhibition.

Dans le test proprement dit, la distance entre les disques sera égale ou légèrement supérieure à la somme de ces rayons.

- La disposition à angle droit de deux bandes de papier filtre imprégnées des solutions d'antibiotique permet, après observation de l'angle formé par la rencontre des deux zones d'inhibition, de déterminer l'effet de l'association.

V/ AUTRES TESTS :

1) Etude du pouvoir bactériostatique et bactéricide du sérum :

Ces examens ont pour but de vérifier que le sérum (ou éventuellement tout autre liquide organique) d'un malade recevant une antibiothérapie a un pouvoir bactériostatique ou bactéricide sur la souche responsable de l'infection.

L'un des meilleurs examens de laboratoire permettant d'affirmer que le traitement administré est correct.

2) Dosage des antibiotiques dans les liquides biologiques :

Effectué pour les traitements

VI/ recherches complémentaires :TECHNIQUES PARTICULIERES :

1) Recherche de la résistance hétérogène du staphylocoque : métilino-résistance : SARM :

Dans les conditions standard de l'antibiogramme, seule une fraction de la population exprime la résistance aux pénicillines M. seules des conditions plus drastiques (incubation à 30°C ; milieu MH hyper salé) permettent une meilleure expression de la résistance. On dépose un disque d'oxacilline à la surface du milieu. La lecture se fait à 24 puis 48H. Une résistance hétérogène se manifeste par la présence de colonies de taille variable autour du disque.

La forte présence de SARM en milieu hospitalier rend leur recherche indispensable.

2) Techniques rapides de mise en évidence de la penicillinase :

Les enzymes inactivant les Bêta-lactamines peuvent être détectées par une méthode chromogénique :

Le principe repose sur l'utilisation d'une céphalosporine changeant de coloration après hydrolyse. La molécule la plus utilisée est la nitrocéfine qui, après action d'une bêta-lactamase, vire du jaune au rouge. Des disques de papier imprégnés de nitrocéfine sont commercialisés : Test Céfinase™.

3) Recherche de la bêtalactamase à spectre étendu « BLSE » :

La technique par diffusion est également utilisée dans le cadre de la recherche de Bêtalactamase à Spectre Étendu (BLSE). Pour cela on dépose sur la surface d'une gélose des disques de C3G (cefotaxime par exemple), et d'amoxicilline + acide clavulanique à 3cm (on peut les rapprocher à 2 cm) l'un de l'autre. Les BLSE sont des Bêtalactamases et sont donc inhibées par l'acide clavulanique. On observe alors une **synergie** d'action entre les deux antibiotiques, appelée "**bouchon de champagne**".

Techniques de bactériologie courante (6)

Recherche de β -lactamase

Détection de β -lactamase par test chromogénique :

Pour la détection de pénicillinase (TEM) de certaines espèces comme *Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella* ou *Staphylococcus*

Utilisation de disque avec substrat chromogénique (si hydrolyse → virage de couleur)

Ex. Nitrocéfine (Oxoïd), Céfinase (bioMérieux), Padac (Bio-Rad)



Détection de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) :

BLSE = Dérivées des pénicillinases capables d'hydrolyser la quasi-totalité des β -lactamines (sauf imipénème et céphamycines)
Souvent R associées (plasmide) aux aminosides, phénicolés

→ Utilisation du test de synergie entre inhibiteurs de β -lactamases et C₃G :

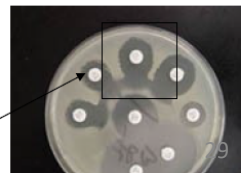


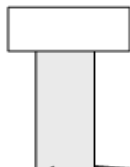
Tableau .1 Bactéries pouvant produire des bêta-lactamases.

Bactérie	Caractéristique de la ou des bêta-lactamase(s)
Entérobactéries	Très nombreuses enzymes naturelles ou acquises Pénicillinases ± sensibles à l'acide clavulanique, BLSE (bêta-lactamase à spectre étendu), céphalosporinases, carbapénémases...
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Céphalosporinase naturelle pouvant être hyperproduite par mutation, BLSE, carbapénémase
<i>Haemophilus influenzae</i>	Pénicillinase acquise plasmidique sensible à l'acide clavulanique
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Pénicillinase acquise plasmidique peu sensible à l'acide clavulanique
<i>Campylobacter spp.</i>	bêta-lactamase acquise fréquente, touchant les pénicillines et sensible à l'acide clavulanique
Staphylocoques	Pénicillinase plasmidique sensible à l'acide clavulanique

Réalisation de l'antibiogramme a partir de ces colonies isolées



Colonies
Isolées



Suspension en eau stérile, équivalente à un bouillon de culture de 18 heures, soit une opacité de 0,5 sur l'échelle de Mac Farland.



