

ORBIO

**L'analyse bactériologique et l'antibiogramme
selon la norme NF U47-107 :
principe et conseils pratiques**

12 mai 2016

*Véronique Bachy, DMV, PhD
co-directrice*



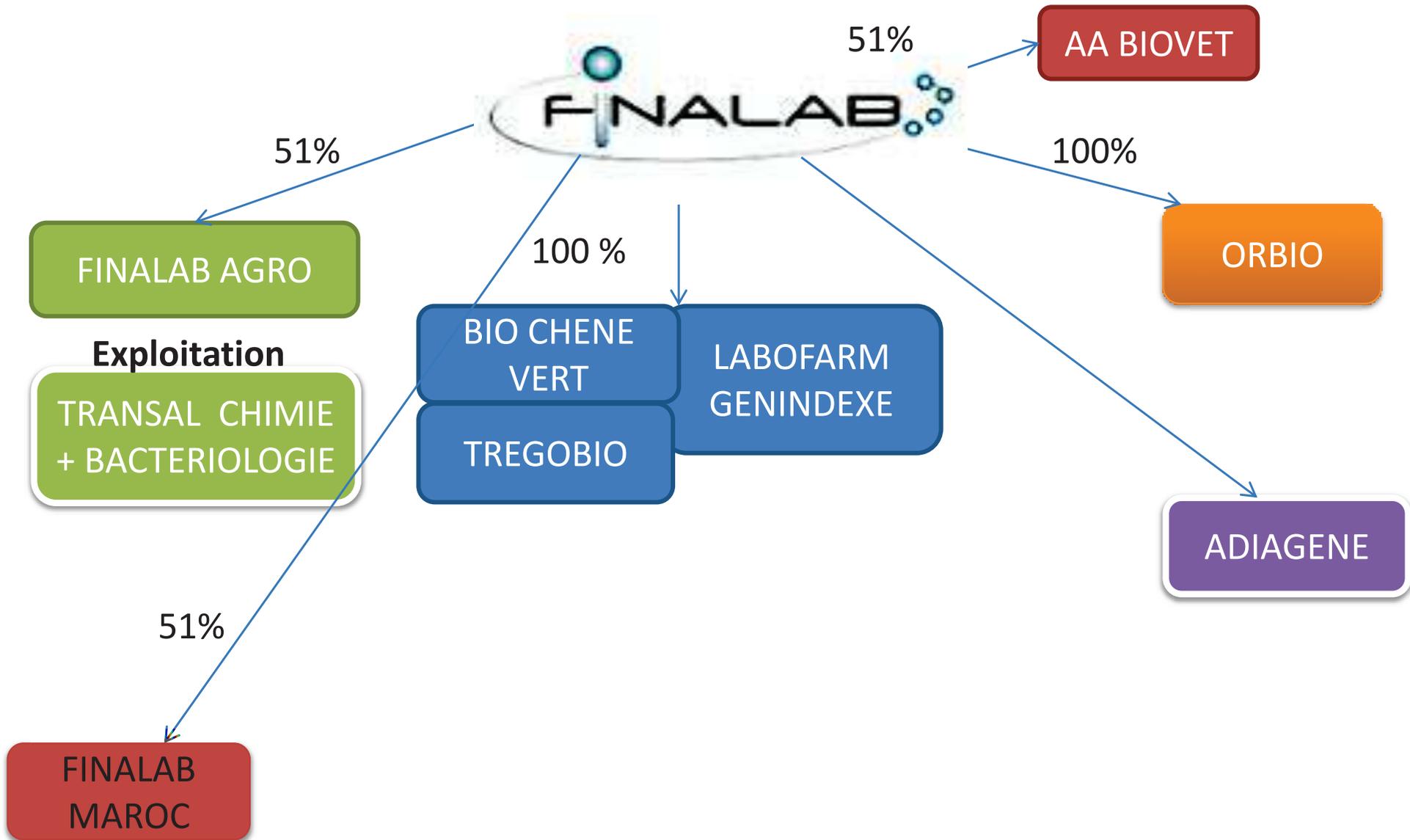
Présentation d'Orbio/Finalab

- **Orbio** a été fondé en 2000 par le **Dr Olivier Rivière**, en région lyonnaise (Jonage, puis Bron)
- Laboratoire spécialisé en **biologie vétérinaire** et en **anatomocytopathologie vétérinaire**

16 salariés: 3 vétérinaires biologistes, 2 vétérinaires anatomopathologistes, 7 techniciens, 4 agents administratifs
- Orbio fait partie depuis 4 ans du groupe **Finalab**, leader français privé de l'analyse de biologie vétérinaire (130 salariés, fort investissement en R&D infectiologie)
- Orbio utilise depuis 2 ans ½ les **techniques bactériologiques reconnues** et mises en place depuis de longues années au sein de ce groupe.



Présentation de Finalab





Présentation de Finalab

- AaBiovet
- Tregobio
- Labofarm
- Transal
- BioChene Vert
- Genindexe
- Orbio
- BioChene Vert Sud
Ouest
+
Finalab Maroc





Plan

- 1) Introduction: mécanismes de résistance des bactéries
- 2) Principes de la culture et de l'identification bactériologiques
Réalisation en pratique chez Orbio
- 3) Principes de l'antibiogramme-présentation de l'antibiogramme
selon la norme NFU47-107
- 4) Lecture interprétative de l'antibiogramme selon les
recommandations du CA-SFM (comité vétérinaire)
- 5) Conseils pratiques pour la réalisation des prélèvements



Mécanismes de résistance des bactéries

La réalisation de l'antibiogramme permet de déterminer la résistance de souches bactériennes *in vitro* et de **prédire l'activité d'une famille de molécules *in vivo***

2 grands types de résistance aux antibiotiques:

Résistance naturelle: fixe et constante (par exemple *Pseudomonas* résistant à l'amoxicilline)

Résistance acquise:

