



HAL
open science

**Fosfomycine et lincomycine sur Staphylococcus aureus
et non aureus. Proposition de diamètres critiques.
Concentrations minimales bactéricides de la lincomycine**

Anne-Sophie Morel

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Morel. Fosfomycine et lincomycine sur Staphylococcus aureus et non aureus. Proposition de diamètres critiques. Concentrations minimales bactéricides de la lincomycine. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01529358

HAL Id: dumas-01529358

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01529358>

Submitted on 30 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 29 mai 2017

Par Mlle MOREL Anne-Sophie
Née le 21/12/1990

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

Fosfomycine et lincomycine sur *Staphylococcus aureus et non aureus*

Proposition de diamètres critiques.

Concentrations minimales bactéricides de la lincomycine.

----oOo----

Président : M. le Professeur Philippe COLSON

Membres : M. le Professeur Pierre-Edouard FOURNEIR

Mme Nathalie BRIEU

M. Hubert CHARDON (directeur de thèse)

27 Boulevard Jean Moulin – CS 30064 - 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIQUE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE
----------------------------	-------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY
Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDER
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

ATER

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Cette thèse est le résultat d'un long travail de collaboration avec de nombreuses personnes. Je les remercie pour m'avoir aidée à élaborer ce travail de thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, M. Hubert Chardon. Pendant un an, vous êtes restés patients et à l'écoute malgré l'avalanche de mails auxquels vous avez dû faire face. Vous m'avez aidé dans mes moments d'incompréhension et d'impatience, et vous avez toujours été très réactif à mes sollicitations. De plus, vous avez été très présent lors des manipulations et je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie P. Colson, PE Fournier et Nathalie Brieu d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Aussi, cette étude n'aurait pas été possible sans le financement de l'Association de Biologie et Anatomopathologie du CHG d'Aix en Provence.

De plus, je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé lors de la mise en œuvre pratique de cette étude. En effet, ce travail s'est fait en équipe, je remercie Mathieu, Clément, Christophe, Chantal, Nathalie et Audrey. J'en profite pour remercier toute l'équipe du laboratoire de bactériologie du CH d'Aix pour leur bienveillance et leur bonne humeur pendant toute la durée de mon stage parmi eux.

En cette fin d'internat, je tiens également à remercier les personnes qui m'ont entourée et soutenue pendant ces quatre ans. Mes chers co-internes et ex binôooooooooomes, merci de m'avoir supportée pendant 6 mois de stage ou plus !

Je suis redevable à mes parents qui m'ont toujours soutenue dans mes choix et qui sont toujours restés à l'écoute.

Enfin, merci à Tom, qui a su faire preuve de patience pendant cette période d'écriture et qui m'a beaucoup aidée pour traiter mes données en rendant mes innombrables tableaux excel magiques !!

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

L'évolution progressive de nombreuses espèces bactériennes vers une résistance croissante aux antibiotiques justifie la recherche de nouvelles molécules ou une utilisation différente, voire une réutilisation d'antibiotiques déjà connus. Dû à cette évolution, le laboratoire de bactériologie se doit d'être aussi évolutif que l'antibiothérapie elle-même.

Le point de départ exige que le laboratoire puisse tester, en routine, l'activité de l'antibiotique.

On utilise habituellement la concentration minimale inhibitrice (CMI) : la plus petite concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber la croissance visible d'une souche de bactéries au laboratoire, c'est-à-dire in vitro. Depuis quelques décennies, de nombreuses études ont montré la relation entre la CMI des souches et les résultats thérapeutiques. Certains auteurs utilisent en plus d'autres valeurs comme la concentration minimale bactéricide (CMB) ; ceux-là s'appuient sur des faits et des arguments pertinents mais c'est bien la CMI qui est l'indicateur le plus utilisé en pratique.

Les principes des techniques de base de détermination de la CMI existent depuis longtemps et aucune nouveauté réelle n'est apparue. Mais les conditions techniques de détermination peuvent varier à l'infini en jouant sur tous les paramètres : inoculum, constituants du milieu de culture, nature solide, liquide, volume, forme du récipient modifiant le rapport surface/volume, mode de lecture etc. Toutes ces conditions techniques influent sur la CMI. Il n'y a pas une valeur de CMI pour une souche donnée mais une valeur de CMI déterminée dans telle condition.

Dans les années 50, les divergences de résultats étaient telles pour une souche donnée que des comités de standardisation ont vu le jour tel que le CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, devenu depuis 2014 le CASFM-EUCAST), (l'EUCAST (European Committee on antimicrobial Susceptibility Testing) et le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour les Etats-Unis. Ces comités d'experts ont abouti à la mise en œuvre de méthodes standardisées pour la détermination de la CMI. Pourtant des discordances entre laboratoires sont toujours observées.

Pour transformer cette valeur de CMI en information sur la possibilité ou non de traiter par l'antibiotique considéré, on fait appel aux valeurs critiques. Les valeurs des concentrations et des diamètres critiques définies pour chaque antibiotique sont établies en tenant compte de plusieurs paramètres :

- la distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour des populations de souches définies et appartenant à chacune des espèces bactériennes impliquées en pathologie humaine ;
- les concentrations humorales et tissulaires qui sont obtenues avec les posologies recommandées dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) ;
- la confrontation des résultats obtenus *in vitro* et des résultats obtenus *in vivo* (essais cliniques);
- la variabilité statistique des méthodes utilisées pour mesurer les CMI et les diamètres des zones d'inhibition.

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

1. Souches sensibles : Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie générale ou orale selon les recommandations des différents tableaux spécifiques d'espèces ou non (PK/PD) : CMI < ou égale à la concentration critique basse.

2. Souches résistantes : 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 : CMI > à la concentration critique haute.

3. La catégorie intermédiaire : Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles la CMI mesurée (ou le diamètre) est supérieure à la concentration critique basse et inférieure ou égale à la concentration critique haute (raisonnement identique pour les diamètres vis-à-vis des diamètres critiques correspondants). La probabilité de succès thérapeutique est forte uniquement dans le cas d'un traitement par voie systémique avec une posologie forte ou lorsque l'antibiotique se concentre au site de l'infection. Pour une information complète des prescripteurs, cette catégorie intermédiaire pourrait devenir « sensible à forte posologie ».

