

EVALUATION D'UN NOUVEAU SYSTÈME D'INOCULATION STANDARDISÉ ET D'UN MILIEU RAPIDE POUR L'ANTIBIOGRAMME DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS



D. LEYSSENE (1), A.C. JAOUEN (1), J.C. GHASSIA (2), S. DIAZ (3), E. LOPEZ (3), P. CARRETERO (3), C. CUREL(3)



(1) Département de bactériologie, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de la Côte Basque, Bayonne, France / dleysse@ch-cotebasque.fr
 (2) Unité de Microbiologie, Service de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France / abiomed7@gmail.com
 (3) i2a, Montpellier, France / i2a@i2a.info

RÉSUMÉ

Objet de l'étude :

Le système INOCLIC pour la préparation et la standardisation de l'inoculum bactérien et le milieu rapide MHR-SIR ont été testés pour la réalisation d'antibiogrammes de *Staphylococcus aureus*. Notre étude a été effectuée avec soixante-cinq souches cliniques de *S.aureus*, comprenant quinze souches de *S.aureus* résistantes à la métilcilline (MRSA) selon deux protocoles différents.

Méthodes :

A : le système Inoclic (i2a, Montpellier, France) comparé à la suspension standard à 0,5 Mac Farland diluée au 1/10ème selon les normes du CA-SFM.

B : deux milieux de culture différents : un milieu Mueller-Hinton classique (MH, i2a, Montpellier, France) comparé à un milieu Mueller Hinton « rapide » (MHR-SIR, i2a, Montpellier, France).

Résultats obtenus :

Les résultats obtenus en **A** avec l'Inoclic sont comparables à ceux obtenus selon les normes du CA-SFM : la concordance entre les deux méthodes est égale à 99,75 % et le coefficient de corrélation est égal à 0,9495. En **B** avec le milieu MHR-SIR et l'Inoclic, après 6 heures d'incubation, nous avons observé une concordance de 99,17 % par rapport aux données obtenues avec le milieu classique MH et selon les normes du CA-SFM après 18h d'incubation. De plus, les 15 souches de SARM ont été détectées en seulement 6 heures à la fois par le test de sensibilité à la Céfoxitine et au Moxolactam.

MATÉRIEL & MÉTHODE

L'Inoclic est un système conçu pour préparer et standardiser l'inoculum de l'antibiogramme en milieu solide directement à partir d'une culture bactérienne (1, 2). L'Inoclic est une tige calibrée qui collecte une quantité déterminée de bactéries correspondant à la charge souhaitée d'inoculum pour l'antibiogramme en milieu solide. L'utilisation de l'Inoclic est très simple : l'opérateur pique une colonie à angle droit sur la gélose, la traverse, et retire ensuite l'Inoclic en faisant le mouvement inverse. Des colonies de même morphologie peuvent être piquées à partir de la surface ; les éléments des colonies prélevées sont ensuite mis en suspension dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique pour se conformer aux exigences du CA-SFM en matière de charge bactérienne.

Soixante-cinq souches cliniques de *S.aureus*, comprenant quinze SARM (23% des souches) ont été utilisées pour comparer l'antibiogramme réalisé à partir de la méthode Inoclic et selon les normes du CA-SFM.

Les suspensions bactériennes ont été ensemencées sur les géloses à l'aide d'un écouvillon SirScanSwab (i2a, Montpellier, France). Pour chaque suspension, un antibiogramme a été réalisé sur un milieu MH (i2a, Montpellier, France), comprenant 31 disques antibiotiques (SirScan discs, i2a, France) incluant : Pénicilline, Oxacilline, Céfoxitine, Moxolactam, Gentamicine, Tobramycine, Kanamycine, Streptomycine, Tétracycline, Minocycline, Tygécycline, Nitrofurantoïne, Chloramphénicol, Erythromycine, Lincomycine, Clindamycine, Pristinamycine, Dalfofpristine, Linézolide, Triméthoprime+sulfaméthoxazole, Péfloxacin, Ofloxacin, Lévofoxacin, Ciprofloxacine, Moxifloxacine, Acide fusidique, Rifampicine, Fosfomycine, Vancomycine, Teicoplanine, Mupirocine.