- a) **par mutation génétique ponctuelle** du génome bactérien puis sélection de la souche mutée par un traitement antibiotique
- b) **par acquisition d'un plasmide ou d'un transposon** de résistance, en provenance d'une bactérie de la même souche, ou d'une bactérie différente (80% des résistances acquises)

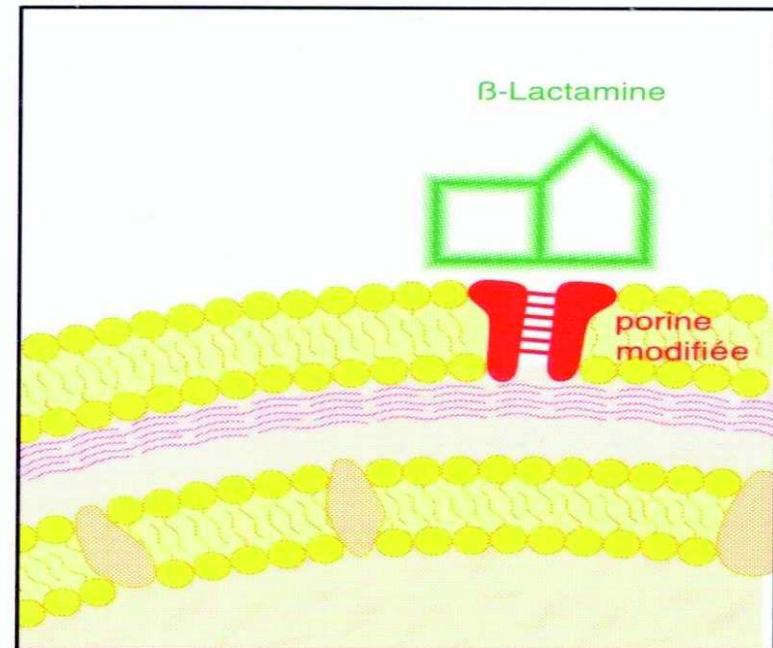


Mécanismes de résistance des bactéries

Mécanismes utilisés par les bactéries contre l'action des antibiotiques:

- **se rendre imperméables à leur pénétration**

Ex: imperméabilité de la paroi bactérienne par modification des porines (Pseudomonas et beta-lactamines)

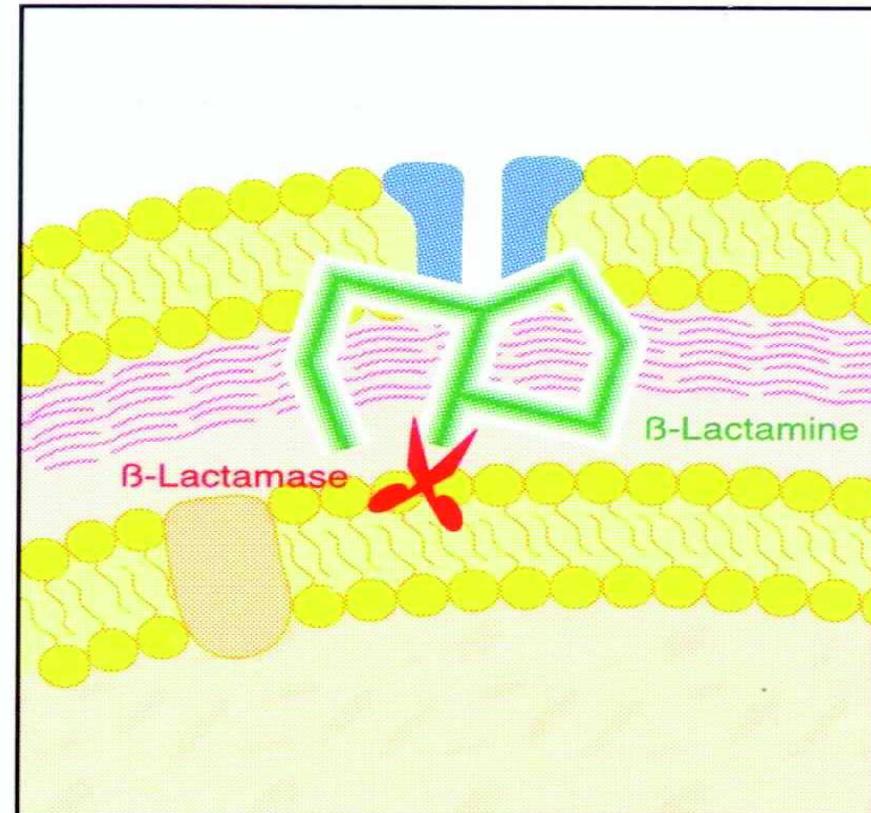




Mécanismes de résistance des bactéries

- **Produire des molécules capables d'inactiver les antibiotiques**

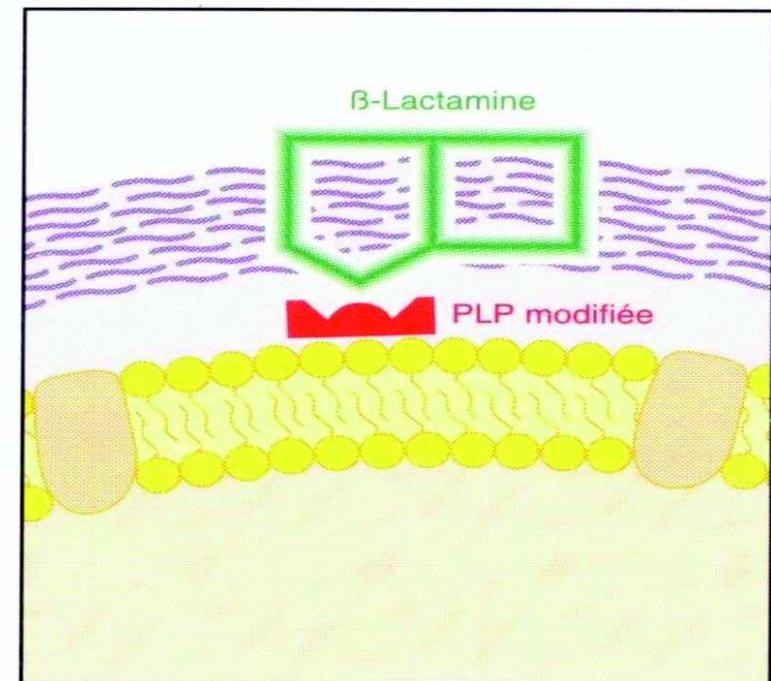
Ex: Pénicillinases et beta-lactamases à spectre étendu





