

## Susceptibilité d'une souche à un antibiotique évaluée par la méthode par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques)

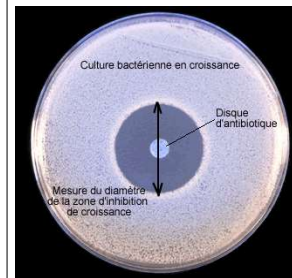
### 1. Présentation de la méthode

Il s'agit d'une méthode de routine utilisée pour les analyses de biologie médicale. C'est une méthode beaucoup plus simple à mettre en œuvre que la méthode de détermination de CMI par dilutions en milieu gélosés ou par dilutions en milieu liquide et qui permet de tester plusieurs antibiotiques sur une boîte unique de culture. C'est une méthode « secondaire », elle a été étalonnée en regard de résultats de référence obtenus par méthode standard de dilutions en milieu gélosé. C'est une méthode peu précise mais dont la précision suffit aux exigences médicales.

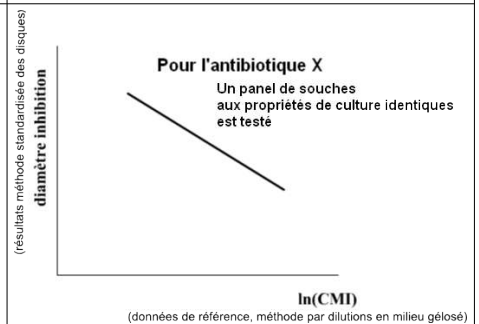
Une boîte de Pétri contenant un volume standardisée de milieu standardisé agarosé est inoculée en surface avec une souche S selon un mode opératoire standardisé qui conduirait à un « tapis » de colonies après l'incubation en absence d'antibiotique.

Un disque de papier buvard de diamètre standardisé et imprégné d'une charge standardisée d'un antibiotique X est déposé sur la boîte après inoculation et juste avant incubation. L'incubation est réalisée à 35°C pendant 18 heures (pour les souches classiques).

Après l'inoculation et le dépôt du disque chargé en antibiotique sur la boîte, il y a cinétique de croissance des bactéries et cinétique de diffusion de l'antibiotique depuis le disque dans la gélose. Le résultat en fin de culture est l'apparition éventuelle d'un disque de non culture visible autour du disque d'antibiotique. Le diamètre de la zone de non culture visible est d'autant plus grand que la souche S est sensible à l'antibiotique X. La zone de non culture visible est appelée zone d'inhibition.



Il existe une corrélation entre le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI. Ces corrélations sont établies grâce à de nombreuses mesures avec des panels de souches présentant les mêmes capacités à cultiver et dont les CMI pour l'antibiotique X ont été établies par la méthode de référence de dilutions en milieu gélosé. On peut construire des fonctions de régression diamètre de la zone de non culture visible =  $f(\ln(\text{CMI}))$ . Ces fonction sont parfois appelée « fonction de correspondance diamètre d'inhibition/CMI » (scattergram en anglais). L'allure générale est présentée par la figure à droite. Attention, les dispersions sont très élevées.



(Voir aussi figure annexe a)

*Nota bene : La standardisation est fondamentale ! : épaisseur de milieu, charge inoculum, charge des disques ... La standardisation est donnée par exemple par l'EUCAST (european committee on antimicrobial susceptibility testing). Site = <http://www.eucast.org>.*

Dans le monde médical on utilise des valeurs de CMI critiques déterminant la possibilité ou pas d'un traitement médical efficace.

- S - Susceptible, standard dosing regimen : A microorganism is categorised as "Susceptible, standard dosing regimen", when there is a high likelihood of therapeutic success using a standard dosing regimen of the agent.
- I - Susceptible, increased exposure : A microorganism is categorised as "Susceptible, Increased exposure" when there is a high likelihood of therapeutic success because

exposure to the agent is increased by adjusting the dosing regimen or by its concentration at the site of infection.

- R - Resistant: A microorganism is categorised as "Resistant" when there is a high likelihood of therapeutic failure even when there is increased exposure.

La corrélation CMI/susceptibilité S,R,I et la corrélation CMI/diamètre d'inhibition permettent de construire des tables corrélant diamètre d'inhibition et susceptibilité S,R,I. Voir <https://www.eucast.org/newsiandr/> et [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

## 2. Mode opératoire EUCAST pour réaliser la méthode de diffusion en milieu gélosé avec des souches classiques

- Milieu de Mueller Hinton, épaisseur 4 mm, séchage après coulage indispensable.
- Inoculum standard EUCAST (standardisation européenne) : préparer, à partir du prélèvement de colonies, une suspension de trouble 0,5 sur l'échelle McFarland.
- Ensemencement standard à l'écouvillon. Pour les bactéries Gram-, plonger l'écouvillon dans la suspension inoculum, enlever l'excès d'inoculum par pression douce et rotation sur les bords du tube, écouvillonner régulièrement toute la surface de la gélose 3 fois en tournant de 60° entre chaque reprise. A utiliser dans les 15 minutes après inoculation. Pour les bactéries Gram+, même mode opératoire mais sans « essorage » de l'écouvillon.
- Dépôts de disques d'antibiotiques à charge standardisée (dans les 15 minutes).
- Incubation dans les 15 minutes qui suivent le dépôt des disques, boîte renversée à la température adéquate (35°C, 16-20h pour les souches classiques).

