

Chapitre 9

Sensibilité aux agents antimicrobiens (méthode de diffusion en milieu gélosé)

La méthode de diffusion en milieu gélosé présentée dans ce chapitre a été standardisée par le Comité national des normes pour laboratoires cliniques (NCCLS) et elle est exécutée exactement comme l'indique le protocole ci-après. Elle peut prévoir avec certitude l'efficacité *in vivo* du médicament en question. Mais, tout changement dans la méthode risque de rendre les résultats non valables. C'est la raison pour laquelle, si les laboratoires manquent de ressources pour réaliser la procédure de diffusion en gélose exactement telle qu'elle est décrite, il leur est vivement conseillé d'envoyer les souches à d'autres laboratoires pour les tests de sensibilité aux agents antimicrobiens.

A. Divers aspects à prendre en compte pour la méthode de diffusion en gélose

Dès lors que la résistance aux antimicrobiens augmente partout dans le monde, il devient de plus en plus important de suivre la résistance aux antimicrobiens de *Shigella* et *V. cholerae* O1 et O139. En revanche, comme le traitement par agents antimicrobiens de l'infection à *E. coli* O157 s'est montré inefficace et non sans risque, sauf dans des cas de cystite et de pyélonéphrite, la détermination du type de sensibilité aux antimicrobiens pour *E. coli* O157 n'est généralement pas très utile.

Voir les chapitres 3 et 5 pour un débat sur le choix des antimicrobiens pour le traitement de la dysenterie et du choléra. Les essais avec *Shigella*, *V. cholerae* et *E. coli* O157:H7 et certains antimicrobiens peuvent être à l'origine d'une mauvaise interprétation quand les résultats *in vitro* ne sont pas corrélés à l'activité *in vivo*. Par exemple, *Shigella* spp. est généralement sensible aux aminoglycosides (gentamicine, kanamycine, etc.) dans la méthode de diffusion en gélose mais le traitement avec ces médicaments n'est souvent pas efficace. Une concertation sur les caractéristiques spéciales pour le test de sensibilité de *V. cholerae* est présentée dans la section B ci-après. Le tableau 9-1 indique les antimicrobiens proposés pour le test de résistance de *Shigella* et de *V. cholerae*.

B. Procédure de diffusion en gélose

La Figure 9-1 reprend la méthode de diffusion en gélose pour le test de sensibilité. Les fournitures de laboratoire nécessaires pour cette méthode pour *Shigella* et *V. cholerae* sont indiquées dans les Annexes A et B.

1. Gélose de Mueller-Hinton

La gélose de Mueller-Hinton est le seul milieu de culture solide pour l'étude de sensibilité qui ait été validé par le NCCLS. Il est recommandé de toujours utiliser la gélose Mueller-Hinton pour les épreuves de diffusion en gélose, en fonction

des directives internationales et du NCCLS. Étant donné que la manière dont la gélose Mueller-Hinton est préparée peut affecter les résultats de la procédure de diffusion par disque, il est très important de se reporter à la section C ci-après pour des instructions sur la préparation et le contrôle de qualité de ce milieu.

Tableau 9-1 : Antimicrobiens proposés pour le test de sensibilité de *Shigella* et *V. cholerae* O1 et O139

Antimicrobiens pour <i>Shigella</i>	Antimicrobiens pour <i>V. cholerae</i>
Sulfaméthoxazole-triméthoprim	Sulfaméthoxazole-triméthoprim
Chloramphénicol	Chloramphénicol
Ampicilline	Furazolidone
Acide nalidixique ^a	Tétracycline ^b

^a Si résistant à l'acide nalidixique, tester avec ciprofloxacine.

^b Les résultats du disque de tétracycline sont utilisés pour prédire également la sensibilité à la doxycycline.