Mécanismes de résistance des bactéries

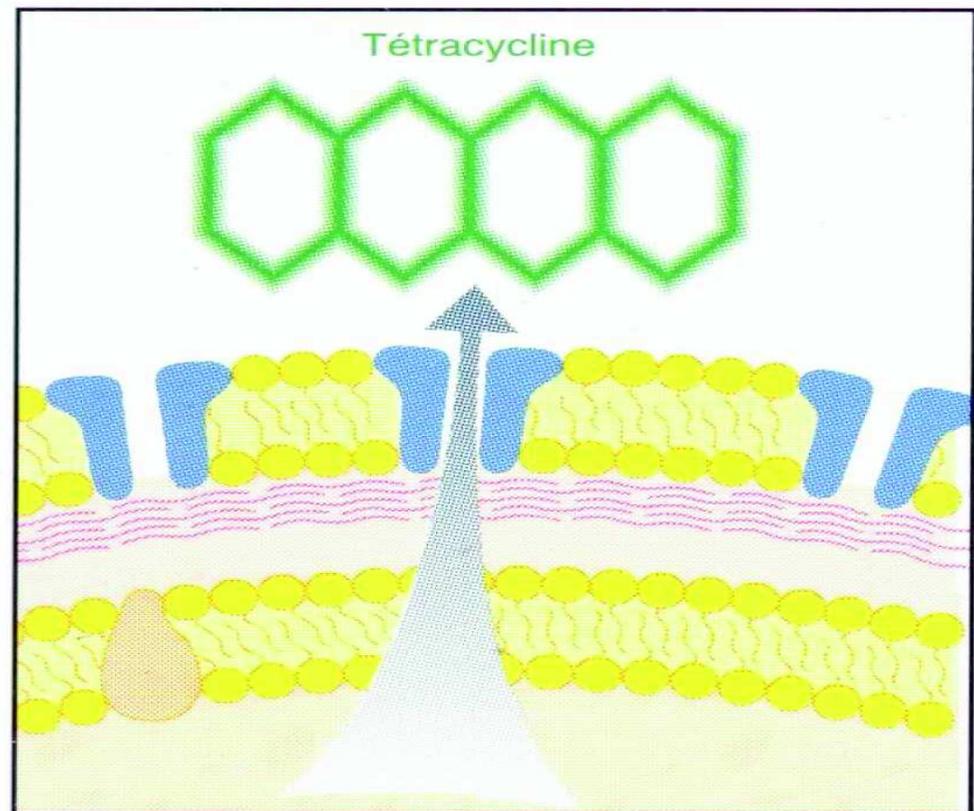
- **Modifier la structure des cibles des antibiotiques**
- Ex: modification des protéines de liaison à la Pénicilline -PLP- des Staphylococcus résistants à la Cefoxitine (dits méthicilline-résistants)





Mécanismes de résistance des bactéries

- **Expulser les molécules d'antibiotiques**
- Ex: mécanisme d'efflux actif des tétracyclines par les Staphylocoques





Préalable à la réalisation d'un
antibiogramme pertinent:

Isolement et identification des
souches d'intérêt pour un cas donné



Principe de la culture et de l'identification bactérienne

Jour de réception des échantillons: ensemencement des géloses et milieux de culture

-1 gélose **Columbia enrichie au sang de mouton** (pousse de tous types de souches)

- 1 gélose Columbia enrichie au sang de mouton, **supplémentée en colistine et acide nalidixique** (pousse des souches Gram+ uniquement)

- 1 gélose **Chocolat** (pousse des souches à croissance difficile)

-1 gélose **CPS chromogène** (identification directe de E.coli, des Enterocoques, des Proteus et du groupe KESC (Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter))

- 1 gélose **Sabouraud** (croissance des Levures et Mycètes)





Principe de la culture et de l'identification bactérienne

Jour 1 ou 2: repiquage et identification des colonies isolées

Premières identifications

- Par les caractères phénotypiques des colonies
- Par les caractères biochimiques (catalase, oxydase...)
- Par les caractères de coloration (Gram, Zieh-Neelsen modifiée...)

