



## Recherche pour la référence

### Amélioration du référentiel vétérinaire français (CA-SFM vétérinaire) pour la validation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé

M. Haenni (1), E. Jouy (2), E. Morignat (3), J.-Y. Madec (1)

(1) Anses, Laboratoire de Lyon, Unité Antibiorésistance et virulence bactériennes

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané, Unité Mycoplasmiologie-bactériologie

(3) Anses, Laboratoire de Lyon, Unité Épidémiologie

M. Haenni, E. Jouy, E. Morignat, J.-Y. Madec (2011). Amélioration du référentiel vétérinaire français (CA-SFM vétérinaire) pour la validation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé, EuroReference, No. 5, ER05-11R01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero5/PN5001.htm>



L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé est validé par des contrôles de qualité interne définis dans les recommandations du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Ces contrôles sont principalement dédiés à la médecine humaine et sont peu adaptés au diagnostic vétérinaire. L'étude multicentrique décrite ici propose deux nouvelles souches de référence, *Streptococcus uberis* CIP 103219 et *Pasteurella multocida* CIP 103286, ainsi que de nouveaux intervalles de diamètres d'inhibition et un panel plus large d'antibiotiques testés pour *Escherichia coli* CIP 76.24 et *Staphylococcus aureus* CIP 76.25 afin de permettre une meilleure fiabilisation des résultats rendus par les laboratoires d'analyses vétérinaires.

#### Bactéries résistantes et antibiogramme

Lorsqu'une bactérie pathogène est identifiée dans un prélèvement biologique, qu'il soit d'origine humaine ou animale, il est utile au praticien de connaître le profil de résistance aux antibiotiques de cette bactérie afin d'orienter au mieux son choix thérapeutique.

Il existe diverses méthodes pour déterminer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique donné. L'une des plus utilisées par les laboratoires de diagnostic français (en particulier, de diagnostic vétérinaire), pour des raisons de vitesse d'exécution, de coût et de souplesse dans le choix des antibiotiques, est l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé. Cette méthode permet également de visualiser certaines images de synergie ou d'antagonisme entre antibiotiques, qui sont d'une aide précieuse pour l'identification des mécanismes de résistance (Figure 1A). Des disques pré-imprégnés des antibiotiques à tester sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum standardisé d'une culture bactérienne pure et préalablement identifiée. Après incubation, des zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture sont visibles autour des disques. Le diamètre de la zone d'inhibition observée pour chaque couple bactérie-antibiotique est alors comparé aux diamètres critiques définis dans les recommandations du CA-SFM [1].

Le CA-SFM publie un référentiel français, à l'origine strictement dédié à la médecine humaine ([www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org)). La comparaison des diamètres lus avec les seuils critiques définis permet de déterminer le comportement d'une bactérie vis-à-vis de l'antibiotique testé et de classer cette dernière comme étant résistante, intermédiaire ou sensible. Cette classification reflète l'existence, ou non, d'un ou plusieurs mécanismes de résistance qui, dans le cadre de la médecine humaine, sont associés à une probabilité de succès ou d'échec thérapeutique. En miroir des seuils critiques humains, la CA-SFM a été dotée depuis 2007 d'une section entière et en constante évolution dédiée à la lecture des antibiogrammes de souches vétérinaires.