2. Préparation du standard de turbidité McFarland

Un standard de McFarland 0,5 doit être préparé et un contrôle de la qualité sera effectué avant de commencer le test de sensibilité (voir section C). S'il est hermétiquement fermé et gardé dans le noir, le standard peut être conservé pendant 6 mois. Le standard McFarland est utilisé pour ajuster la turbidité de l'inoculum pour le test de sensibilité.

3. Préparation de l'inoculum

Chaque culture doit êtreensemencée en stries sur une gélose non inhibitrice (gélose au sang, gélose d'infusion de cœur et de cerveau ou gélose trypticase soja) pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation d'une nuit à une température comprise entre 35 et 37°C, choisir 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse ou une aiguille d'inoculation et les transférer dans un tube de solution salée stérile (voir section C) ou dans un bouillon non sélectif (bouillon de Mueller-Hinton, bouillon d'infusion de cœur ou trypticase soja). Émulsionner une quantité suffisante de culture bactérienne dans la solution salée ou le bouillon pour que la turbidité avoisine celle du standard McFarland 0,5. Cette comparaison peut être faite plus facilement si les tubes sont observés contre une fiche de papier blanc avec lignes noires (voir Figures 9-2 et 9-3). Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de solution saline stérile ou de bouillon.

La méthode de culture peut aussi être utilisée pour préparer l'inoculum. Quatre ou cinq colonies issues de la culture développée pendant une nuit sur la gélose sont inoculées dans le bouillon (bouillon de Mueller-Hinton, infusion de cœur ou bouillon trypticase soja). Incuber le bouillon à 35°C jusqu'à ce qu'il devienne trouble et ensuite ajuster la turbidité à la bonne densité.

Sensibilité aux agents antimicrobiens (méthode de diffusion en milieu gélosé)