Actuellement, la méthode de référence pour mesurer la CMI est la micro-dilution en milieu liquide, sauf pour quelques antibiotiques (fosfomycine, mecillinam).

Pourtant, les méthodes automatiques actuelles utilisent des conditions de détermination de CMI très éloignées de la méthode de référence, d'ailleurs le résultat pratique est souvent très voisin de celui des méthodes de référence. En effet, ces méthodes sont approuvées à partir du

moment où on compare la méthode sur des groupes de souches dits sensibles ou résistants par la méthode de référence, un accord de 90 à 95% suffit à valider la méthode (1).

Les valeurs critiques qui permettent de déterminer la sensibilité d'une souche à un antibiotique sont importantes pour les nouvelles molécules mais aussi pour les anciennes dans le cadre d'une nouvelle utilisation. Dans la version 2016 du communiqué CASFM, on constate que les diamètres critiques de deux antibiotiques sont absents pour le staphylocoque : fosfomycine et lincomycine.

Le but de ce travail est un essai de détermination des diamètres critiques pour ces deux antibiotiques. De plus, la CMB a été mesurée pour la lincomycine, mesure impossible pour la fosfomycine, la méthode de référence pour la CMI étant le milieu liquide.

Enfin, la détermination de diamètres critiques pour la lincomycine chez Staphylocoque est nécessaire. En effet, le CASFM considère que les souches sensibles à la clindamycine sont sensibles à la lincomycine ; ceci est vrai pour la majorité des cas, sauf pour les souches sensibles clindamycine et résistantes à la lincomycine, ces souches possédant le gène *lnuA* ou *linA*'.

Nous avons adopté le plan suivant :

Sommaire

I.	REVUE DE LA LITTERATURE	6
A.	Généralités sur la fosfomycine	6
1.	Origine	6
2.	Structure, propriétés physicochimiques et formulations	6
3.	Mécanisme d'action	7
4.	Mode d'entrée dans la cellule bactérienne.....	8
5.	Spectre d'activité.....	9
6.	Mécanismes de résistance	9
7.	Tolérance	10
8.	Utilisation actuelle et perspectives	10
B.	Généralités sur la lincomycine	14
1.	Origine	14
2.	Mécanisme d'action	15
3.	Spectre d'activité.....	16
4.	Pharmacologie et formulation	16
5.	Effets indésirables	17
6.	Indications des lincomycines	17
7.	Mécanisme de résistance	18
8.	Intérêt de la lincomycine pour la détermination de mécanisme de résistance chez les staphylocoques.....	19
C.	Détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique.....	22
1.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	22
2.	Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	22
3.	Détermination de diamètres critiques	23
II.	MATERIEL ET METHODE	26
A.	Sélection des souches.....	26
B.	Détermination des CMI	32
1.	CMI en milieu solide	33
2.	CMI en milieu liquide.....	36
3.	CMI par la méthode des bandelettes	38
4.	Détermination des diamètres des zones d'inhibition	40
C.	Détermination des CMB	41

III. RESULTATS.....	42
A. Fosfomycine	42
1. Courbes de répartition des diamètres en fonction des CMI	45
2. Résultats des différentes méthodes de détermination de CMI	52
B. Lincomycine.....	60
1. Courbes de répartition des diamètres en fonction des CMI	60
2. Résultats des différentes méthodes de détermination de CMI	62
3. CMB	76
IV. DISCUSSION	79
A. La fosfomycine.....	79
B. La lincomycine	84
V. CONCLUSION	88
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	90
VII. ANNEXES.....	94

I. REVUE DE LA LITTERATURE

A. Généralités sur la fosfomycine

1. Origine

Découverte en Espagne, en 1966, au cours d'un programme de recherche mené conjointement par la CEPA (Compania Espanola de Penecilina y Antibioticos) et la MSD (Merck Sharp and Dohme), elle a été trouvée pour la première fois dans les bouillons de fermentation des souches de *Streptomyces fradiae*. Ces souches ont été isolées à partir d'échantillons de terre recueillis dans la province d'Alicante. D'autres souches de *Streptomyces* (*S. viridochromogenes* et *S. wedmorensis*) capables elles aussi de produire de la fosfomycine, ont été trouvées. Ce nouvel antibiotique a été d'abord désigné sous le nom de « phosphonomycine », remplacé plus tard par fosfomycine d'après l'USAN (United States Adopted Names Council) (2).

Antibiotique d'origine naturelle, aujourd'hui, la fosfomycine est produite de façon biosynthétique grâce aux travaux de Woodyer (3).

2. Structure, propriétés physicochimiques et formulations

La fosfomycine est l'acide L-cis-1-2-époxy phosphonique ($C_3H_7PO_4$, masse moléculaire : 138.06 g/mol), le groupement époxy et l'acide phosphonique sont les clés de l'activité thérapeutique, c'est la liaison Carbone-Phosphore qui nécessite un procédé de biosynthèse complexe. Cette molécule n'appartient à aucune classe thérapeutique, aucun autre antibiotique n'est proche de sa structure.

La fosfomycine forme des sels facilement et a un large spectre antibiotique. Elle peut être utilisée sous forme orale en sels de calcium (C_3H_5PCa) et en sel de trométhamine ($C_4H_{18}NO_7P$) (Figure 1) (4), qui est la formulation la plus récente, très hydrosoluble, elle a une biodisponibilité de 34 à 41% contre 12% pour la forme calcique à cause de son hydrolyse au niveau gastrique. La forme disodique (la plus hydrosoluble) est la seule formulation intraveineuse disponible, celle-ci est associée à un risque pour les patients hémodialysés ou atteints de pathologies cardiaques du fait de l'apport de sodium.

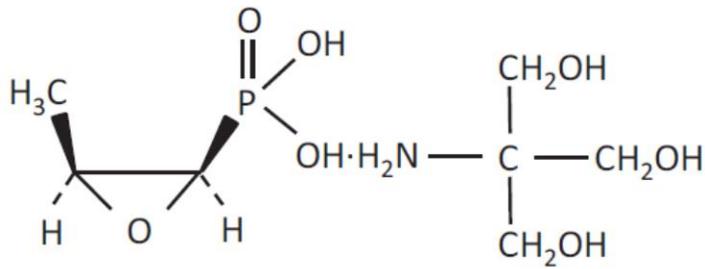


Figure 1 Structure chimique de la fosfomicine trométhamine.