#### Contrôles de qualité internes

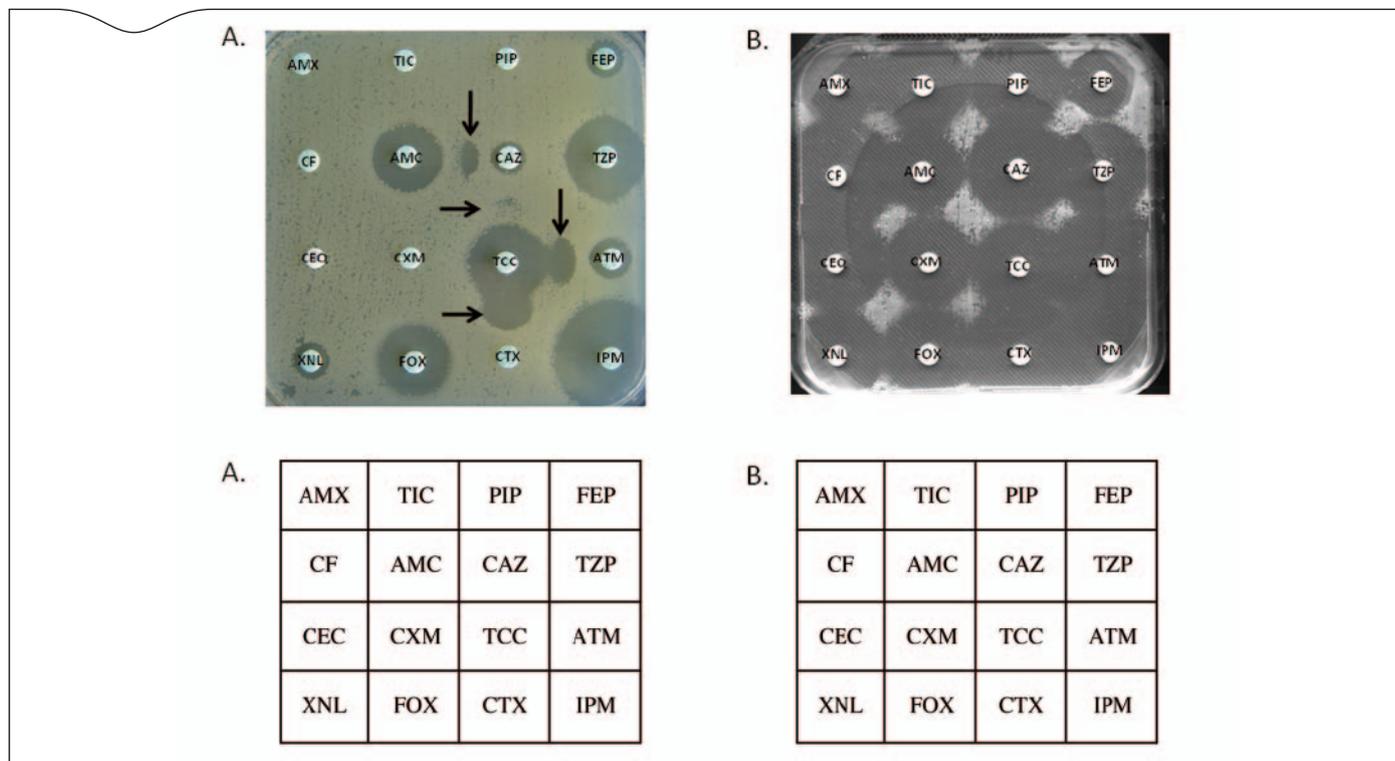
Le CA-SFM édicte annuellement les conditions techniques générales d'inoculum, de milieu, d'ensemencement et de lecture pour la méthode en milieu gélosé. Par ailleurs, il définit également les modalités des contrôles internes permettant de valider la technique. En effet, celle-ci doit être contrôlée régulièrement, et au minimum une fois par mois, avec des souches de référence pour lesquelles des diamètres cibles sont définis pour un certain nombre de couples antibiotique-bactérie [2]. Les souches officiellement référencées sont *Escherichia coli* CIP (Collection de l'Institut Pasteur) 76.24 (Figure 1B), *Pseudomonas aeruginosa* CIP 76.110, *Staphylococcus aureus* CIP 76.25 et *Providencia stuartii* CIP 107808.

Pour les laboratoires travaillant avec des bactéries isolées d'animaux, ces contrôles de qualité internes présentent l'inconvénient majeur d'être plus adaptés à la médecine humaine qu'à la médecine vétérinaire. Cette mauvaise adaptation porte sur la nature des espèces bactériennes (*Providencia stuartii*, par exemple, d'utilité résiduelle en médecine vétérinaire). Elle porte également sur la nature des antibiotiques à tester pour un contrôle qualité donné qui, en très grande majorité, ne correspondent pas à la pratique courante vétérinaire (céfotaxime, amikacine, péfloxacin...). Cet état de fait conduit très souvent les laboratoires d'analyses vétérinaires à n'utiliser qu'un nombre limité de contrôles internes, et avec un nombre restreint d'antibiotiques communs pour un contrôle interne donné. En pratique, aucun laboratoire vétérinaire ne se fournit en antibiotiques d'usage strictement humain dans le seul but de valider la méthode.