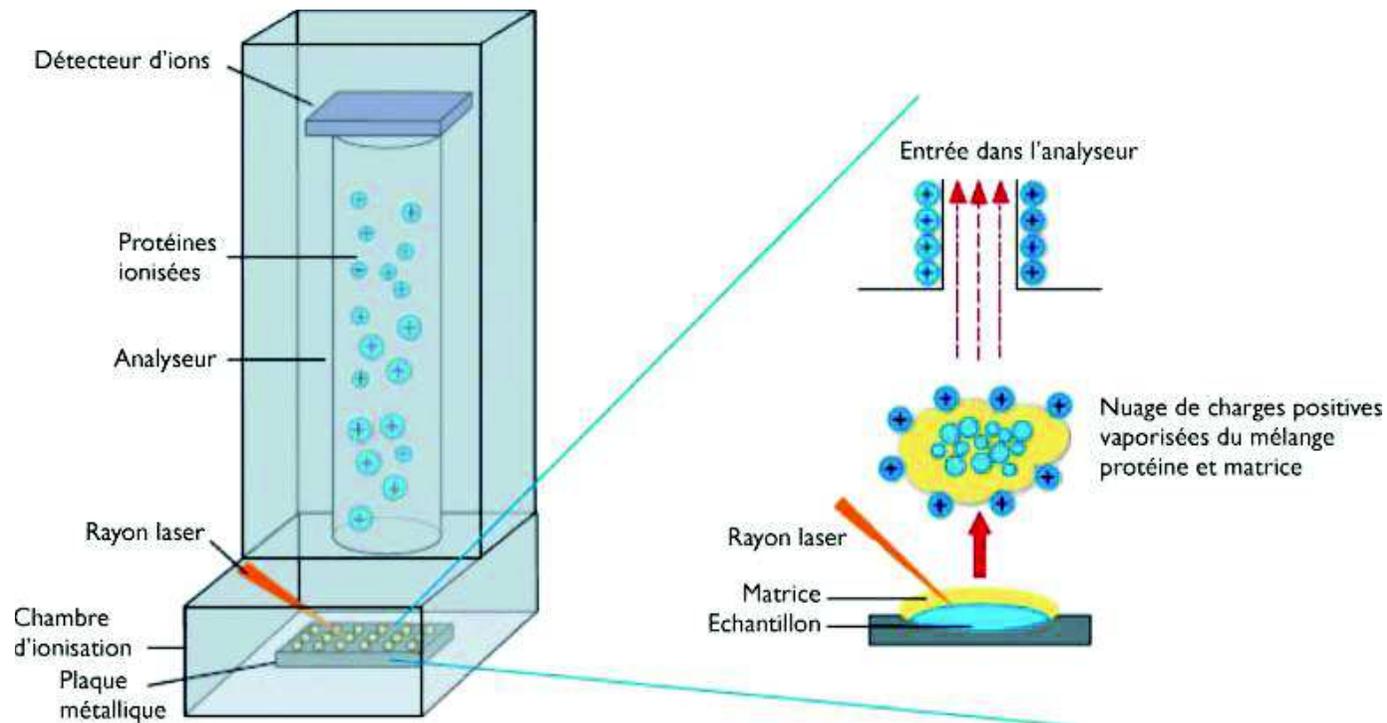
-**Si culture stérile:** réensemencement en milieu d'enrichissement (Bouillon Nutritif Ordinaire chez Orbio)





Principe de la culture et de l'identification bactérienne

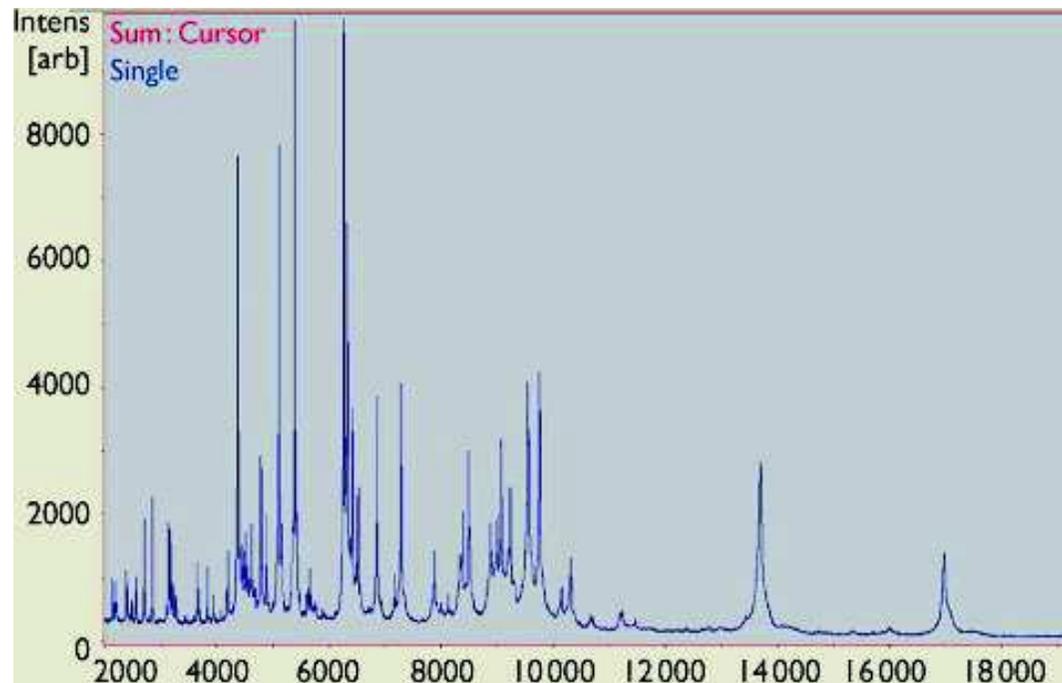
- **Jour 2 ou jour 3 (plus tardivement pour souches anaérobies):**
- **identification finale par spectrométrie de masse (technique MALDI-TOF)**
- échantillon à analyser mélangé avec une « matrice ».
- mélange déposé sur une lame placée dans l'instrument et illuminée par un laser.
- matrice absorbe lumière du laser, s'évapore avec l'échantillon, et acquiert une charge électrique (ionisation).