Elle se lie peu aux protéines plasmatiques, et se distribue largement dans les tissus.

3. Mécanisme d'action

La fosfomicine est un antibiotique bactéricide qui agit en inhibant la synthèse des précurseurs du peptidoglycane, composant principal de la paroi bactérienne. Elle agit plus tôt que les bêta-lactamines et les glycopeptides, autres inhibiteurs de la synthèse de la paroi.

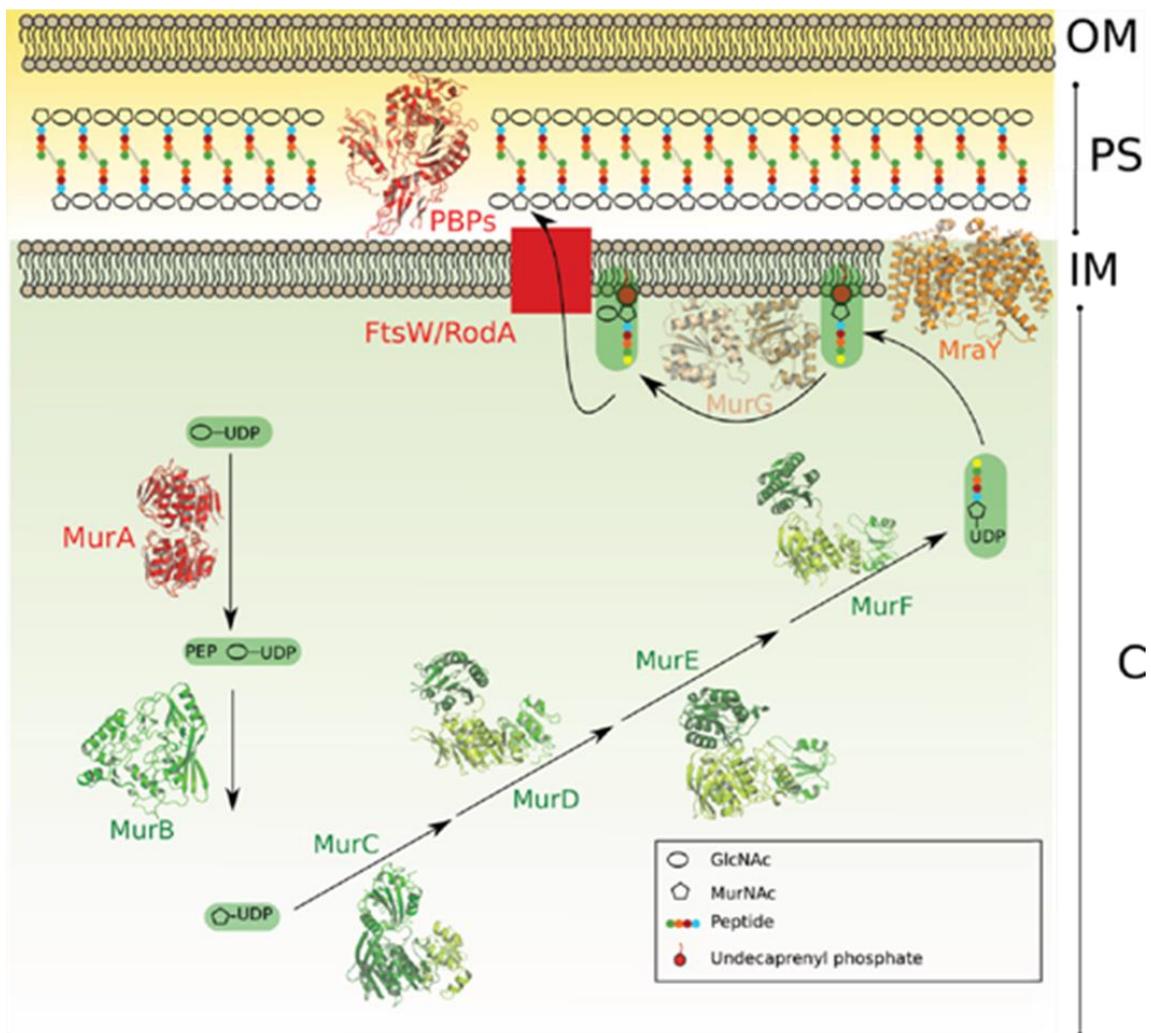


Figure 2 Mécanisme d'action de la fosfomicine.

La fosfomycine inhibe par compétition une enzyme cytosolique MurA (uridine diphosphate N-acétyl-glucosamine-3-enolpyruvyl transférase) qui produit l'acide UDP-N-acétylmuramique à partir de l'UDP-N acétylglucosamine en temps normal (Figure 2) (5).

Plus précisément, la fosfomycine est un analogue du phosphoénolpyruvate (PEP) et MurA est responsable de la liaison du PEP au groupe 3'-hydroxyl de l'UDP-N-acétylglucosamine.

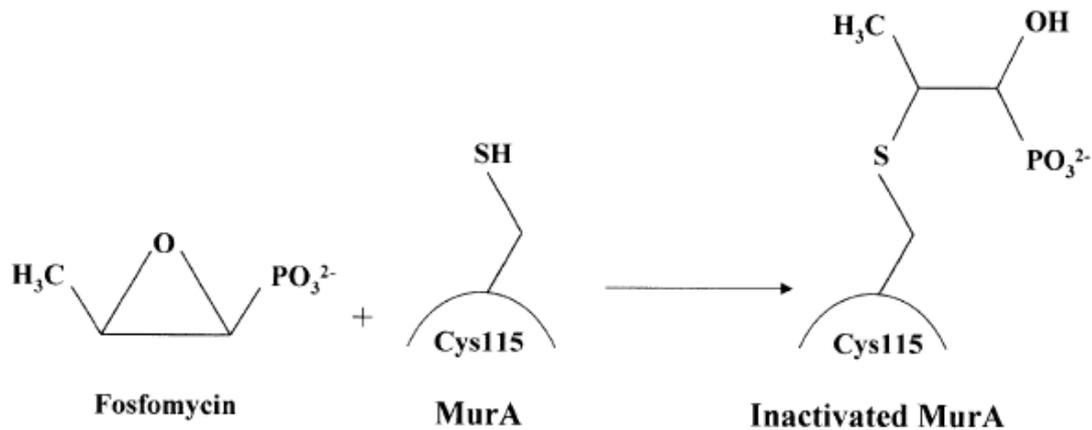


Figure 3 Inactivation de MurA par la fosfomycine.