Pour pallier cette carence méthodologique, l'unité Antibiorésistance et virulence bactériennes (AVB, Anses, Laboratoire de Lyon) s'est proposée de coordonner une étude visant à valider d'une part deux nouvelles souches de référence d'intérêt vétérinaire pour un usage de contrôle qualité interne (*S. uberis* CIP 103219 et *P. multocida* CIP 103286), et d'autre part un spectre élargi d'antibiotiques à tester sur deux souches

## Recherche pour la référence

Cahier numéro 5  
Été 2011



**Figure 1. AntibioGramme en milieu gélosé (A) d'une souche d'*E. coli* isolée d'un prélèvement de diarrhée de veau et produisant une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) et (B) de la souche *E. coli* CIP 76.24.**  
Les flèches montrent les images de synergie entre le clavulanate (AMC) et les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération. AMX: amoxicilline, TIC: ticarcilline, PIP: pipéracilline, FEP: céfépime, CF: céfalotine, AMC, amoxicilline + acide clavulanique, CAZ: ceftazidime, TZP: pipéracilline + tazobactam, CEC: ceftiofur, CXM: céfuroxime, TCC: ticarcilline + acide clavulanique, ATM: aztréonam, XNL: ceftiofur, FOX: céfoxitine, CTX: céfotaxime, IPM: imipénem.

déjà référencées (*E. coli* CIP 76.24 et *S. aureus* CIP 76.25) afin d'être en meilleure adéquation avec les pratiques spécifiques des tests de résistance sur des souches d'origine animale.

### Modalités de l'étude

Afin de rassembler les données expérimentales nécessaires à l'amélioration du référentiel des contrôles qualité, et afin de tenir compte des variabilités naturelles des résultats de la méthode entre laboratoires différents, l'étude a été menée selon une approche multicentrique comprenant les unités AVB (Anses, Laboratoire de Lyon) et Mycoplasmologie - Bactériologie (Anses, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané), ainsi que 15 laboratoires d'analyses vétérinaires départementaux membres du réseau Résapath, le réseau de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes d'origine animale ([www.resapath.anses.fr](http://www.resapath.anses.fr)). Chaque laboratoire a acquis les souches de référence à tester auprès de l'Institut Pasteur. Les laboratoires de l'Anses de Lyon et de Ploufragan - Plouzané ont effectué 75 répliqua sur les 4 bactéries à étudier, alors que les laboratoires départementaux ont effectué 50 tests sur 1 à 4 bactérie(s), selon leurs possibilités. Parmi ces 50 tests, 40 ont été réalisés selon les conditions propres au laboratoire (milieu, antibiotiques, opérateur...) afin de prendre en compte toutes les variables possibles dans l'estimation des diamètres d'inhibition. Les 10 répliqua restant ont été effectués avec des géloses fournies par l'Anses de Lyon, dont le numéro de lot était commun pour tous les laboratoires.

Les laboratoires de l'Anses (Lyon et Ploufragan - Plouzané) ont également effectué 10 répliqua avec ce lot commun. Tous les antibioGrammes ont été effectués sur plusieurs journées, par écouvillonnage, à partir d'un inoculum standardisé et avec une liste donnée d'antibiotiques, selon la méthode uniformisée décrite par le CA-SFM et reprise dans la norme AFNOR NF U47-107 [3].

### Analyse des résultats et amélioration du référentiel

Les résultats de tous les laboratoires ont été transmis à l'Anses de Lyon et analysés par l'unité d'épidémiologie. Un total de 675 données a été collecté pour la souche *E. coli* CIP 76.24, 600 pour la souche *S. uberis* CIP 103219, 693 pour la souche *P. multocida* CIP 103286 et 624 pour la souche *S. aureus* CIP 76.25. Pour chaque couple antibiotique-bactérie, une distribution des données millimètre par millimètre a été générée. La robustesse et la reproductibilité des valeurs obtenues ont été des critères primordiaux pour retenir un couple antibiotique-bactérie comme étalon de référence. Le design multicentrique de terrain utilisé ici a permis de prendre en compte un certain nombre de variables connues possibles (milieu, antibiotique, manipulateur...). Il a été parfois possible d'observer des différences entre les valeurs obtenues, au sein d'un même laboratoire ou entre laboratoires, pour des expériences effectuées avec le lot commun de milieu ou avec le milieu propre du laboratoire. Cette légère variabilité reflète