DILUTION

1/100 pour la méthode par inondation ou pour certains antibiotiques (*écouvillonnage*)

INONDATION



ECOUVILLONNAGE



3 à 5 mL d'inoculum
sur boîte de Pétri +
gélose Mueller-Hinton

- 1) Tremper l'écouvillon
dans la suspension
- 2) Egoutter
- 3) Epuiser 3 fois 60°

↓
Réaspirez l'excédent
(jeter à la Javel)

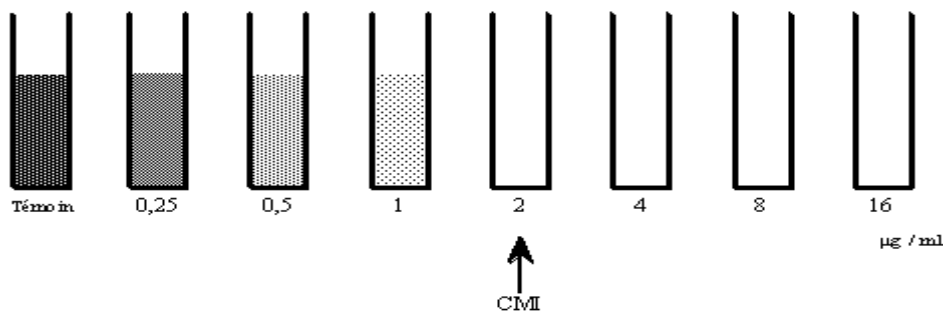
↓
SECHAGE
(Boîte à l'envers 15 minutes à 37°)

↓
DEPOT DES DISQUES

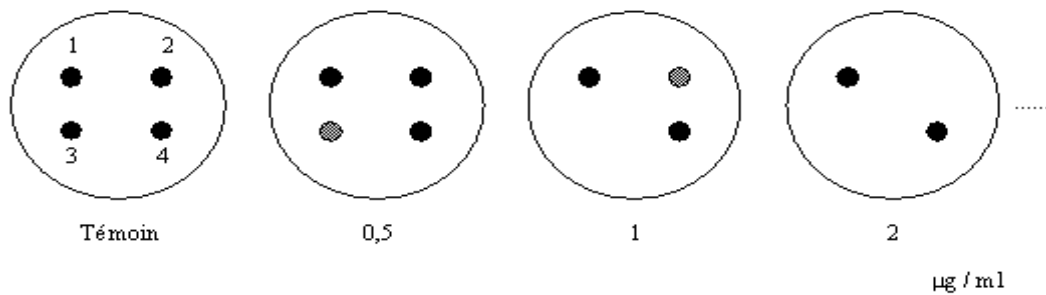
↓
INCUBATION
(24 heures à 37°C)