MurA est inactivée par la formation d'une liaison covalente avec l'antibiotique, ceci conduit à l'inactivation de son époxyde. Le résultat est une liaison covalente stable de la fosfomycine à l'enzyme entraînant l'inactivation de MurA, ce qui stoppe la première étape de la synthèse du peptidoglycane (Figure 3) (6). Pour être efficace, la fosfomycine doit pénétrer dans la bactérie cible.

4. Mode d'entrée dans la cellule bactérienne

L'antibiotique utilise deux modes de transport actif pour rentrer dans la cellule.

a) *Transport constitutif : voie du L-alpha-glycérophosphates (glpT)*

Le principal mode d'entrée est le système de transport des L-alpha-glycérophosphates (glpT), inductible par un intermédiaire glycosylé le glycéraldéhyde-3-phosphate.

b) *Transport inductible : voie des hexoses phosphate*

Le second mode de transport est celui de quelques hexose-6-phosphate (uhpT) dépendant de la présence de glucose-6-phosphate (G6P : hexose extracellulaire monophosphate inducteur). Certaines bactéries comme *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Enterococcus* et *Staphylococcus* utilisent ce mécanisme de transport au niveau de leur membrane cellulaire.

Ainsi la fosfomycine est un « analogue structural » du glycéraldéhyde-3-phosphate et du G6P.

Andrews (7) a montré que le G6P à la concentration de 25µg/mL optimisait l'induction du système UhpT et était nécessaire pour les tests de susceptibilité in vitro.

5. Spectre d'activité

Le spectre d'action de la fosfomycine est large dont de nombreuses bactéries à Gram positif, Gram négatif et des anaérobies. Son effet est lentement bactéricide par altération de l'intégrité de la paroi.

Peu résorbée au niveau digestif, la fosfomycine présente une bonne diffusion tissulaire (dont LCR, os, et poumons) et est éliminée sous forme active dans les urines. Aussi, il existe des résistances naturelles et acquises à prendre en compte.

6. Mécanismes de résistance

a) *Résistance naturelle : modification de l'antibiotique*

Il existe une résistance naturelle notamment chez les micro-organismes producteurs de fosfomycine (comme chez *M. tuberculosis* et *Chlamydia*). Elle est due à la présence d'enzymes qui inactivent la fosfomycine.

Une bactérie peut aussi être naturellement résistante si elle ne possède pas le système de transport inductible du glucose-6-phosphate.

b) *Résistance chromosomique*

L'expression des deux modes de transport UhpT et GlpT est induite par leur substrat, respectivement le G6P et le glycérol-3-phosphate et requièrent la présence d'AMPc-CRP. Des mutations sur l'un des gènes codant pour ces protéines induit une diminution de l'efficacité de la fosfomycine donc une résistance à l'antibiotique.

Cependant la présence d'un système de transport fonctionnel UhpT G6P inductible surmonte fréquemment les résistances par mutations de la GlpT.

De plus, il existe de rares résistances dues à la modification du site Cystéine de MurA ce qui conduit à une diminution de l'affinité de la fosfomycine pour sa cible.

c) *Résistance plasmidique*

Cette résistance s'explique par l'inactivation de l'antibiotique par ouverture du noyau époxyde catalysée par une glutathion-S-transférase conduisant à la formation d'un composé

inactif. Il existe FosA, FosB et FosX, elles font toute partie de la superfamille des métalloenzymes (8).

7. Tolérance

La fosfomycine est très bien tolérée du fait de l'absence de l'enzyme cible dans les cellules humaines. Les effets indésirables rapportés sont des veinites lors de perfusions répétées et surtout des apports sodés importants pouvant être à l'origine d'œdème chez l'insuffisant cardiaque ou rénal et d'hypokaliémie par excrétion urinaire accrue, nécessitant une surveillance de l'électrolyte.

8. Utilisation actuelle et perspectives

a) *Utilisation actuelle*

Son utilisation principale est le traitement monodose de la cystite aiguë non compliquée de la femme jeune causée par un gram négatif tel que *E. coli*, sous forme de fosfomycine-trométhamol.

Par voie intraveineuse, la fosfomycine est utilisée dans certains pays, comme la France, à la posologie quotidienne de 100 à 200 mg/kg en 3 prises, mais doit toujours l'être en association. Dans ce contexte, elle est surtout utilisée dans les infections méningées et ostéoarticulaires à staphylocoques, notamment les *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM, en association à la céfotaxime ou à l'imipénème par exemple) et les infections à *Pseudomonas aeruginosa* (avec une β -lactamine ou une fluoroquinolone) (9). En effet, l'association fosfomycine- β -lactamine restaure une activité sur les SARM lorsque ceux-ci sont encore sensibles à la fosfomycine, ceci est expliqué par le fait que la fosfomycine réduit la quantité de protéines liant aux pénicillines (PLP inductibles), surtout la PLP2a responsable de la résistance à la méthicilline (10). Les indications de la fosfomycine tendent à s'élargir du fait de l'émergence de souches bactériennes multirésistantes telles que les SARM et les BLSE.

En résumé, la fosfomycine disodique IV est indiquée pour le traitement des infections suivantes chez les adultes et les enfants, y compris les nouveau-nés: ostéomyélite aiguë, infections urinaires compliquées, infections des voies respiratoires inférieures nosocomiales, méningite bactérienne, bactériémie qui se produit ou qui est suspectée de se produire en association avec l'une des infections précédentes.

b) Perspectives

La fosfomycine intéresse de plus en plus les cliniciens afin d'éviter l'utilisation d'antibiotiques dits de « réserve » ou de donner une option supplémentaire aux cas d'infection avec un faible choix antibiotique.