Principe de la culture et de l'identification bactérienne

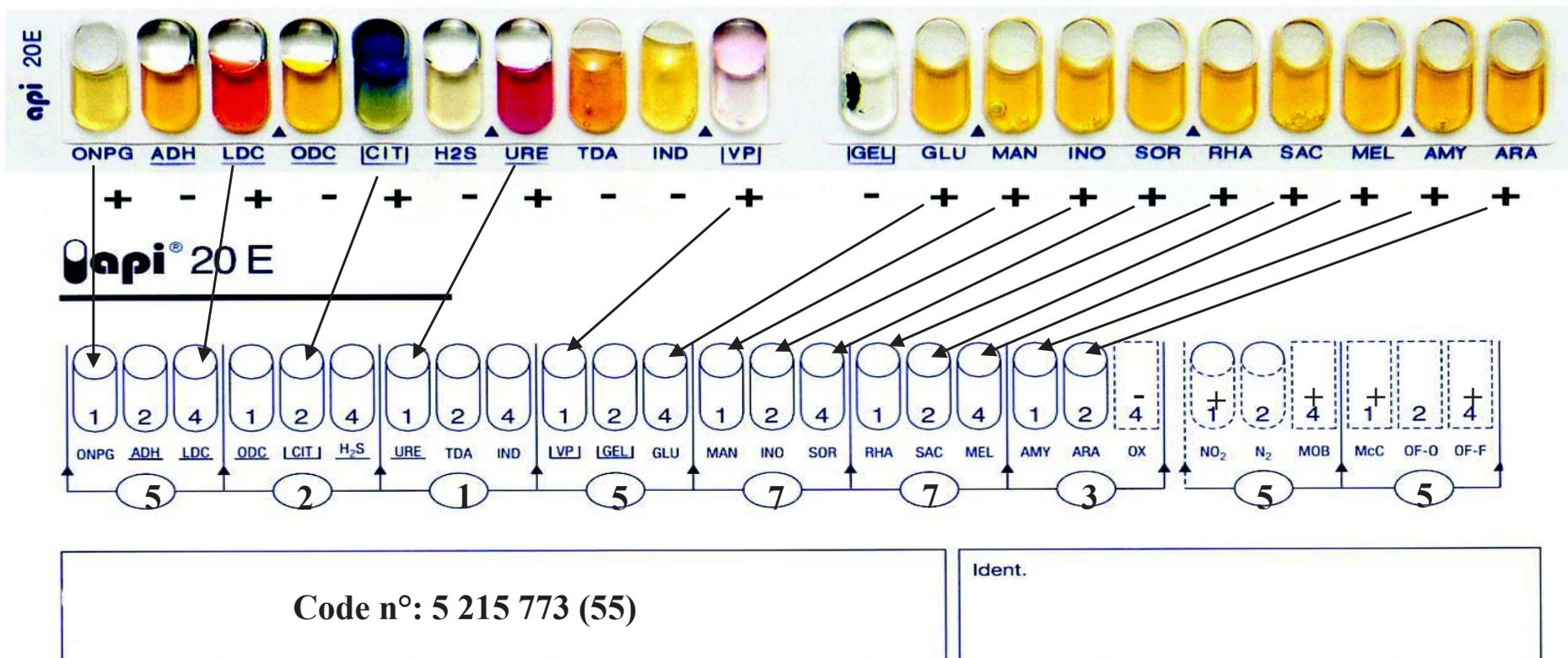
- Les champs électriques guident les ions dans le spectromètre de masse
- Séparation en fonction de leur masse
- résultats sous forme d'une série de pics (spectre) correspondant aux différents fragments issus de la molécule originale.
- Analyse des caractéristiques des fragments : déduction de la structure de la molécule.





Principe de la culture et de l'identification bactérienne

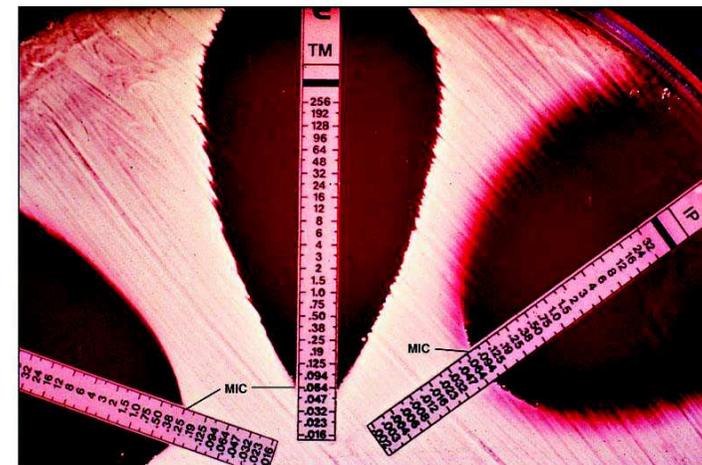
- Pour certaines souches, identification par galerie API (BioMérieux)





Réalisation de l'antibiogramme

- 4 grandes techniques d'antibiogrammes:
 - Détermination de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en milieu gélosé: norme NF U47-106 (acceptée par décret 18 mars 2016)
 - Détermination de CMI en milieu liquide (dilutions en plaque, Vitek2...)
 - **Diffusion d'antibiotiques en milieu gélosé: Norme NF U47-107** (acceptée par décret 18 mars 2016)
 - Détermination de CMI par E-test[®]





Antibiogramme :

Diffusion en milieu gélosé – norme NF U47-107

Principe :

- déposer une suspension bactérienne à une densité précise (0.5 McFarland = 1 à 2 UFC/mL pour E.coli) sur une gélose spécifique (Mueller Hinton)
 - appliquer des disques d'antibiotiques à concentrations connues.
- Après incubation à 37°C +/-2 pendant 18 à 24h:**
- diamètres d'inhibition mesurés au pied à coulisse
 - enregistrés automatiquement dans le logiciel de gestion de laboratoire.

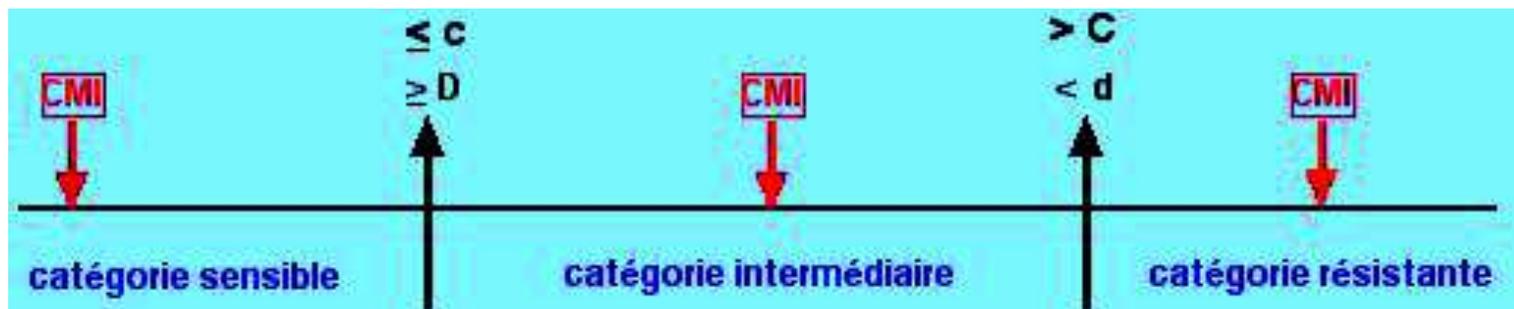




Antibiogramme : Diffusion en milieu gélosé norme NF U47-107



Résultat en fonction du diamètre d'inhibition, en comparaison avec les diamètres critiques préétablis (d et D): catégorie S, I ou R