↓
LECTURE

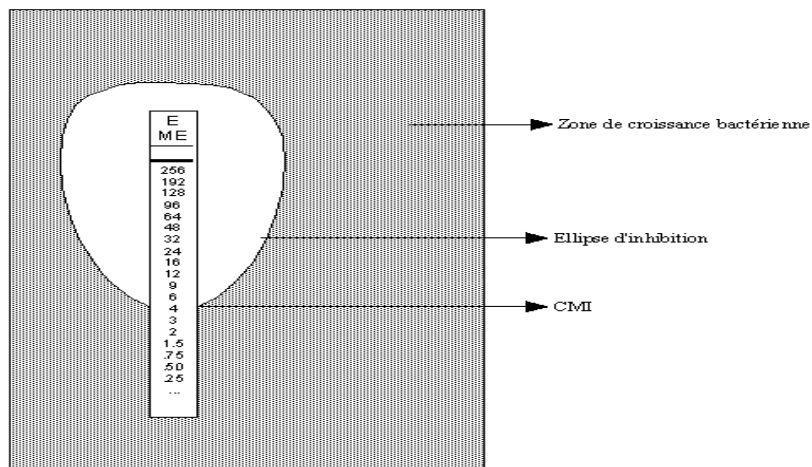
Protocole de l'antibiogramme



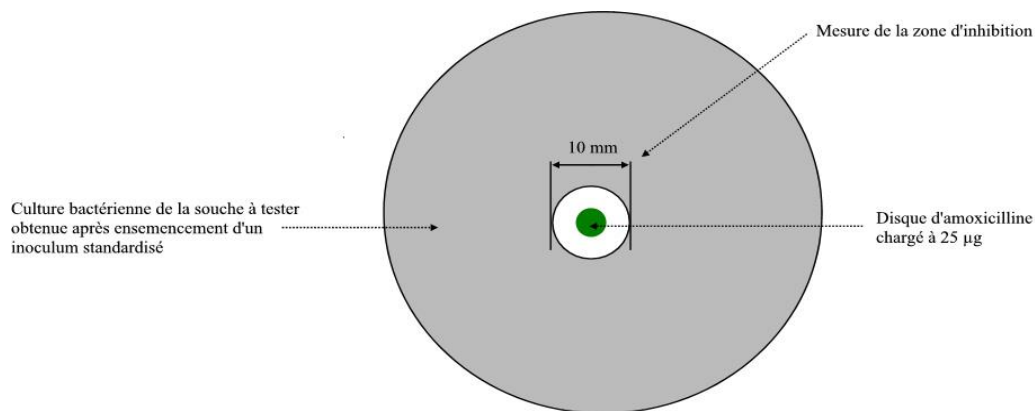
Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

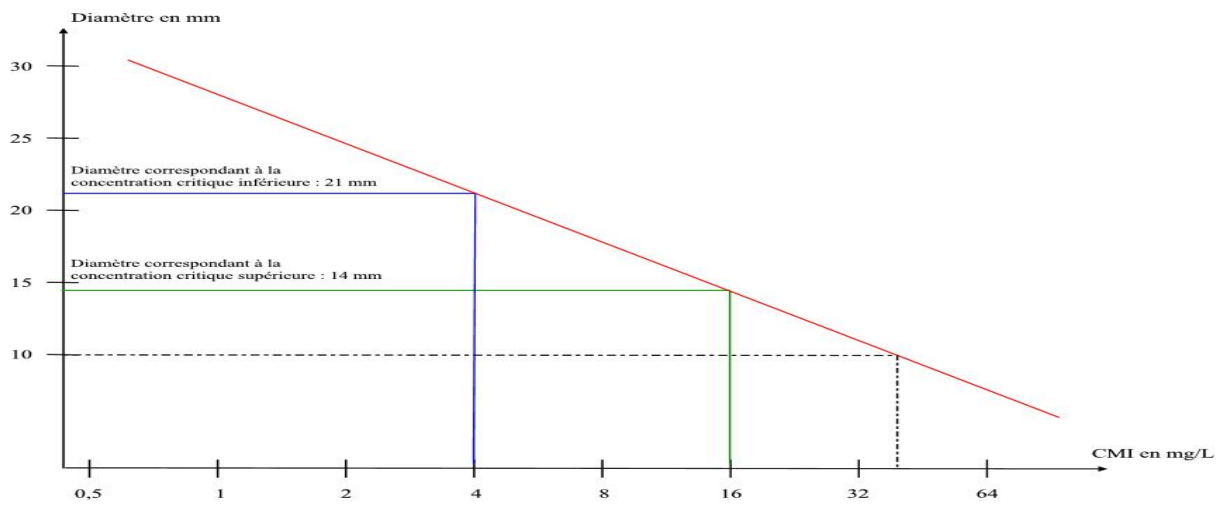


Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé

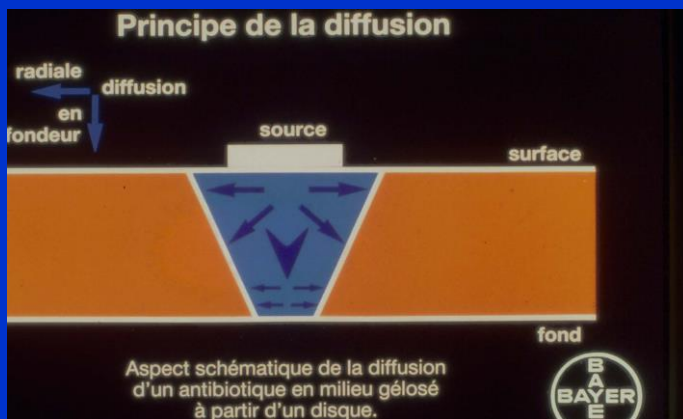


Principe du Etest.