Méthode :

Les 65 antibiogrammes ont également été réalisés sur des milieux MHR-SIR (i2a, Montpellier, France). MHR-SIR est un milieu contenant une base Mueller-Hinton, permettant d'obtenir des résultats d'antibiogrammes en 6 heures (5). Tous les antibiogrammes ont été lus deux fois : après 6 et 18 heures d'incubation.

L'utilisation de l'Inoclic est obligatoire pour réaliser l'inoculum d'un antibiogramme fait sur MHR-SIR. La lecture du MHR-SIR doit être faite à l'aide d'un lecteur automatique SirScan (i2a, Montpellier, France) ; le lecteur utilise un algorithme afin d'analyser si la croissance du micro-organisme est suffisante et un système expert qui vérifie la fiabilité de la lecture.

Le lecteur automatique SirScan 2000 Automatic (i2a, Montpellier, France) a été utilisé pour réaliser l'incubation et la lecture des diamètres d'inhibition de tous les antibiogrammes réalisés (Fig. 1).

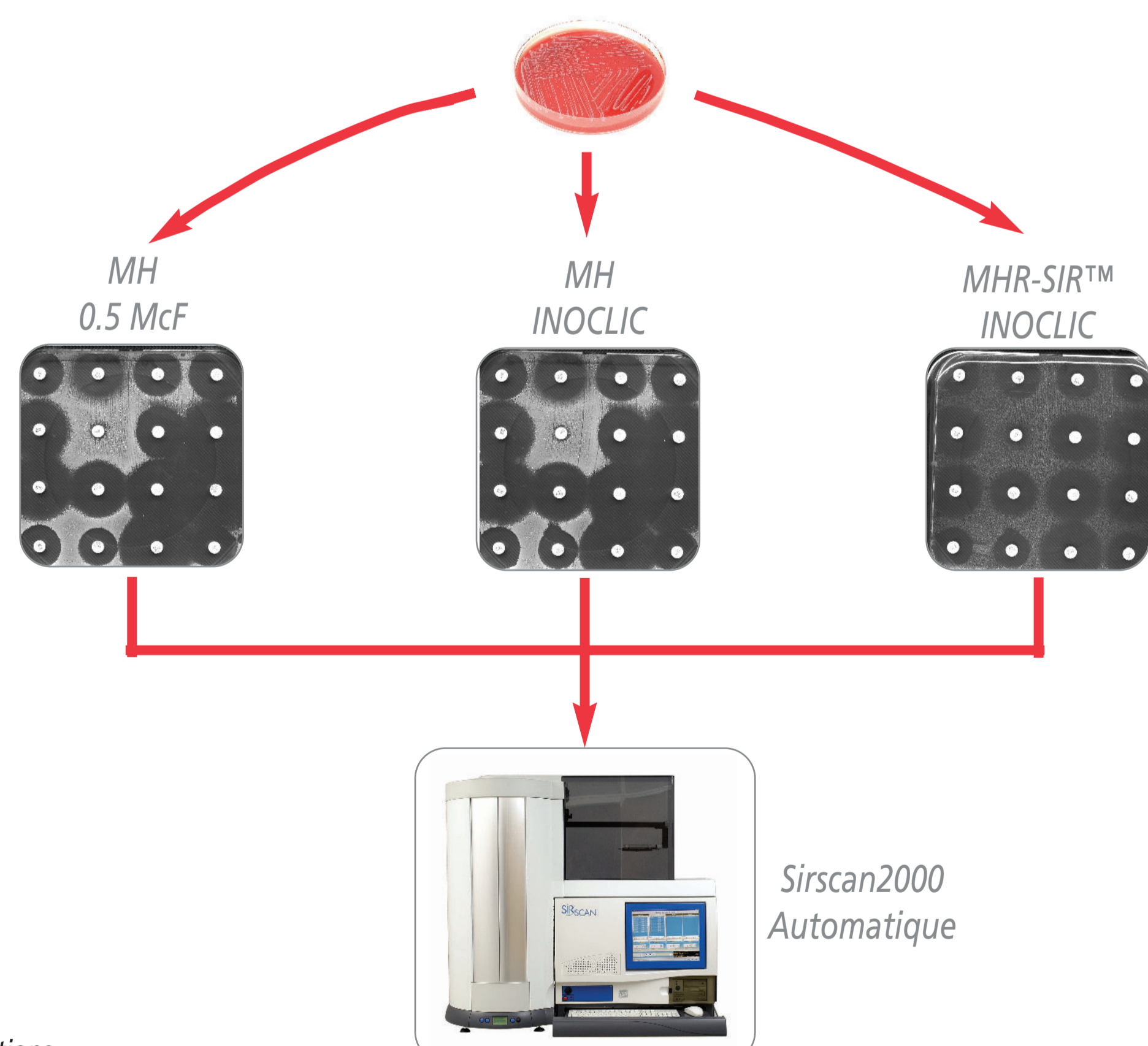


Fig.1: schéma des manipulations

Traitement des données : pour ce faire, nous avons utilisé un tableur Excel et défini trois types de discordances :