Antibiogramme :

Diffusion en milieu gélosé – norme NF U47-107

- **Avantages :**

- technique de routine, rapide, peu coûteuse
- référentiel existant fourni par le Comité Français de l'antibiogramme vétérinaire de la Société Française de Microbiologie
- Transmission des résultats au **Resapath** (réseau de surveillance de l'antibiorésistance vétérinaire en France)

- **Inconvénients :**

- estimation des CMI
- nécessité de contrôle interne sur des souches de référence car variabilité possible (chez Orbio, contrôles internes tous les 15 jours sur 4 souches de référence)



Antibiogramme :

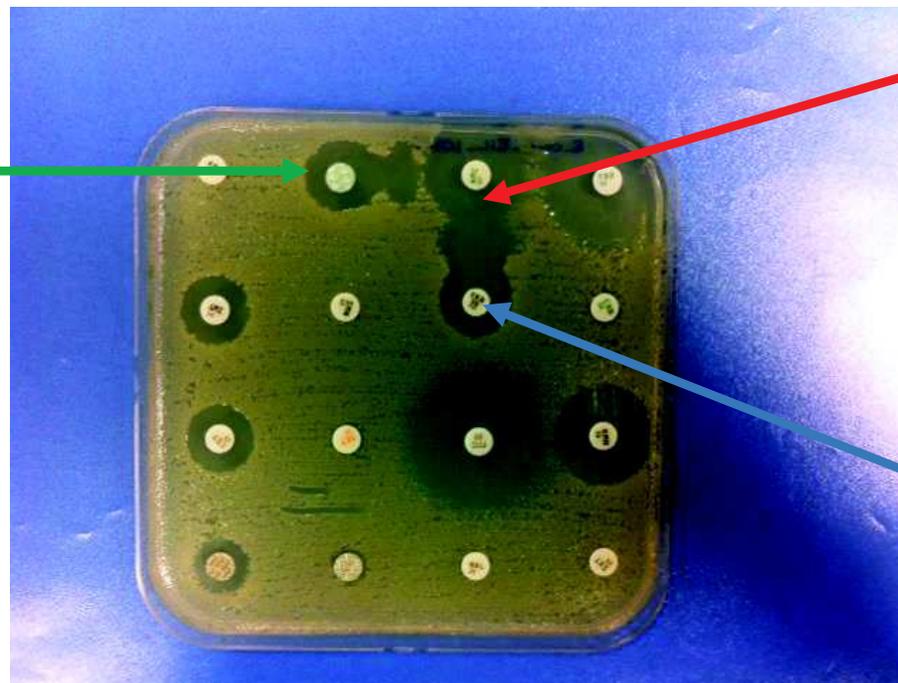
Diffusion en milieu gélosé – norme NFU47-107

Importance du choix et de la disposition des disques

Exemple Béta-Lactamines et Entérobactéries

- Sur l'antibiogramme, rapprocher le disque d'amoxicilline+ac. clavulanique de celui de celui du Cefotiofur et de la cefquinome:
- Une synergie entre les 3 disques permet de mettre en évidence une **BLSE**. Dans ce cas, il faut répondre R pour l'ensemble des beta-Lactamines et céphalosporines, sauf pour l'amoxicilline + acide clavulanique

Cefotiofur



Amoxicilline +
acide clavulanique

cefquinome



Antibiogramme :

Diffusion en milieu gélosé – norme NFU47-107

Importance du choix et de la disposition des disques

Quinolones, Fluoro-quinolones et Entérobactéries.

-Risque de **mutations importantes** avec ces antibiotiques

-Rajouter à l'antibiogramme habituel le disque **d'acide nalidixique** permet de mettre en évidence des sensibilités diminuées aux fluoro-quinolones.

-Si souche R à l'acide nalidixique:

L'utilisation d'une fluoro-quinolone ou d'une quinolone peut conduire à **l'apparition de souches R aux fluoro-quinolones.**



Antibiogramme :

Diffusion en milieu gélosé – norme NFU47-107

Lecture interprétative

Exemple: utilisation de la sensibilité à la **céfoxitine** et à l'**oxacilline** (à 30°C) pour la détermination des résistances aux bêtalactamines et céphalosporines des **Staphylocoques**

Exemple ATB lu in vitro

Staphylococcus aureus

ATB interprété

Antibiotiques	Interp. (*)			Diamètres mesurés (mm)	Diamètres critiques (mm)	(*)
	S	I	R			
* Aminosides						
Streptomycine	X			16	13-15	
Gentamycine	X			27	20	(1)
* Bêta-lactamines Aminopénicillines						
Amoxicilline		X		17	14-21	(2)
Amoxicilline + Acide clavulanique	X			25	14-21	(3)
* Bêta-lactamines Pénicilline G						
Penicillines G			X	12	29	
* Céphalosporines de 1ère génération						
Cefalexine		X		13	12-18	(4)
* Céphalosporines de 2ème génération						
Cefoxitine			X	17	25-27	(5)
* Céphalosporines de 3ème et/ou 4ème génération						
Ceftiofur	X			25	17-21	(6)

Amoxicilline: R
 Amoxicilline+ac cla: R
 Penicilline G: R
 Céfalexine: R
 Cefoxitine R
 Ceftiofur: R
 =Résistance à toutes les
 Bêta-lactamines
 et céphalosporines (SARM)