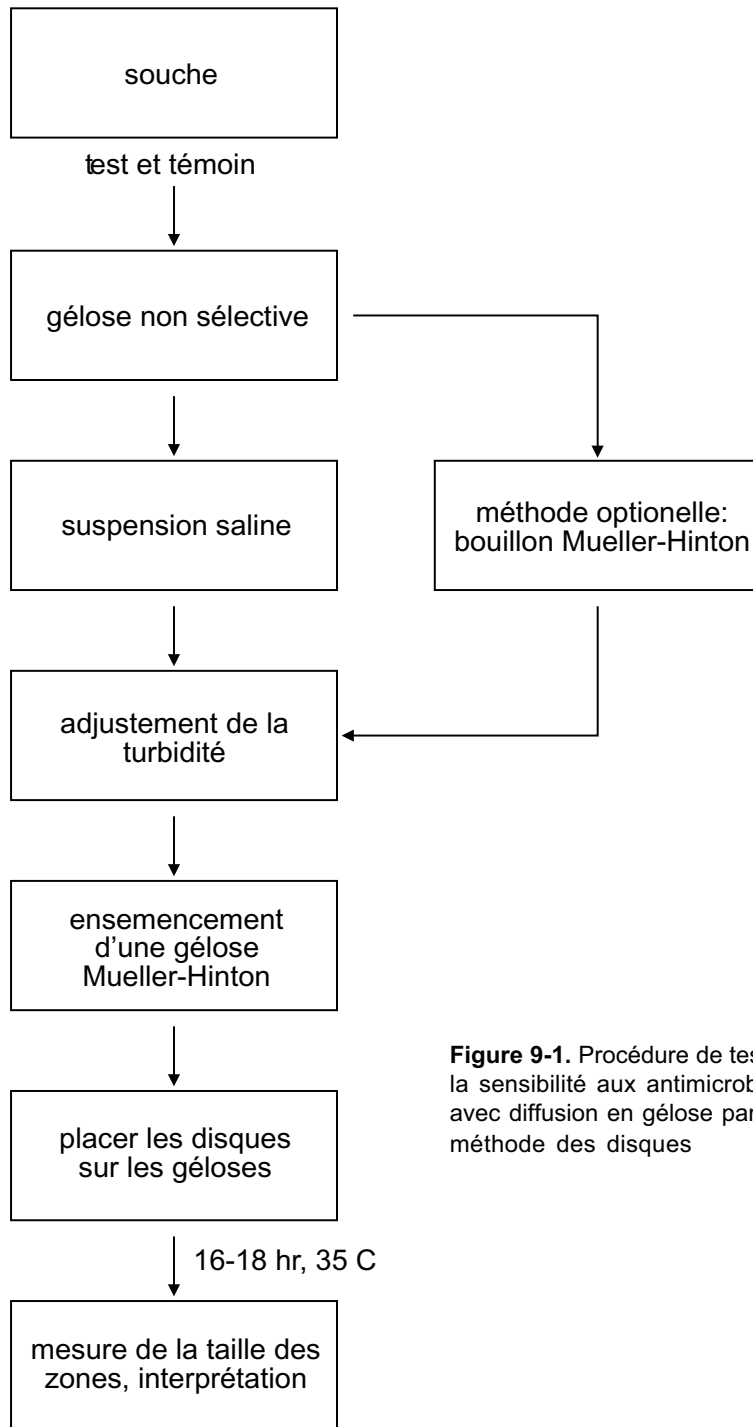


Figure 9-1. Procédure de test de la sensibilité aux antimicrobiens avec diffusion en gélose par la méthode des disques

Sensibilité aux agents antimicrobiens (méthode de diffusion en milieu gélosé)

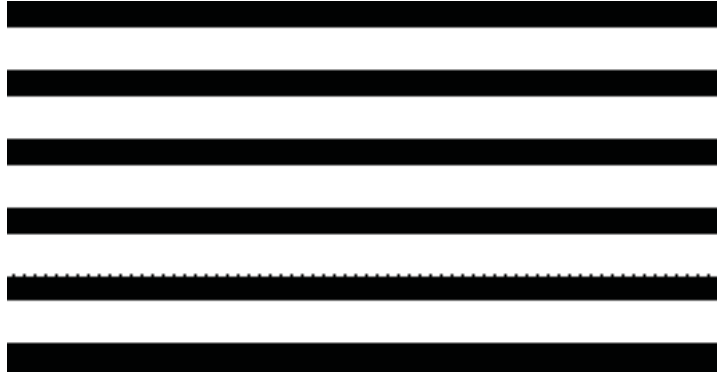


Figure 9-2. Lignes de fond pour voir la turbidité de l'inoculum



Figure 9-3. Comparaison de McFarland 0,5 avec la suspension de l'inoculum. De gauche à droite, les tubes sont le standard McFarland 0,5, *E. Coli* ATCC 25922 ajusté à la turbidité McFarland 0,5 et la solution saline non inoculée.

4. Procédure d'inoculation

Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, tremper un écouvillon de coton dans la suspension. Presser fermement contre la paroi intérieure du tube juste au-dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever les liquides excédentaires. Étaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60°C après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. (Figure 9.4). Enfin, écouvillonner partout autour du bord de la surface de la gélose.

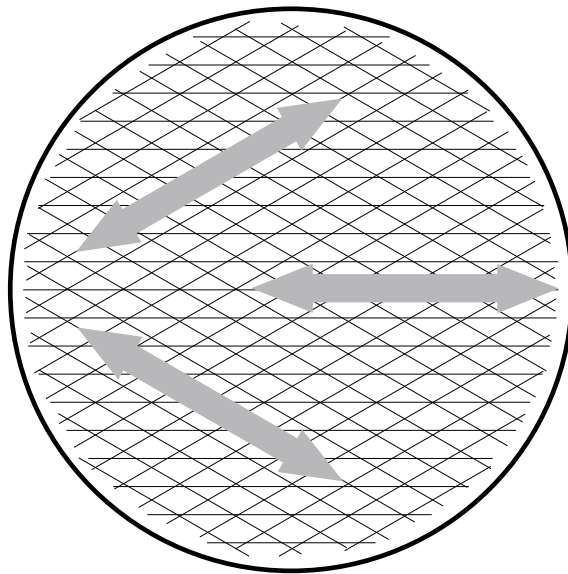


Figure 9-4. Plaque de Mueller-Hinton à ensemer en stries avec l'écouvillon sur toute la surface du milieu à trois reprises en faisant tourner la boîte de Pétri d'un angle de 60°C après chaque application.