- ➔ "Différence mineure" a été utilisé quand une molécule était catégorisée « Sensible » par une méthode et « Intermédiaire » par l'autre méthode ; ou « Intermédiaire » par une méthode et « Résistante » par l'autre méthode.
- ➔ "Différence majeure" a été utilisé quand une molécule était catégorisée « Résistante » avec l'Inoclic ou le milieu MHR-SIR, et « Sensible » avec la méthode du CA-SFM ou le milieu MH.
- ➔ "Différence très majeure" a été utilisé quand une molécule était catégorisée « Sensible » avec l'Inoclic ou le milieu MHR-SIR, et « Résistante » avec la méthode du CA-SFM ou le milieu MH.

CONCLUSION

Selon les résultats observés, l'utilisation du système Inoclic pour la préparation et la standardisation de l'inoculum pour les antibiogrammes de *S.aureus* peut être recommandée en pratique quotidienne.

Le milieu MHR-SIR réduit le temps d'obtention de l'antibiogramme des souches de *S.aureus* de 18 à 6 heures, y compris pour les SARM.

RÉSULTATS

1- Comparaison de l'Inoclic avec la méthode CA-SFM :

Les diamètres d'inhibition des 31 disques antibiotiques pour les 65 souches de *S.aureus* testées ont été mesurés avec les deux méthodes. Pour les 2014 diamètres d'inhibition obtenus, le coefficient de corrélation des diamètres s'élevait à 0,9495. Nous avons observé 0,10 % de « Différence mineure », aucune « Différence majeure », 0,15 % de « Différence très majeure » et 99,75 % de concordance entre l'Inoclic et la méthode de référence. Le coefficient de corrélation des diamètres s'élevait à 0,9495 (Fig. 2-4).