Par exemple, en 2000, une étude a démontré l'efficacité de l'utilisation d'une association fosfomycine/méropénème en cas de sepsis, ainsi que celle de la combinaison amoxicilline-acide clavulanique/fosfomycine pour les pieds diabétiques présentant des phlegmons. De plus, cette même étude suggère, pour les patients allergiques aux pénicilles et céphalosporines, d'associer la fosfomycine à une quinolone, ou l'aztréonam ou encore la clindamycine (11).

De même, plusieurs études montrent une efficacité d'une association de la fosfomycine avec la clindamycine, ceftriaxone ou l'amoxicilline-acide clavulanique pour traiter des spondylodiscites. D'ailleurs, la fosfomycine pourrait jouer un rôle dans le traitement des infections post-chirurgie orthopédique qui est devenue très courante.

Par ailleurs, en pédiatrie, une étude de 1988 avait comparé l'efficacité d'un traitement parentéral par céfotaxime et par fosfomycine pour des ostéomyélites hématogènes. Le traitement par la fosfomycine est apparu comme étant plus court et aussi efficace (12). Dans ce contexte, les pathogènes les plus retrouvés étaient *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative. Une autre étude en 2009 est venue conforter les résultats de celle-ci en rapportant que la fosfomycine permettrait en effet de réduire la prescription de glycopeptides chez les patients en oncopédiatrie (13).

Ainsi, en France, l'utilisation du sel disodique de fosfomycine pour des infections sévères en association est bien connue depuis une vingtaine d'années. Pourtant, aux Etats-Unis, l'utilisation de la fosfomycine reste spécifique au traitement de l'infection urinaire par voie orale.

La fosfomycine, connue depuis des décennies, reste efficace contre de nombreuses bactéries gram négatif et gram positif dont des bactéries multirésistantes. Ceci est dû à son utilisation restreinte (par voie orale pour les infections urinaires). Pourtant la croissance de résistance de *S. aureus* (SAMR) et de *E. coli* (BLSE) nécessite de plus en plus de prescriptions d'antibiotiques et devrait nous conduire à reconsidérer la fosfomycine comme une thérapeutique alternative.

Ainsi, le clinicien a besoin de s'appuyer sur des concentrations critiques pour savoir s'il peut traiter son patient par de la fosfomycine, et donc des diamètres critiques pour le biologiste travaillant avec des milieux gélosés.

c) *Difficultés à déterminer des concentrations critiques*

Le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et l'European Committee on antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ont chacun publié des méthodes standardisées pour tester la sensibilité à la fosfomycine. Mais il est important de reconnaître qu'il y a des différences entre ces deux instances. D'une part, les espèces dont les CMI et les diamètres critiques sont donnés ne sont pas les mêmes, et pour la même espèce, les valeurs diffèrent aussi.

En effet, pour le CLSI, en 2015, les concentrations critiques (déterminées en dilution solide d'agar) existaient seulement pour *E. coli* et *E. faecalis* avec une CMI à 64 µg/mL, les souches résistantes ayant une CMI à 256 µg/mL, et uniquement dans le cas d'infections du tractus urinaire (14).

Quant à l'EUCAST, ils ont publié des concentrations critiques pour la fosfomycine parentérale pour les staphylocoques, entérobactériacées et *Pseudomonas sp* avec une CMI à 32 µg/ml (15) (Tableau 1).

Tableau 1 CMI de la fosfomycine CLSI et EUCAST

Susceptibility breakpoints for fosfomycin.

	MIC			Zone diameter			Notes
	Susceptible	Intermediate	Resistant	Susceptible	Intermediate	Resistant	
CLSI	≤64 µg/ml	128 µg/ml	≥256 µg/ml	≥16 mm	13–15 mm	≤12 mm	<i>E. coli</i> and <i>E. faecalis</i> urinary isolates (oral only)
EUCAST	≤32 µg/ml	–	>32 µg/ml	–	–	–	<i>Enterobacteriaceae</i> (oral and intravenous) and <i>Staphylococcus spp.</i> (intravenous only)

The medium should be supplemented with 25 µg/ml of glucose-6-phosphate for dilution methods.
The disk contains 200 µg of fosfomycin and 50 µg of glucose-6-phosphate.

Pour *Pseudomonas sp*, il n'y a ni concentrations critiques ni diamètres critiques pour la fosfomycine. Mais l'EUCAST nous informe que certaines infections ont été traitées par une association entre la fosfomycine et d'autres antibiotiques en s'aidant de résultats épidémiologiques seulement. L'intérêt des valeurs critiques pour *Pseudomonas sp* est donc moindre.

Enfin, le CLSI donnait des diamètres critiques, alors que l'EUCAST n'en donnait pas.

De plus, le CLSI et l'EUCAST précisent la méthode de détermination de la CMI : seule la méthode de dilution en gélose est acceptée, et non la microdilution.

En 2016, l'EUCAST ne publiait toujours pas de diamètres critiques pour la fosfomycine chez les staphylocoques, mais une concentration critique à 32 mg/L (souches sensibles si CMI ≤ 32 ; résistante si CMI > 32) était donnée pour la fosfomycine en voie intraveineuse (Tableau 3). Pourtant en 2013, le CASFM publiait des concentrations critiques et des diamètres critiques pour la fosfomycine 50 µg communes pour entérobactéries et staphylocoques. (Tableau 2)

Tableau 2 Concentrations et diamètres critiques de la fosfomycine 20 µg et de la lincomycine 15 µg, CASFM 2013

Antibiotiques	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Fosfomycine	50 µg + 50 µg G6P	≤ 32	>32	≥ 14	<14

Tableau 3 Concentrations critiques et diamètres critiques de la fosfomycine pour les staphylocoques, EUCAST 2016

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 6.0, valid from 2016-01-01

Staphylococcus spp.

Miscellaneous	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Fosfomycin iv	32 ³	32 ³		Note ^A	Note ^A	A. Use an MIC method.
Fosfomycin oral	-	-		-	-	

3. Fosfomycin MICs must be determined in the presence of glucose-6-phosphate (25 mg/L in the medium for broth and agar dilution methods). Follow the manufacturers' instructions for commercial systems.

En 2014, le CASFM emprunte les valeurs critiques du CLSI pour les entérobactéries. En 2014, le CASFM garde 32 mg/L pour *Staphylococcus sp*, sans diamètres critiques.