## Recherche pour la référence

Cahier numéro 5  
Été 2011

non seulement un effet manipulateur, mais aussi la diversité possible des consommables pouvant être utilisés dans cette méthode, et qui sont tous compatibles avec les exigences de la norme NF U47-107 (gélose commerciale pré-coulée ou gélose reconstituée au laboratoire, par exemple). Ainsi, ces variables se devaient d'être intégrées dans les contrôles qualité proposés. Tous les couples pour lesquels la distribution était clairement bimodale ou présentait un étalement supérieur à 5 mm ont été écartés de l'étude, et ce, même s'ils pouvaient être pertinents au plan clinique (sulfamides-triméthoprimine et *P. multocida*, par exemple). Pour les couples dont la distribution était unimodale, les diamètres limites ont été définis comme la valeur moyenne  $\pm 1$  écart-type, et arrondi au mm vers le bas pour la valeur inférieure et au mm vers le haut pour la valeur supérieure (Figure 2). Au final, à partir d'un panel large de seize antibiotiques testés par bactérie, une liste recentrée (Tableau 1) a été retenue pour chacune des quatre bactéries, et qui ont réuni les meilleurs critères de reproductibilité et de moindre variabilité dans l'obtention des valeurs de diamètres au sein d'un laboratoire et entre laboratoires.

L'analyse des données collectées a donc conduit à la proposition de deux nouvelles souches de référence, ainsi qu'à des intervalles de diamètres d'inhibition attendus vis-à-vis de 13 antibiotiques pour la souche *E. coli* CIP 76.24, 12 pour la souche *S. aureus* CIP 76.25, 11 pour la souche *S. uberis* CIP 103219 et 10 pour la souche *P. multocida* CIP 103286 (Tableau 1). Ces améliorations du référentiel vétérinaire ont été présentées et discutées au sein d'un groupe de travail interne à l'Anses, puis proposées pour validation (séance du 6 novembre 2009) au groupe de travail vétérinaire du CA-SFM. Ce dernier a validé ces modifications, qui ont été intégrées dans la partie vétérinaire des recommandations du CA-SFM, dès son édition de 2010. Il est à noter que, pour les souches *E. coli* CIP 76.24 et *S. aureus* CIP 76.25, certains antibiotiques communs aux deux parties, médicale et vétérinaire du CA-SFM, présentent des valeurs parfois divergentes (gentamicine pour *E. coli* CIP 76.24 ou pénicilline G pour *S. aureus* CIP 76.25, par exemple). Les valeurs de contrôle qualité pour la partie médicale ayant été révisées en 2000, ces divergences pourraient résulter de différences dans

la méthode de l'antibiogramme apparues depuis (inoculation par écouvillonnage par exemple) et/ou de différences dans les méthodologies adoptées pour l'obtention et l'analyse des données. Une dérive physiologique des souches de référence en fonction de leur mode et durée de conservation au sein des laboratoires ainsi qu'une évolution dans les processus de fabrication des géloses et des disques chez les fournisseurs ne sont également pas à exclure des paramètres explicatifs. À ce titre, et plus globalement, la meilleure adéquation qui est désormais observée entre ces valeurs de référence et celles obtenues par les laboratoires vétérinaires d'analyse dans le cadre de leurs contrôles qualités suggère que les valeurs disponibles actuellement pour les antibiotiques spécifiquement humains pourraient également mériter une réévaluation.

### Conclusion

Cette étude multicentrique, réalisée grâce à la forte implication collective et à l'engagement des laboratoires d'analyses vétérinaires membres du Résapath, a permis de faire évoluer le référentiel vétérinaire afin de mieux répondre aux exigences particulières des antibiogrammes effectués sur des souches d'origine animale, tout en tenant compte des variables propres à chaque laboratoire. Cette évolution du référentiel vétérinaire est une avancée majeure vers une amélioration globale de la qualité des résultats rendus par les laboratoires. Plus largement, elle s'inscrit dans une démarche constante de progrès et de qualité appliquée aux rendus des analyses dans le domaine de l'antibiorésistance animale, au bénéfice partagé des laboratoires eux-mêmes et de leurs clients.

### Remerciements

Nous adressons nos vifs remerciements à tous les laboratoires départementaux d'analyses vétérinaires ayant participé à cette étude, et listés ci-après : LDA01, LDA22, LDAR24, IDHESA29, LDA30, LDA35, LVD42, LVD49, LDA50, LDA53, LVAD54, LDO61, Laboratoire des Pyrénées 64, LAVD76, IDEA89.