5. Disques imprégnés d'antibiotiques

Les réserves de disques imprégnés d'antibiotiques doivent être gardées au réfrigérateur (4°C). Une fois les disques retirés du réfrigérateur, laisser à température ambiante les récipients fermés pendant environ une heure pour permettre à la température de s'équilibrer. Cela limite la condensation qui se produit quand l'air entre en contact avec les disques. Si on utilise un distributeur, son couvercle doit fermer et parfaitement il doit être conservé au réfrigérateur. Il faut également le laisser se réchauffer à température ambiante avant l'utilisation.

Tableau 9-2. Normes d'interprétation des tailles des zones d'inhibition pour les *Enterobacteriaceae* avec des disques d'antimicrobiens choisis

Agent antimicrobien	Efficacité du disque (µg)	Diamètre de la zone (mm)			Limites de diamètre de la zone (mm) pour <i>E. coli</i> ATCC 25922
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	
Chloramphénicol ^{a,b}	30	≤12	13-17	≥18	21-27
Ampicilline ^a	10	≤13	14-16	≥17	16-22
Furazolidone ^c pour <i>V. cholerae</i>	100	<18	-	≥18	22-26
Sulfaméthoxazole-triméthoprime ^a	1.25 / 23.75	≤10	11-15	≥16	24-32
Tétracycline ^a	30	≤14	15-18	≥19	18-25
Ciprofloxacine ^{a,d}	5	≤15	16-20	≥21	30-40
Acide nalidixique ^a	30	≤13	14-18	≥19	22-28
Acide nalidixique ^c pour <i>V. cholerae</i>	30	<19	-	≥19	

^a Source : National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1998.

^b Utiliser ces résultats avec prudence car le test de diffusion en gélose par la méthode des disques peut mener à une mauvaise classification d'un grand nombre d'organismes (taux élevé d'erreurs mineures).

^c Critères d'interprétation fondés sur des études multicentriques. Les critères n'ont pas été établis pour *V. cholerae* par NCCLS.

^d Tailles des zones valides pour l'interprétation des résultats de diffusion en gélose par la méthode des disques pour *Shigella* et *Enterobacteriaceae*. Cependant, les tailles des zones pour *V. cholerae* n'ont pas été établis par NCCLS.

Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri dès que possible mais pas plus de 15 minutes après l'inoculation. Placer les disques individuellement avec des pinces stériles ou avec un distributeur mécanique et les placer doucement contre la gélose. En général, il ne faut pas placer plus de 12 disques sur une boîte de 150 mm et pas plus de 4 disques sur une boîte de 100 mm. Cela évite le chevauchement des zones d'inhibition et une erreur possible de mesure. Certains antimicrobiens du disque diffusent presque immédiatement et par conséquent, une fois que le disque entre en contact avec la surface de la gélose, il ne doit plus être déplacé.

6. Lecture et interprétation des résultats

Une fois que les disques sont placés sur la gélose, il faut incuber la boîte à 35°C pendant 16 à 18 heures. Après une nuit d'incubation, le diamètre de chaque zone d'inhibition (diamètre du disque compris) est mesuré en mm et noté (Figures 9-5, 9-6 et 9-7). Les mesures peuvent être prises avec une règle sur le fond de la boîte sans enlever le couvercle. Avec les sulfamides et le sulfaméthoxazole-triméthoprime, un léger développement apparaît à l'intérieur de la zone d'inhibition. Dans ce cas, on ne tiendra pas compte de ce léger développement (inhibition 80%) et le diamètre de la zone sera mesuré dans les marges de développement important. Les zones d'inhibition doivent être comparées au tableau d'interprétation des tailles des zones (voir Tableau 9-2) et notées en fonction des catégories suivantes : sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) pour chaque antibiotique testé.