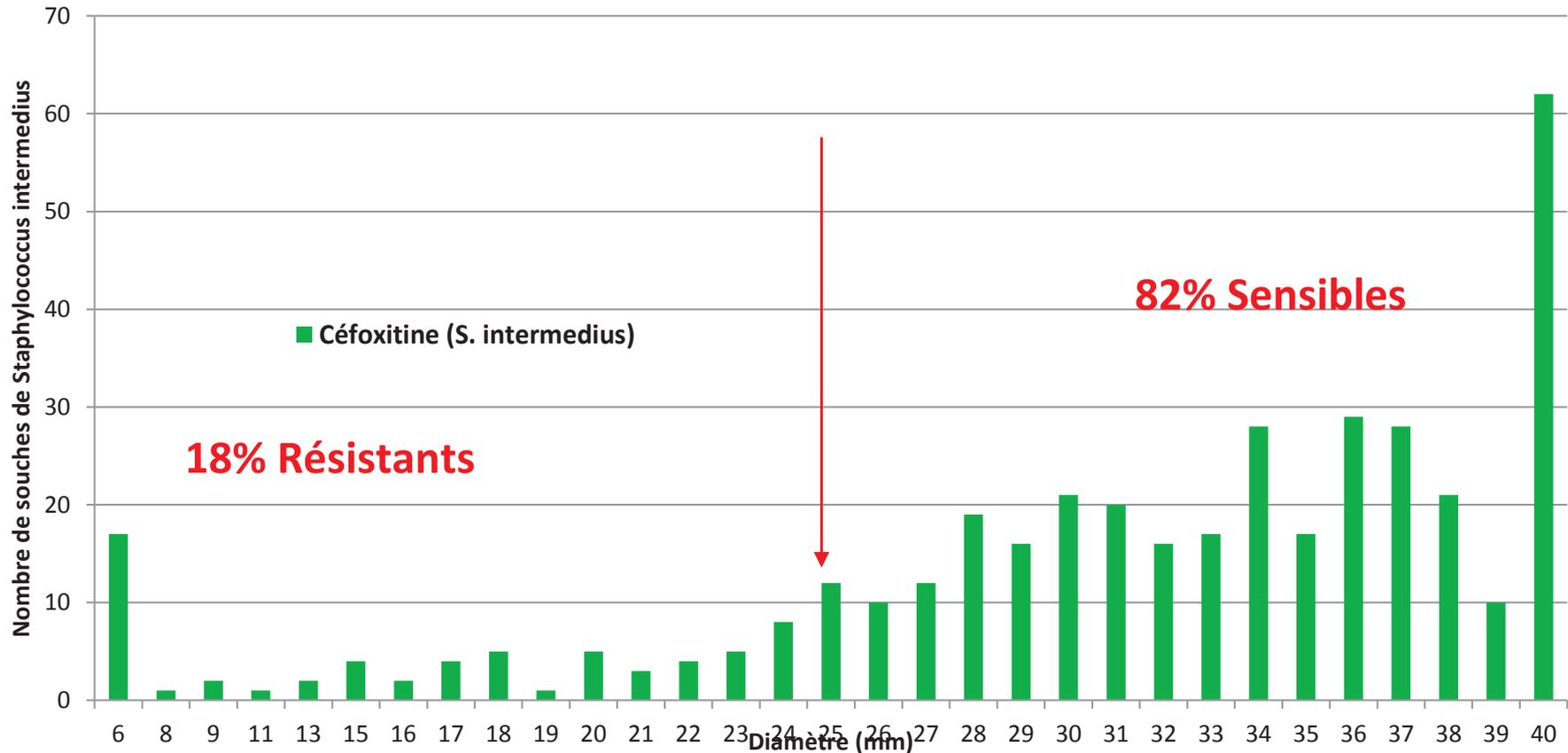


Antibiogramme :

Diffusion en milieu gélosé – norme NFU47-107

Etudes épidémiologiques

2015: Résistance à la céfoxitine (marqueur de résistance à toutes les Betalactamines et céphalosporines) chez les *Staphylococcus intermedius* (coag. +) isolés à Orbio