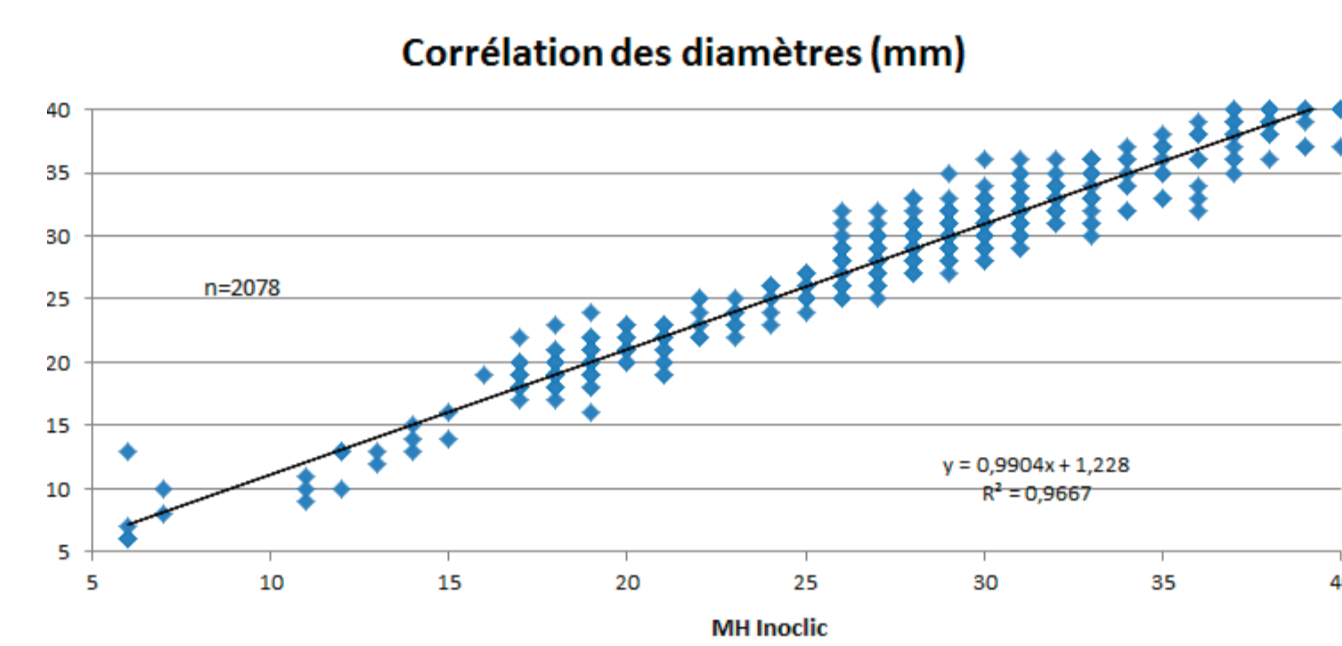


Fig. 2 : Corrélation entre les diamètres d'inhibition obtenus avec l'Inoclic (axe des abscisses) et la méthode CA-SFM (axe des ordonnées). Le coefficient de corrélation R² est égal à 0,9495.

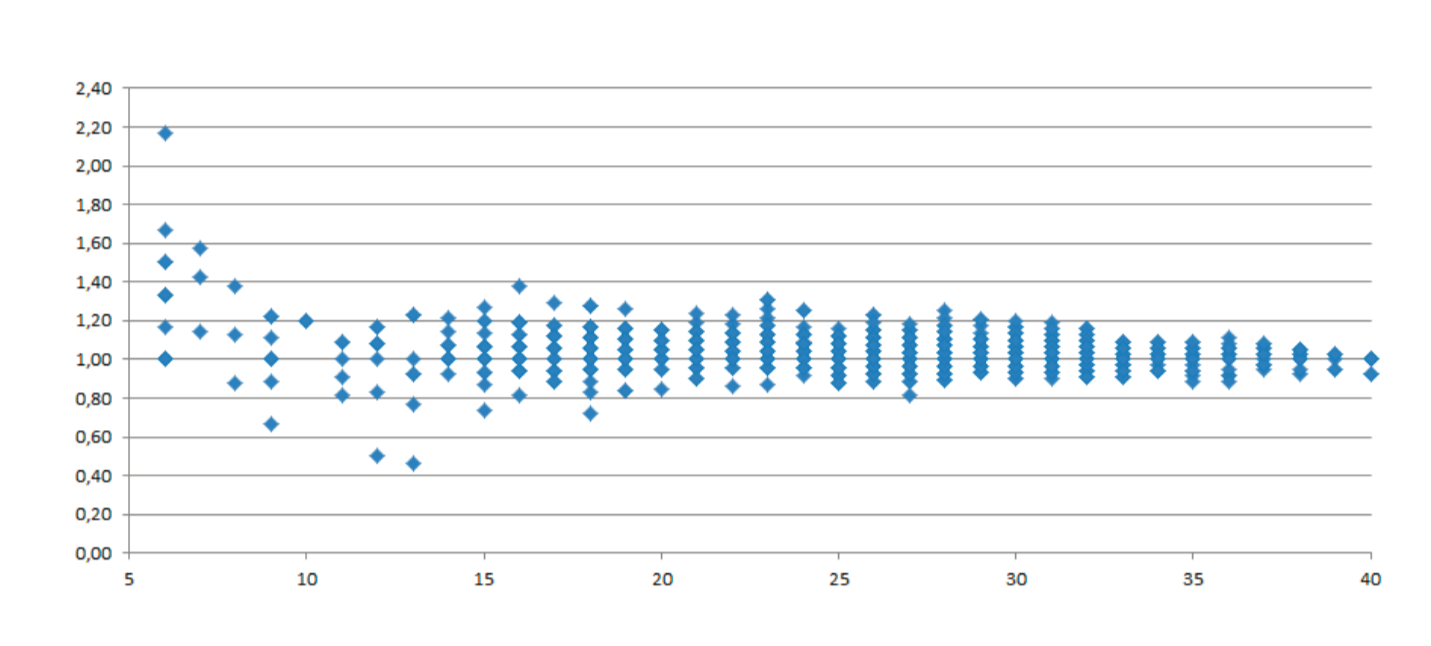


Fig. 3 : Diagramme des ratios entre les résultats obtenus avec l'Inoclic et la méthode CA-SFM. L'axe des abscisses représente les diamètres d'inhibition et l'axe des ordonnées le ratio entre les deux méthodes. Chaque point bleu correspond au ratio Inoclic/0,5McF.