(Tous les détails à : [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/))

## 3 Manipulations proposées

A l'aide de la documentation qui précède et qui présente les détails de la méthode et à l'aide des diverses données en annexe :

- tester la susceptibilité d'une des souches fournies pour les 6 antibiotiques proposés à l'aide de la méthode par diffusion en milieu gélosé ;
- isoler la souche testée à partir de la suspension inoculum réalisée pour l'antibiogramme ;
- réaliser le même antibiogramme mais avec une suspension inoculum beaucoup, beaucoup trop concentré pour montrer qu'un inoculum mal standardisé (trop concentré) conduit à des diamètres modifiés (plus petits). Ou alors réaliser le même antibiogramme mais en coulant seulement 2 mm d'épaisseur de milieu ce qui modifiera le gradient de diffusion de l'antibiotique et donc les diamètres (plus grands).
- Enfin, tester la pureté de la souche utilisée et vérifier son appartenance au genre Enterococcus (coques gram positifs anaérobies aérotolestants, cultivant en 24-48h sur milieu ordinaire additionné de bile et hydrolysant l'esculine (activité bêta-glucosidase).

## 4 Compte-rendu

- Détails techniques nécessaires et suffisants dans le cadre du travail proposé.
- Résultats obtenus et commentaires (utiliser le tableau de données ci-après).

### Bibliographie :

- Documentation EUCAST 2017 disponible sur [www.eucast.org](http://www.eucast.org) notamment les liens [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/) et [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/calibration\\_and\\_validation/](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/calibration_and_validation/) et [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/QC/v\\_10.0\\_EUCAST\\_QC\\_tables\\_routine\\_and\\_extended\\_QC.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_10.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf)
- Documentation SFM Comité de l'Antibiogramme : *CASFMV2\_SEPTEMBRE2018.pdf*
- *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Volume 52, Issue 3*, July 2005, Pages 235-24
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272332/>

**Figure annexe a**

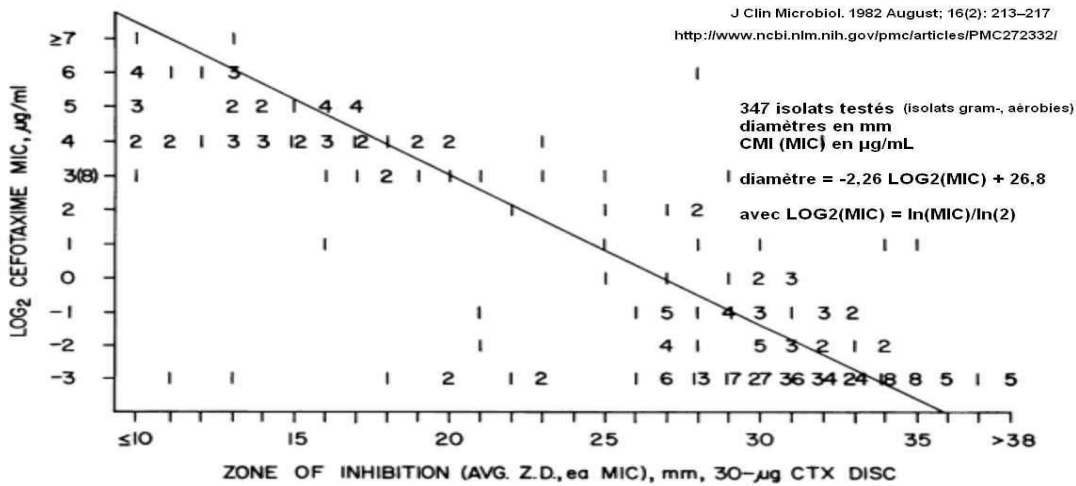


FIG. 1. Correlation between CTX agar dilution MIC values and zones of inhibition obtained with a 30-µg CTX diffusion disk. Numbers reflect distribution of individual zone size responses (rounded to nearest millimeter). Z.D., Zone diameter.

**Tableau de données pour l'analyse des résultats**

La CMI de l'ampicilline à l'encontre des 2 souches disponibles a été réalisée par la méthode des dilutions en milieu solide et a donné : *Enterococcus faecalis* CIP 76117, CMI ampicilline = 0,8 mg/L ; *Enterococcus faecium* StI, CMI ampicilline = 0,4 mg/L

CMI et diamètres de zone d'inhibition		
Disque antibiotique et charge	Valeurs pour <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 <small>D'après <a href="https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_10.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf">https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_10.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf</a></small>	Données pour les limites R et S <small>D'après SFM Comité de l'antibiogramme sept. 2018 et/ou Eucast Clinical breakpoint Tables v11.0</small>
Ampicilline (2 µg)	Une CMI de 1 mg/L (0,5 à 2) ↔ 18 mm (15 à 21 mm)	8-4 mg/L / 8-10 mm
Erythromycine (15 µg)		0,5-4 mg/L / 23-14 mm
Chloramphenicol (30 µg)		8-16 mg/L / 18-13 mm
Gentamycine (30 µg)	Une CMI de 8 mg/L (4 à 16) ↔ 15 mm (12 à 18 mm)	Résistance naturelle standard : CMI ≤128 mg/L et un diamètre de zone ≥8 mm.
Vancomycine (5 µg)	Une CMI de 2 mg/L (1 à 4) ↔ 13 mm (10 à 16 mm)  12 mm ↔ 4 mg/L	4 mg/L / 12 mm
Teicoplanine (30 µg)	Une CMI de 0,5 mg/L (0,25 à 1) ↔ 18 mm (15 à 21 mm)	2 mg/L / 16 mm

R : résistance au sens médical, S : susceptible au schéma posologique standard.