Les colonies se développant dans la zone claire d'inhibition peuvent représenter des variants résistants ou un inoculum mixte. Pour ces colonies, il faudra également déterminer le diamètre d'inhibition qui sera obtenu en mesurant et en doublant la distance comprise entre les colonies les plus proches du disque et le centre du disque. Le diamètre de la zone claire extérieure doit également être mesuré et l'interprétation sera notée pour chaque diamètre. Les colonies à l'intérieur de la zone seront prélevées, ré-isolées, ré-identifiées et re-testées par l'épreuve de diffusion en gélose pour confirmer les résultats précédents. La présence de colonies dans une zone d'inhibition peut prédire une éventuelle résistance du microorganisme à cet agent.

7. Contrôle de qualité

Pour vérifier l'exactitude des résultats des tests de résistance, il est important d'inclure au moins une souche de référence (ATCC 25922 est la souche de référence *E. coli* utilisée pour le test de résistance des *Enterobacteriaceae*). Comparer les diamètres de zone obtenus pour ATCC 25922 avec les limites publiées par le NCCLS (voir Tableau 9-2 pour les diamètres des zones d'inhibition pour ATCC 25922). Si les zones observées avec les souches de référence sont en dehors des limites prévues, alors le technicien de laboratoire devra envisager les sources possibles d'erreur.



Figure 9-5. Résultats de la procédure de diffusion en gélose par la méthode des disques. Cet souche de *Shigella* est résistante au sulfaméthoxazole-triméthoprimine et s'étend jusqu'au disque dont la zone est notée 6 mm.

Les tests de sensibilité sont affectés par des variations du milieu, la charge de l'inoculum, le temps d'incubation, la température et d'autres facteurs. Le milieu utilisé peut être une source d'erreur s'il n'est pas conforme aux directives recommandées par le NCCLS. Par exemple, une gélose contenant des quantités excessives de thymidine ou de thymine peut inverser les effets inhibitoires des sulfamides et du triméthoprimine, d'où des zones d'inhibition plus petites et moins distinctes. Par conséquent, les organismes peuvent sembler résistants à ces médicaments alors qu'en fait, ils ne le sont pas. Si la profondeur de la gélose n'est pas de 3 à 4 mm ou si le pH n'est pas compris entre 7,2 et 7,4, la diffusion des agents antimicrobiens ou l'activité des médicaments peuvent être affectées.

Si l'inoculum n'est pas une culture pure ou s'il contient une concentration de bactéries qui n'est pas identique au standard de McFarland, les résultats du test de sensibilité seront affectés. Par exemple, un organisme résistant pourra apparaître sensible si l'inoculum est trop léger. De plus, si les colonies de la

gélose au sang sont utilisées pour préparer une suspension par la méthode directe d'inoculation, un effet antagoniste du triméthoprimé ou des sulfamides peut apparaître et il pourra se produire un développement des bactéries à l'intérieur des zones d'inhibition autour des disques de triméthoprimé-sulfaméthoxazole, alors qu'en fait les souches sont sensibles.

Conserver précieusement les disques imprégnés d'antibiotiques et ne pas les utiliser au-delà de la date de péremption indiquée. Une diminution de la taille de la zone d'inhibition autour de la souche de référence peut être le signe d'une baisse d'efficacité du disque.

De plus, tel que mentionné ci-dessus, le test de sensibilité de certaines bactéries à des agents antimicrobiens pourra donner des résultats induisant en erreur car les résultats *in vitro* ne correspondent pas forcément à l'activité *in vivo*. Les exemples en sont donnés avec les spectres étroits et larges des céphalosporines et des aminoglycosides testés contre *Shigella* spp. (voir chapitre 3) et l'érythromycine testée contre *V. cholerae* (voir section C ci-après).