Une majorité de ratios était comprise entre 1,2 et 0,8, illustrant la bonne concordance entre l'inoculum réalisé avec l'Inoclic et celui obtenu avec la méthode CA-SFM. Les ratios les plus élevés ont été observés avec les plus petits diamètres de zones. Ces résultats étaient prévisibles dans la mesure où une différence de seulement 1 ou 2 mm sur un faible diamètre d'inhibition peut suffire pour obtenir un ratio supérieur à 1,2.

2- Comparaison des antibiogrammes obtenus avec un milieu MH et un milieu MHR-SIR

Pour les antibiogrammes réalisés en milieu rapide MHR-SIR après 6h d'incubation, nous avons observé 0,49% de « Différence mineure », 0,05% de « Différence majeure », 0,29% de « Différence très majeure » et 99,17% de concordance avec les résultats obtenus en milieu classique MH (après 18h d'incubation) ensemencé avec la méthode CA-SFM (Fig. 4).

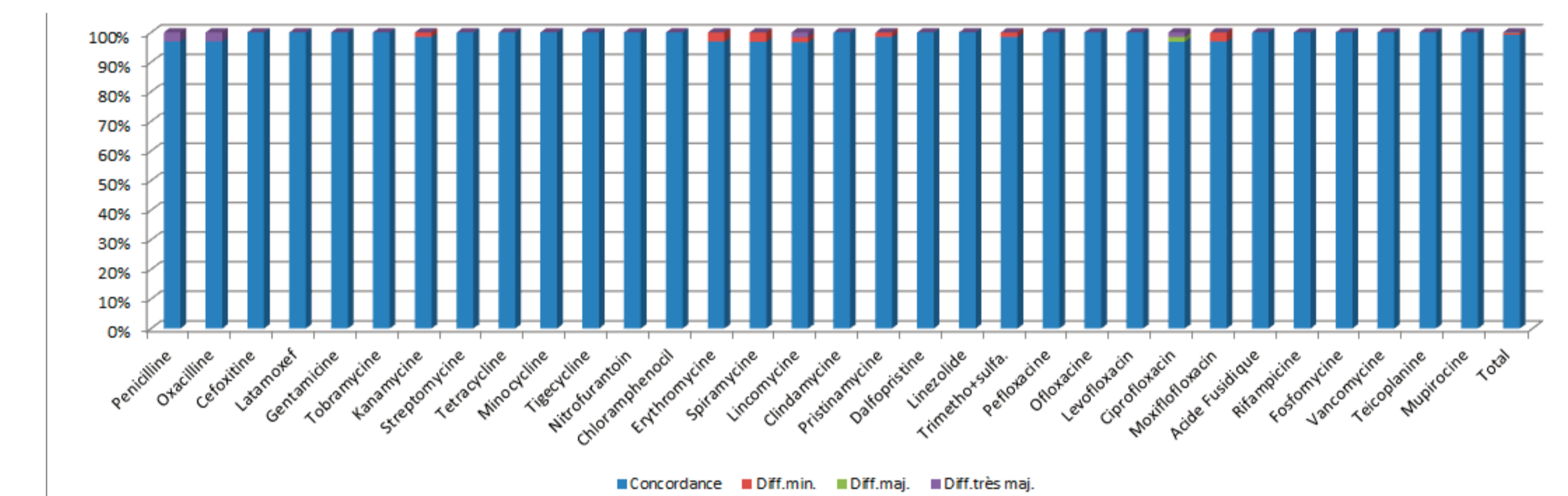


Fig. 4 : Résultats de la corrélation entre les antibiogrammes réalisés sur MHR-SIR après 6h d'incubation et MH après 18h d'incubation. Les différentes molécules testées sont représentées sur l'axe des abscisses et le pourcentage de corrélation est représenté en ordonnées.