Notre travail a été d'aboutir à des courbes de répartitions des diamètres de disques en fonction des CMI sur *Staphylococcus sp* afin de pouvoir déterminer des diamètres critiques en utilisant de façon parallèle différentes méthodes de détermination de la CMI.

B. Généralités sur la lincomycine

1. Origine

La lincomycine a été isolée pour la première fois à Lincoln en 1955 à partir de cultures d'une nouvelle espèce de *Streptomyces* : *Streptomyces lincolnensis* et décrite par Mason en 1962 (16).

Cette nouvelle molécule était unique et n'était pas chimiquement proche d'autres antibiotiques à sa découverte. Le produit de base est obtenu par fermentation de la souche. Le chlorhydrate de lincomycine est un cristal blanc solide $C_{18}H_{34}N_2O_6S \cdot HCl_2 \cdot H_2O$. La lincomycine est très soluble dans l'eau et soluble dans le méthanol et l'éthanol. La 7-chloro-7-désoxylincomycine ou clindamycine provient de la substitution d'un radical OH en C7 (Figure 4) (17).

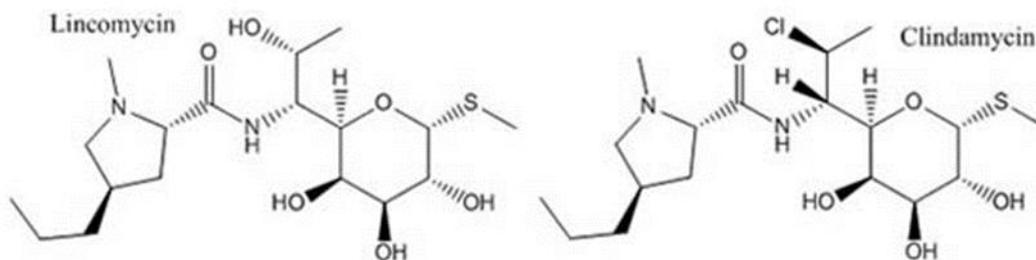


Figure 4 Structure chimique des lincosamides

Leur mécanisme d'action est très proche des macrolides.

2. Mécanisme d'action

Les lincosamides font partie du groupe des MLS (Macrolides Lincosamides Streptogramines). Ils inhibent la synthèse des protéines bactériennes à la suite de la fixation de l'antibiotique au niveau des sous-unités 50S des ribosomes (18).

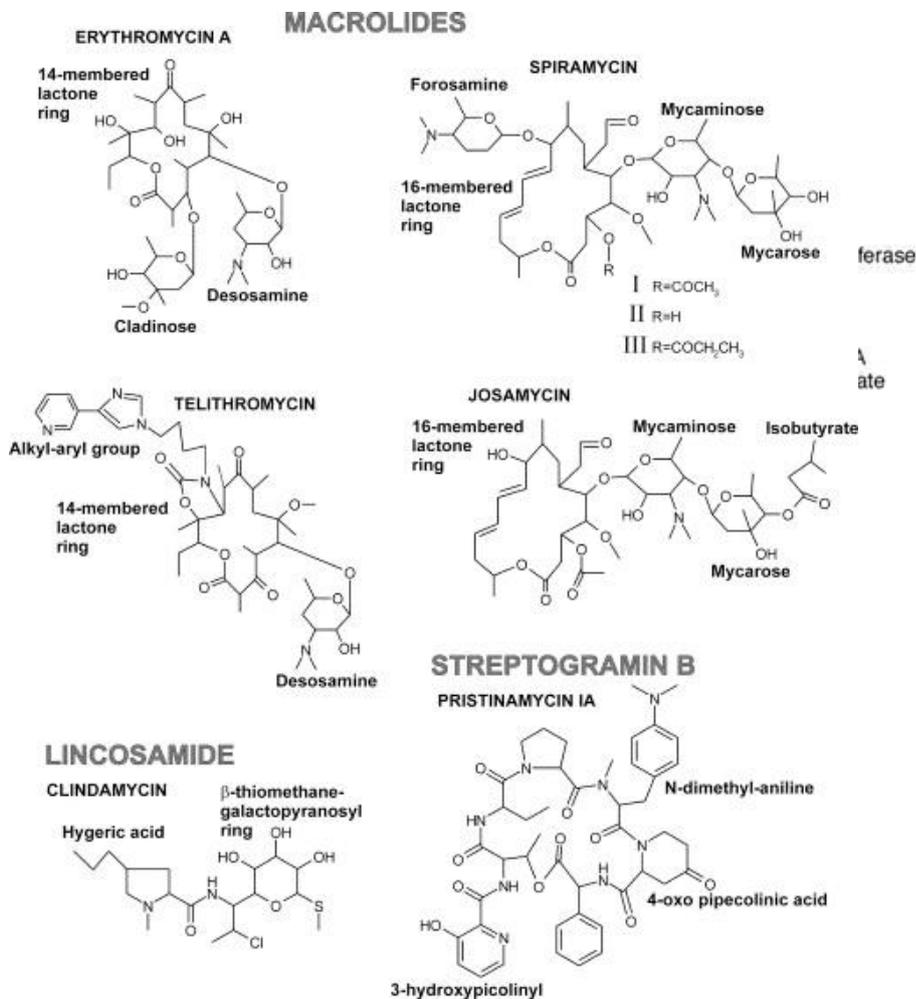


Figure 5 Comparaison des différentes structures chimiques des MLS

Les MLS ont un mode d'action très proche mais ont une structure chimique différente entre eux (Figure 5) (19).

Ces antibiotiques sont bactériostatiques et ont un effet post-antibiotique. De plus, les spectres d'action ne sont pas les mêmes au sein du groupe.

3. Spectre d'activité

La lincomycine a un spectre étroit, elle est efficace seulement sur les bactéries Gram positif.

- Les espèces habituellement sensibles (CMI < 2 mg/L) sont les SASM, streptocoques, *Corynebacterium diphtheriae*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter*, *Gardnarella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium perfringens*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Prevotella*, *Fusobacterium*.
- Les espèces résistantes (CMI > 8 mg/L) sont les SARM, entérocoques, *Neisseria*, *Corynebacterium jeikeium*, *Listeria*, entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Legionella*, *Nocardia*, *Ureaplasma*, *Clostridium difficile*, *Branhamella catarrhalis*.