C. Éléments particuliers dont on tiendra compte lors des tests de sensibilité de *V. cholerae*

La méthode de diffusion en gélose est la technique la plus couramment utilisée pour tester la sensibilité mais les critères d'interprétation de la zone pour *V. cholerae* O1 et O139 ont été uniquement établis pour la l'ampicilline, le chloramphénicol, les sulfonamides, la tétracycline et le sulfaméthoxazole-triméthoprimé. On s'est rendu compte que les résultats de la méthode par diffusion par disque ne sont pas exacts pour *V. cholerae* avec l'érythromycine et la doxycycline et il est donc préférable de ne pas tester ces agents avec cette méthode. Utiliser les résultats du disque de tétracycline pour prévoir la sensibilité à la doxycycline. Si elle est sensible à la tétracycline, la souche le sera également à la doxycycline. Il n'existe pas actuellement de méthode qui puisse déterminer exactement la sensibilité à l'érythromycine.

La fiabilité des résultats de la diffusion par disque pour d'autres antimicrobiens (ciprofloxacine, furazolidone et acide nalidixique) n'a pas été validée. La diffusion par disque peut être utilisée pour détecter la résistance à la ciprofloxacine en utilisant les critères d'interprétation pour *Enterobacteriaceae* comme normes provisoires des tailles de zone. Des limites préliminaires sont proposées pour l'épreuve avec le furazolidone et l'acide nalidixique pour *V. cholerae* (voir Tableau 9-2). Les résultats doivent être interprétés avec prudence quand on utilise la méthode de diffusion par disque pour ces antimicrobiens. Si les tailles des zones pour ces médicaments entrent dans la fourchette intermédiaire, elles doivent être interprétées comme pouvant être résistantes.

D. Préparation et contrôle de qualité des milieux et des réactifs

1. Gélose Mueller-Hinton

(Note : Il existe plusieurs formulations commerciales de la gélose Mueller-Hinton. Ce milieu ne devrait pas être préparé à partir d'ingrédients individuels car cela peut diminuer la qualité. La formule déshydratée de cette gélose que l'on trouve dans le commerce fait l'objet d'un contrôle attentif de la qualité avant d'être mis en vente.)

Préparer le milieu de Mueller-Hinton en suivant les instructions du fabricant. Après autoclavage, refroidir la gélose à 50°C, verser le milieu sur une épaisseur de 4 mm soit dans des boîtes de Pétri de 15 x 100 mm de diamètre (environ 25-30 ml par boîte) soit dans des boîtes de pétri de 15 x 150 mm de diamètre (environ 60-70 ml par boîte). Utiliser plus ou moins de gélose affectera les résultats de sensibilité. Si l'épaisseur de la gélose est supérieure à 4 mm, des souches pourront apparaître faussement résistantes. À l'inverse, avec une épaisseur de gélose inférieure à 4 mm, des souches pourront apparaître faussement sensibles.

Des boîtes de Pétri fraîchement préparées peuvent être utilisées le même jour ou conservées au réfrigérateur (2 à 8°C) pendant deux semaines. Si les boîtes de Pétri ne sont pas utilisées dans les 7 jours suivant la préparation, il faut les envelopper dans un sac en plastique pour minimiser les risques d'évaporation. Juste avant l'emploi, s'il existe une humidité excessive sur la surface, mettre les boîtes de Pétri dans un incubateur (35 à 37°C) jusqu'à ce que l'humidité s'évapore (généralement entre 10 et 30 minutes). Ne pas ouvrir les boîtes, car le milieu se contamine facilement.