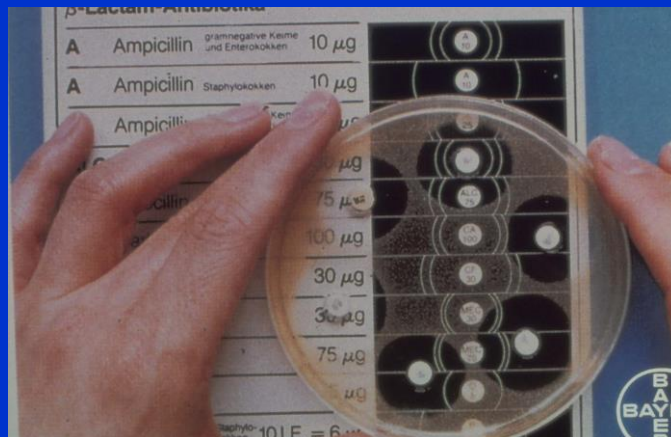


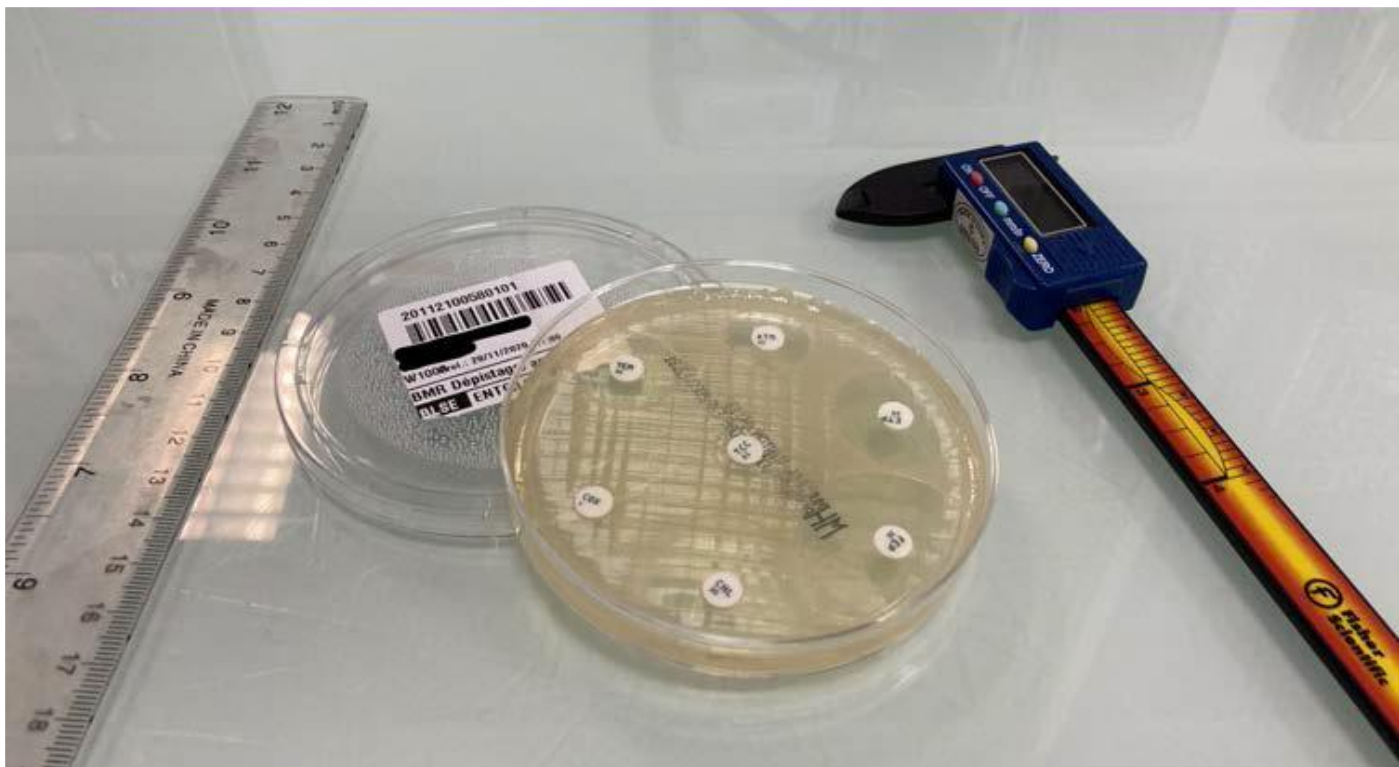


Principe de la lecture d'un antibiogramme



Technique Diffusion





Mesure du diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un *pied à coulisse* ou d'une règle selon les recommandations.

Fin.