Le spectre de la clindamycine est le même que celui de la lincomycine mais l'activité de la lincomycine est toujours inférieure. En effet, la clindamycine a parfois une activité bactéricide, de plus elle a une cinétique plus intéressante.

4. Pharmacologie et formulation

Après absorption orale, la clindamycine a une résorption intestinale bien supérieure à la lincomycine. Après une prise orale de 300 mg de clindamycine, on obtient des taux sanguins bactéricides dès la 25^{ème} minute, et cette concentration augmente de façon linéaire avec la dose ingérée.

Par voie intramusculaire et par voie intraveineuse, les pics sériques sont respectivement atteints en 1 à 3 heures et en 30 à 60 minutes.

Les lincosamides ont une très bonne diffusion dans tous les tissus et liquides biologiques dont l'os spongieux. Par contre, la diffusion est très mauvaise dans le LCR mais bonne dans le pus d'abcès cérébraux.

La clindamycine (phosphate) et la lincomycine peuvent être administrés par voie intramusculaire ou par perfusion intraveineuse lente. Il existe une solution pour application locale à base de clindamycine pour traiter l'acné papulopustuleuse.

Leur spectre d'activité et leur excellente diffusion tissulaire expliquent les indications usuelles des lincomycines.

5. Effets indésirables

Il faut noter quelques effets indésirables. On observe des troubles digestifs, des cas de colites « pseudo-membraneuses », des troubles cutanés (5-10%), hématologiques rares, hépatiques avec augmentation des transaminases, et cardiovasculaires, ce qui contre-indique formellement les injections de lincosamides en bolus et impose le respect d'un temps de perfusion unitaire d'au moins 20 minutes.

6. Indications des lincomycines

En Europe, on utilise préférentiellement la clindamycine car elle est plus active, mieux tolérée et mieux absorbée. En effet, au Centre Hospitalier d'Aix en Provence, seule la clindamycine est prescrite. Elle est préconisée au cours des infections à bactéries anaérobies résistantes à la pénicilline et représente une alternative dans le traitement des infections staphylococciques et streptococciques ainsi qu'en antibioprofylaxie.

Les principales indications sont :

- Infections cutanées et musculaires
- Infections de la sphère ORL
- Infections ostéoarticulaires
- Infection de l'ulcère du pied diabétique
- Infections intra-abdominales
- Infections gynécologiques
- Infections pulmonaires

7. Mécanisme de résistance

a) *Résistance naturelle*

Tous les bacilles Gram négatif aérobies sont résistants ; parmi les bactéries à Gram positif, les entérocoques sont naturellement résistants aux lincosamides.

b) *Résistance acquise*

Il y a trois grands types de mécanismes de résistance acquise aux MLS(20).

- Modification de la cible

La modification de la cible ribosomale entraîne une résistance par diminution d'affinité à la cible. Elle est constitutive par production de méthylase codée par des gènes plasmidiques ou des transposons, ou bien par mutation de l'ARN ou de protéines ribosomales. On parle de phénotype MLS_B. En effet, cette résistance est due à la méthylation d'une seule adénine à la position 2058 de l'ARN ribosomal 23S, adénine qui joue un rôle clé dans la fixation des MLS_B. Ces souches sont donc résistantes à toute la famille des MLS. De nombreux articles évoquent la corrélation entre cette résistance et la résistance à l'oxacilline.

- Modification de l'antibiotique

Plusieurs enzymes sont capables d'inactiver les MLS. Une enzyme donnée ne va affecter que les molécules de structures apparentées, on obtiendra un profil de résistance dissocié entre les MLS. Les lincosamides sont inactivés par des nucléotidyltransférases (classes de gènes *lnu*).

- Efflux

Chez les bactéries à Gram positif, la résistance par efflux actif peut être due à deux classes de pompes, appartenant à la famille des ATP-binding cassette (ABC) transporteurs et de la Major Facilitator Superfamily (MFS). Chez les staphylocoques, un ABC transporteur codé par le gène plasmidique *msr(A)* a été décrit.

8. Intérêt de la lincomycine pour la détermination de mécanisme de résistance chez les staphylocoques

On retrouve les même phénotypes et génotypes chez *S. aureus* et les staphylocoques non aureus, seule leur fréquence diffère (21).

a) *Phénotype MLS_B (génotype erm)*

Chez les staphylocoques, ce phénotype résulte de l'expression des gènes *erm(A)*, *erm(C)*, plus rarement *erm(B)*. Pour les deux premiers génotypes, le phénotype résultant est le même, on aboutira à une résistance MLS_B dissociée. En fait la résistance s'exprimera vis-à-vis des macrolides qui induisent la production de méthylase, c'est-à-dire les noyaux à 14 et 15 atomes (érythromycine, roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine et azithromycine ; pas la télithromycine qui est non inducteur). Les autres antibiotiques MLS restent actifs car non inducteurs. (Figure 6) (22).



Figure 6 Phénotype MLS_B (ER : érythromycine, CD clindamycine)

Sur l'antibiogramme, cela se traduit par un aplatissement de la zone d'inhibition autour du disque de lincomycine, de clindamycine, spiramycine, ou josamycine en regard du disque d'érythromycine ; image en forme de D. Ceci est dû à la diffusion en gradient décroissant de l'érythromycine dans la gélose, la concentration subinhibitrice présente à distance du disque suffit à induire la production de méthylase et la résistance aux MLS_B inducteurs.

L'expression constitutive se traduit par la résistance à l'ensemble des MLS_B. Pour ce phénotype, à l'antibiogramme, on aura une résistance de haut niveau à la clindamycine ou à la lincomycine avec résistance à l'érythromycine.

Ces phénotypes sont aussi bien identifiés sur méthodes automatisées telle que Phoenix (23) et VITEK (24), l'utilisation d'un puit contenant de la clindamycine et une concentration inductrice d'érythromycine permet de détecter le phénotype inductible.