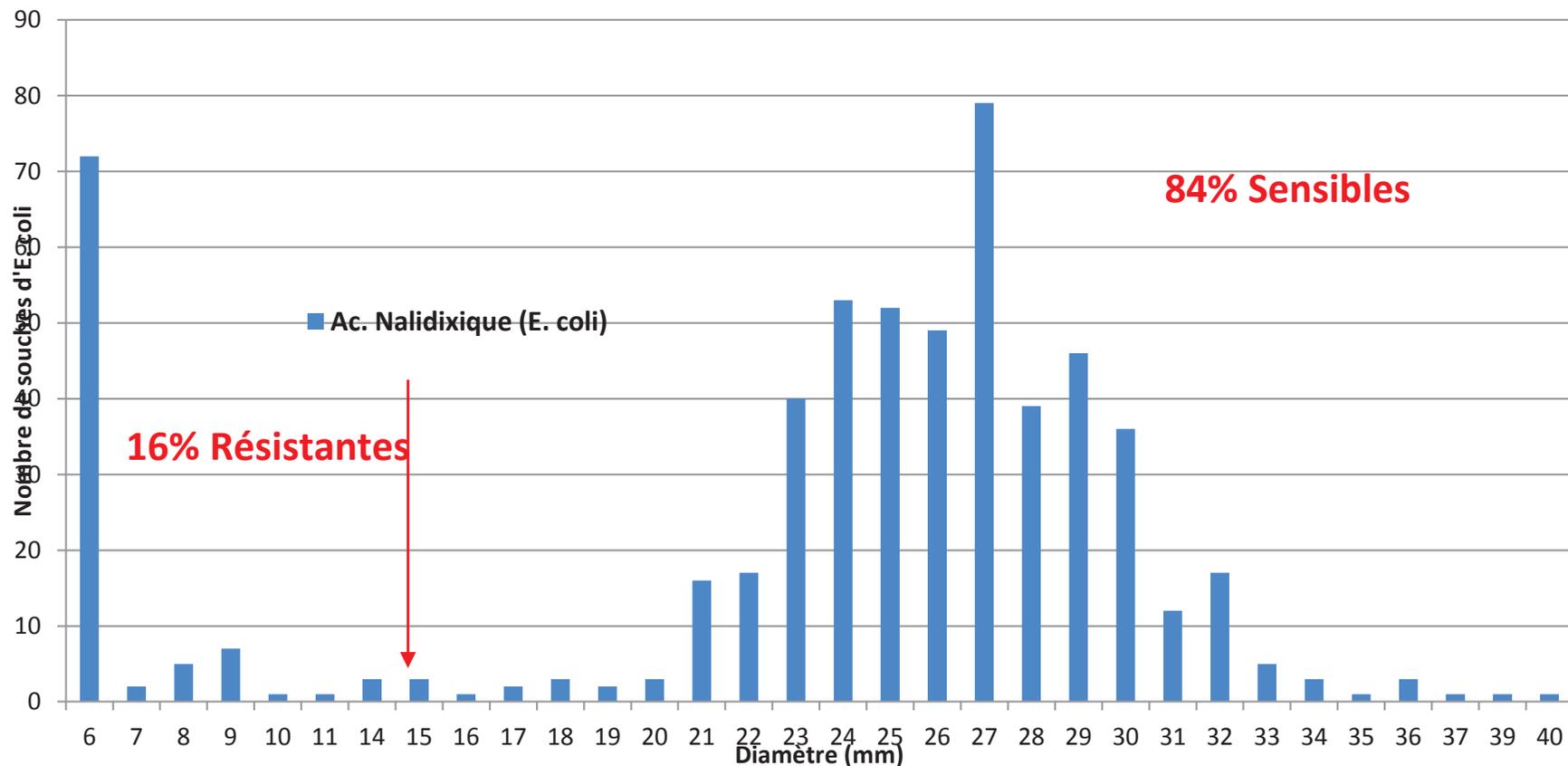


Antibiogramme :

Diffusion en milieu gélosé – norme NFU47-107

Etudes épidémiologiques

2015: Résistance à l'acide nalidixique (prédictif du risque de résistance à toutes les quinolones in vivo) chez les Escherichia coli isolés à Orbio





Choix thérapeutique après antibiogramme

L'antibiogramme représente une sensibilité *in vitro*, en conditions statiques

Nombreux facteurs influençant le choix in vivo:

- Formes disponibles (PO, IV, IM...)
- **Pharmacocinétique:** ce que l'hôte fait avec l'antibiotique: absorption, métabolisme et diffusion, élimination
- **Pharmacodynamie:** ce que l'antibiotique fait à la bactérie (effets directs, effets post-exposition, sélection)



Choix thérapeutique après antibiogramme

- **Synergies possibles** (pénicilline + aminoside, aminoside+polymyxine, métronidazole+spiramycine)
- **Etat de santé de l'animal** (insuffisance rénale, présence d'une diarrhée...)



Une bonne identification bactérienne et un bon antibiogramme dépendent d'un bon prélèvement



Conseils pour la réalisation des prélèvements

- **Toute antibiothérapie doit être interrompue de préférence au moins 8 jours avant le prélèvement.**
- Envoi express (Chronopost, TNT, coursier) nécessaire
- + pack réfrigéré de préférence
- **Tissus et organes** : prélèvements placés dans des pots individuels stériles.
Anses intestinales ligaturées à part.
- **Biopsies cutanées**: pour pyodermite profonde- éliminer la flore cutanée classique- mettre biopsie dans milieu de transport ou sérum physiologique



Conseils pour la réalisation des prélèvements

- **Ecouvillons:**

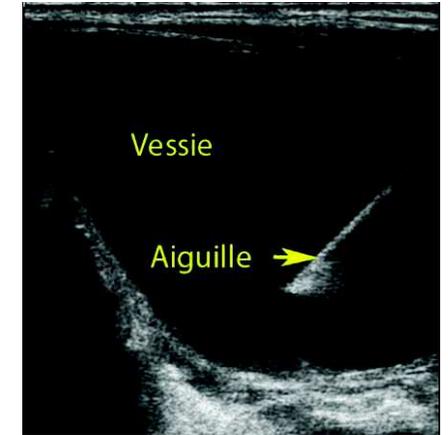
- toujours sur milieu de transport (attention si PCR aussi demandée, fournir écouvillon sec supplémentaire):
- voies nasales, pharynx, amygdales, conjonctives, oreilles, peau (lésions superficielles et fistules), abcès (pus+coque/périphérie), vagin, col utérin

- **Selles** : de préférence directement dans le rectum pour éviter toute contamination et placées dans un flacon adapté stérile
- envoyées le plus rapidement possible au laboratoire.





Conseils pour la réalisation des prélèvements



- **Urines** : collectées de manière aseptique (sondage ou cystocentèse (photo: CHV Frégis) et envoyées le plus rapidement possible au laboratoire.
- miction naturelle à éviter
- **Lait**: mamelle nettoyée à l'eau et séchée puis désinfectée à l'alcool.
- Elimination premiers jets
- Lait récupéré dans flacon stérile .
- Envoyer avec pack réfrigéré.
- **Liquides biologiques** :
- ponctions de liquides d'épanchement, de kystes ou d'abcès, lavages broncho-alvéolaires ou liquides d'aspiration transtrachéale collectés de manière stérile sur tubes secs
(prévoir un tube EDTA supplémentaire pour la cytologie, si demandée)





Conseils pour la réalisation des prélèvements

- **Sang :**
- **Hémocultures** en aérobiose et anaérobiose réalisables que si sang EDTA immédiatement transféré dans flacon adapté (type Hémoline, BioMérieux).
- Deux à trois prélèvements doivent être collectés à quelques heures d'intervalle, si possible pendant des phases d'hyperthermie.

- **Cas des recherches de souches anaérobies :**
- **Le prélèvement ne doit absolument pas être exposé à l'air.**
- flacon ou tube de petite contenance rempli jusqu'au couvercle/bouchon.
- Ecouvillonnage: fournir 2 écouvillons distincts
- un pour la culture en aérobiose, l'autre pour la culture en anaérobiose.

Merci de votre attention

