**TD 06 : Antibiogramme**

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 gélosé. Il a pour but de guider le clinicien dans le choix d’un antibiotique pour traiter une infection bactérienne, d’exploitées les données pour la surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques et une indication supplémentaire pour l’identification du germe par la mise en évidence de résistances naturelles.

L’interprétation se fait aujourd’hui avec des systèmes experts qui suivent les recommandations du comité de l’antibiogramme par exemple CASFM (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie) ou bien CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

**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 Pétri 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.

2/**Paramètres importants**

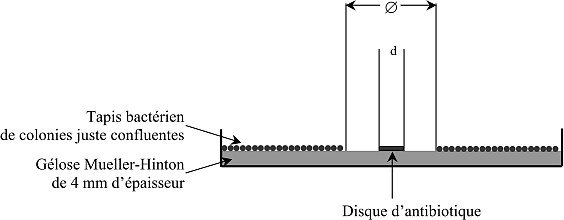
La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

**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 (Ca2+, Mg2+) inhibent l'action des polymyxines.

Un pH trop acide augmente l'activité des ß-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 Pétri 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.



**Figure 1 :** Schéma en coupe d’une gélose Mueller-Hinton utilisée pour un antibiogramme standard

**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 01).

**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 |

**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. Elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de McFarland).

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 108 bactéries par ml.

**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/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 (Figure 02). Les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée. Les diamètres des zones d’inhibition mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par les instances en vigueur (CLSI, anciennement le Comité national des normes de laboratoire clinique ou NCCLS) afin de classer la bactérie dans l’une des catégories Résistant, Intermédiaire, Sensible (Tableau 01). Ces critères de catégorisation clinique selon les diamètres critiques sont remis à jour périodiquement par le CLSI.

**4/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.

**Figure 02 :** Antibiogramme par méthode de diffusion sur gélose MULLER-HINTON

**Tableau 1 :** interprétation de taille de zones d’inhibition selon CLSI:



**5/La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

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.

Elle s’exprime en général en μg/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.

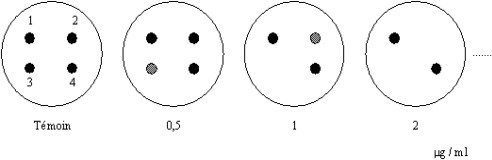
- En milieu liquide (figure 3), l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.



**Figure 03** : La concentration minimale inhibitrice

La CMI de la souche testée est de 2 μg/mL (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'oeil nu).

- En milieu solide (figure 4), l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose est ensemencée 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. Elle permet également de mesurer la concentration inhibitrice 99% (concentration qui inhibe la croissance de 99% des cellules d'une souche bactérienne).

**Figure 4:** Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé

Une boîte de Pétri 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.