Contrôler la qualité de chaque nouveau lot avant leur utilisation en faisant un test avec des souches standard d'*E. coli* ATCC 25922 et/ou de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ces dernières sont utilisées pour les tests d'*Enterobacteriaceae* et les aérobies Gram positives respectivement. Le pH de chaque nouveau lot de Mueller-Hinton devra se situer entre 7,2 et 7,4. S'il se trouve en dehors de cette fourchette, il ne faut pas ajuster le milieu pH en ajoutant de l'acide ou une base. Il faut jeter les boîtes de Pétri et en préparer de nouvelles. Si le pH de tous les lots est trop élevé ou trop faible, le lot entier de milieu déshydraté doit être renvoyé au fabricant.

2. Standards de turbidité (McFarland)

Les standards de turbidité McFarland 0,5 sont disponibles auprès de divers fabricants. Ou alors, on peut préparer une solution en ajoutant 0,5 ml de dihydrate de chlorure de baryum ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à 1,175 % (p/v) à 99,5 ml d'acide sulfurique à 1 %. La solution est ensuite mise dans des tubes de test identiques à ceux qui ont été utilisés pour préparer la suspension de l'inoculum. Fermer hermétiquement avec de la cire ou de la paraffine ou tout autre moyen évitant l'évaporation. Réfrigérer ou conserver à température ambiante (22-25°C) dans

Sensibilité aux agents antimicrobiens (méthode de diffusion en milieu gélosé)

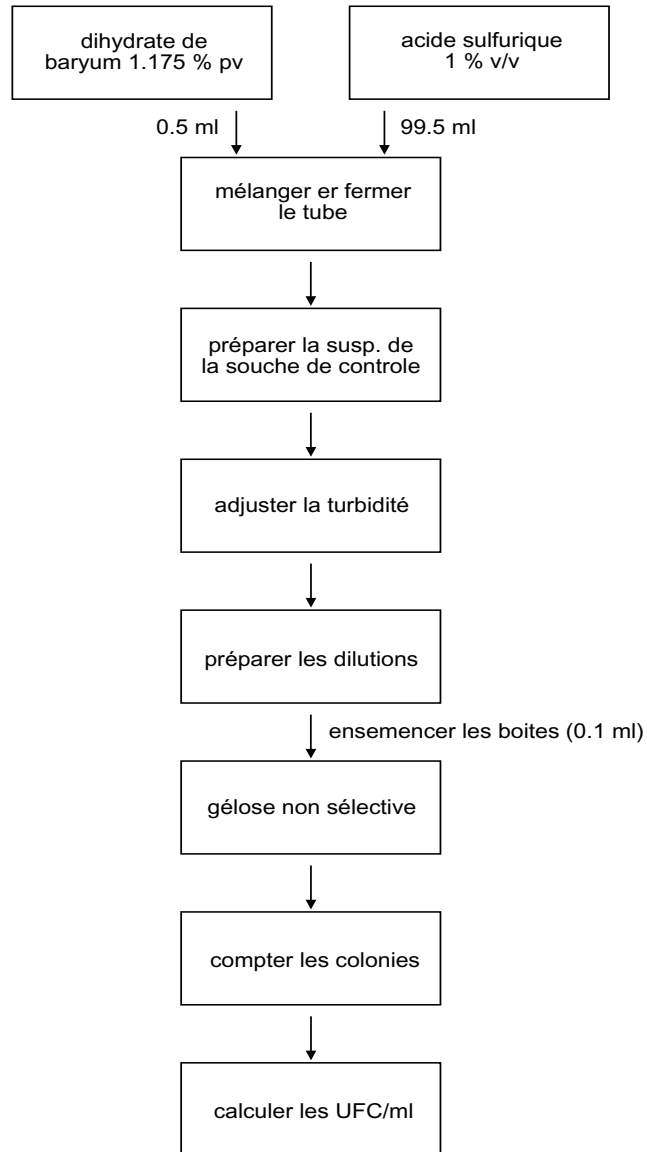


Figure 9-8. Procédure pour la préparation et le contrôle de qualité du standard McFarland 0,5