Après 6h d'incubation, pour les 2041 diamètres d'inhibition il a été observé 17 discordances, soit 0,83 % repartis en :

- **10 « Différences mineures »** pour 7 molécules : Kanamycine (1 cas), Erythromycine (2 cas), Spiramycine (2 cas), Lincomycine (1 cas), Pristinamycine (1 cas), Moxifloxacine (2 cas), Triméthoprime+sulfaméthoxazole (1 cas)
- **1 « Différence majeure »** a été observée pour la Ciprofloxacine avec une mesure à 2 mm du seuil de part et d'autre.
- **6 « Différences très majeures »** pour 4 molécules : Pénicilline (2 cas), Oxacilline (2 cas), Lincomycine (1 cas) et Ciprofloxacine (1 cas).

Pour la Pénicilline, une erreur initiale de catégorisation n'a aucune conséquence dans la mesure où un test à la Céfnase est nécessaire pour confirmer le résultat. Les deux cas observés de « fausse sensibilité » à l'Oxacilline correspondaient à des souches présentant des diamètres diminués à la fois pour la Céfoxitine et le Moxolactam. Ces souches auraient donc été « correctement » catégorisées résistantes lors de l'interprétation finale de l'antibiogramme. La ciprofloxacine a été classée dans un seul cas "S" avec le milieu MHR-SIR (diamètre à 22 mm) et "R" avec le milieu MH (diamètre à 21 mm) soit une différence de seulement 1 mm qui fait néanmoins changer la molécule de catégorisation clinique. La différence de diamètre observée pour la lincomycine était de 8 mm.

- Une parfaite concordance entre les données obtenues avec le MHR-SIR après 6h d'incubation et avec le MH après 18h d'incubation a été observée pour 22 molécules (Céfoxitine, Moxolactam, Gentamicine, Tobramycine, Streptomycine, Tétracycline, Minocycline, Tigécycline, Nitrofurantoïne, Chloramphénicol, Clindamycine, Dalfofpristine, Linézolide, Péfloxacin, Ofloxacin, Lévofoxacin, Fosfomycine, Acide fusidique, Rifampicine, Vancomycine, Teicoplanine, Mupirocine) permettant un traitement adapté plus rapide qu'avec le milieu antibiogramme habituel. Concernant la Céfoxitine et le Moxolactam, toutes les souches de *S. aureus* sensibles à la Métilcilline (SASM) ont été correctement détectées après seulement 6h d'incubation et présentaient un diamètre ≥ 27 mm pour la Céfoxitine et ≥ 24 mm pour le Moxolactam. Les 15 souches de SARM ont également toutes été détectées après 6h d'incubation (diamètre < 25 mm pour la Céfoxitine et < 23 mm pour le Moxolactam).

DISCUSSION

Le système Inoclic donne des résultats équivalents à la méthode recommandée par le CA-SFM pour la préparation et la standardisation de l'inoculum des antibiogrammes de *S.aureus* en milieu MH. Ce système étant simple et rapide d'utilisation, il peut être utilisé en pratique quotidienne. Les résultats observés dans ce travail confirment des résultats précédemment décrits (1,2). D'autre part, avec le milieu MHR-SIR les résultats sont en excellente corrélation avec la méthode standard sur milieu MH. Il a cependant l'avantage de rendre des résultats après 6h d'incubation, y compris pour les souches résistantes de type SARM, avec en outre une parfaite concordance pour des molécules permettant d'orienter le traitement de 1ère ou 2ème intention des infections à staphylocoques (céfoxitine, moxolactam, glycopeptides, linézolide...). Ces résultats obtenus après seulement 6h d'incubation contribuent à accélérer la prise en charge thérapeutique du patient.

BIBLIOGRAPHIE

- 1-Ros A. et al. (1999) Comparison of the use of a cost effective method with Two Standardized methods to direct performance and repeatable susceptibility testing in a Microbiological laboratory. Poster 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
- 2-Honderlick P, Baheux S, Vignon D, Ghnassia J.C., (2004) Practical application of internal quality control year for susceptibility testing using agar sirscan2000 automatic. International Journal of Antimicrobial Agents 2004, 24S page S190
- 3-Recommandations 2012 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)
- 4-Abello K. et al. (2003) Evaluation d'un milieu rapide pour l'antibiogramme en diffusion, le MHR-SIR (i2a). Poster 23ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse
- 5-Leyssene D. et al. (2012) Evaluation of a new inoculum standardization device and a fast susceptibility testing medium for *Staphylococcus aureus* antimicrobial susceptibility testing. Poster 112th general meeting of the American Society of Microbiology.