### Références bibliographiques

- [1] CA-SFM. 2010. Recommandations 2009 du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- [2] Nicolas-Chanoine M-H. 2006. Contrôle de qualité. In : Antibiogramme. Éditions ESKA, Paris, France : 73-77.
- [3] Norme NF U 47-107/2004. Méthodes d'analyse en santé animale : Guide de réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

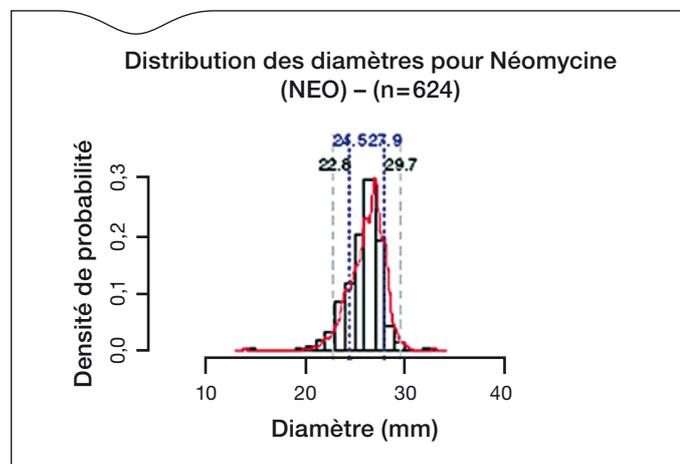


Figure 2. Distribution des données obtenues pour la souche *S. aureus* CIP 76.25 vis-à-vis de la néomycine. Les valeurs limites ont été définies comme  $\pm 1$  écart-type (en bleu) arrondi au mm supérieur pour la valeur supérieure et au mm inférieur pour la valeur inférieure.



## Recherche pour la référence

Tableau 1. (Extrait des recommandations de la section vétérinaires du CA-SFM)

### Contrôle de qualité interne

Un contrôle de qualité interne doit être organisé pour s'assurer de la validité des résultats obtenus. Les souches de référence recommandées sont les suivantes: *Staphylococcus aureus* CIP 76.25 (ATCC\* 25923), *Escherichia coli* CIP 76.24 (ATCC 25922), *Streptococcus uberis* CIP 103219 (ATCC 19436) and *Pasteurella multocida* CIP 103286 (ATCC 43137).

Tableau I. Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose (moyennes +/- 1 écart-type calculés sur un minimum de 600 tests)

Antibiotiques	Charge du disque	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 76.25	<i>Escherichia coli</i> CIP 76.24	<i>Streptococcus uberis</i> CIP 103219	<i>Pasteurella multocida</i> CIP 103286
Penicilline G	6 µg (10 UI)	35 - 40		35 - 40	
Oxacilline	5 µg			30 - 38	
Amoxicilline	25 µg		22 - 27		31 - 37
Amoxicilline + Ac. clavulanique	20/10 µg		22 - 26		31 - 37
Cefalotine	30 µg		18 - 22		
Cefoxitine	30 µg	28 - 33	25 - 31		28 - 34
Ceftiofur	30 µg		27 - 32	35 - 40	33 - 40
Cefuroxime	30 µg		24 - 28		
Cefoperazone	30 µg				
Cefalexine	30 µg			31 - 37	
Gentamicine	500 µg			23 - 29	
Gentamicine	15 µg (10 UI)	26 - 31	23 - 29		
Kanamycine	30 µg	23 - 27	19 - 25		
Neomycine	30 µg	24 - 28	19 - 25		
Acide nalidixique	30 µg		24 - 29		
Enrofloxacin	5 µg		30 - 37		30 - 36
Marbofloxacin	5 µg	26 - 31			30 - 36
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	26 - 30	24 - 28	20 - 25	
Erythromycine	15 µg	26 - 31		28 - 34	
Spiramycine	100 µg	23 - 28		28 - 33	
Tylosine	30 µg	21 - 25		22 - 27	
Tilmicosine	15 µg				16 - 23
Lincomycine	15 µg	27 - 32		30 - 37	
Florfenicol	30 µg		22 - 26		30 - 36
Tétracycline	30 µg	27 - 32		25 - 31	24 - 30
Acide oxolinique	10 µg				23 - 30

\* American Type Culture Collection (ATCC).