Le CLSI recommande de rechercher l'image d'antagonisme à l'aide d'un disque de clindamycine (2 µg) et d'érythromycine (15 µg) espacés de 15 à 20 mm. En pratique, au laboratoire, la lincomycine est préférée à la clindamycine afin de ne pas à avoir à rapprocher autant les disques d'antibiotiques.

Si le phénotype MLS_B est retrouvé, l'interprétation est différente pour le CASFM et l'EUCAST.

D'après le CASFM, la souche doit être rendue sensible à la clindamycine et recommande d'avertir du risque de sélection de mutants résistants et d'éviter l'usage des lincosamides dans les infections sévères.

Pour l'EUCAST, la souche doit être rendue résistante avec possibilité d'utiliser pour des traitements courts pour des lésions cutanées non sévères et des tissus mous, car il n'y pas de développement de résistance dans ces indications.

b) Phénotype MS_B (génotype $msr(A)$)

Ce phénotype est dû chez les staphylocoques à un efflux actif de l'antibiotique lié au gène $msr(A)$. La résistance se limite aux macrolides à 14 et 15 atomes et les streptogramines B car ce sont les seuls substrats de la pompe concernée.

A l'antibiogramme sur gélose, on observe une résistance modérée à l'érythromycine, différente du phénotype MLS_B par une absence d'image en D.

c) Phénotype L (génotype $lnu(A)$)

Le phénotype L correspond à une acquisition de nucléotidyltransférases n'inactivant que les lincosamides. Les souches sont résistantes à la lincomycine mais restent sensibles à la clindamycine. Il n'y a pas de recommandations des comités nationaux mais il peut être acceptable de modifier la catégorisation « Sensible » de la clindamycine en « Intermédiaire ».

d) Phénotype LS_A

Ce mécanisme donne une résistance de bas niveau à la lincomycine, clindamycine et aux streptogramines A. Ces souches peuvent être rendues « I » ou « R » pour la clindamycine ou la lincomycine, mais ce phénotype peut être confondu avec le phénotype L.

e) *Phénotype S*

Le phénotype S se traduit par une résistance isolée aux streptogramines.

Pour finir, l'étude de l'érythromycine (ou azithromycine, clarythromycine) et de la lincomycine (ou clindamycine) est suffisante pour un antibiogramme standard. Au laboratoire de bactériologie du CH d'Aix, le disque de lincomycine a été choisi pour rechercher une induction, afin d'éviter d'avoir à déplacer le disque de clindamycine.

Il n'existe pas de diamètres critiques pour la lincomycine ni actuellement, ni en préparation (EUCAST et CLSI). Pourtant, de nombreux laboratoires utilisent la lincomycine sur les antibiogrammes de staphylocoques pour détecter certains phénotypes de résistance. D'ailleurs, la lincomycine peut jouer elle-même un rôle dans le traitement d'infection bactérienne, il serait alors intéressant de pouvoir interpréter les résultats d'un antibiogramme en pouvant aller jusqu'à conclure « S », « I » ou « R » à la lincomycine. Notre travail a consisté à déterminer des diamètres critiques à partir de courbes de répartition des diamètres en fonction des CMI.

Pour la lincomycine, il n'existe pas de diamètres critiques pour les staphylocoques (EUCAST et CLSI). Mais en 2013, le CASFM publiait des concentrations et des diamètres critiques pour la lincomycine 15 µg (Tableau 4).

Tableau 4 Concentrations et diamètres critiques pour la lincomycine, CASFM 2013

Antibiotiques	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Lincomycine	15 µg	≤ 2	> 8	≥ 21	<17

C. Détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique

1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (25)

La catégorisation d'une souche bactérienne en sensible, intermédiaire, ou résistante à un antibiotique est basée sur les valeurs critiques déterminées par les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les valeurs critiques sont déterminées par des comités tels que l'EUCAST pour l'Europe. Elles sont déterminées à l'aide de trois critères :

- la distribution des CMI des populations bactériennes
- la pharmacocinétique de l'antibiotique, en considérant les doses usuelles et maximales pour les différents modes d'administration
- la corrélation entre la clinique et les résultats bactériologiques pour les différentes indications thérapeutiques

Pour le cas le plus simple, on peut imaginer une distribution bimodale des CMI pour une espèce bactérienne. Deux populations se détacheraient : une aurait des CMI basses et serait sensible, et l'autre aurait des CMI élevées et serait considérée comme résistante. Et il n'y aurait pas de souches entre ces deux populations.

Pourtant, en réalité, ce cas est plutôt rare. On observe plutôt une distribution multimodale à cause des multiples mécanismes de résistance possibles.

2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) (26)

La concentration minimale bactéricide est la plus petite concentration d'antibiotique qui laisse un faible pourcentage de bactéries survivantes.

La CMB est déterminée secondairement à la CMI, on dénombre les bactéries survivantes en présence de concentrations d'antibiotique supérieures à la CMI. On utilise la méthode de dilution en milieu liquide. D'après Woolfrey et Lally (27), il serait préférable d'utiliser la méthode en microdilution plutôt qu'en macrodilution, ceci permettrait de diminuer les variations de résultats dues à la technique.

Le rapport CMB/CMI permet de savoir si l'antibiotique a un effet bactéricide (CMB/CMI inférieur à 2) ou bactériostatique (CMB/CMI très supérieur à 2) et on définit une souche comme tolérante lorsque que son rapport CMB/CMI est supérieur à 32.

Pourtant dans une autre étude, Woolfrey et Lally (28) décrivent la présence d'un effet paradoxal rendant difficile le calcul et l'interprétation de la CMB de l'oxacilline sur des

souches de *S. aureus*. En effet, avec certaines souches, le pourcentage de survivants est inférieur à 0.1% pour des concentrations proches de la CMI et supérieur pour des concentrations plus élevées (« saut de puits »). Quelle valeur de CMB choisir ?

Tout de même, Pelletier recommandent d'utiliser la CMI plutôt que la CMB du fait des trop grandes variations observées dans la détermination des CMB et le manque de reproductibilité intra et inter-laboratoire. Pour eux, ce critère ne peut définir l'activité bactéricide d'un antibiotique (29).

Autrefois fastidieuse, la méthode de la CMB devient facile et peu coûteuse grâce à l'utilisation de la détermination des CMI en microdilution dans des galeries commercialisées prêtes à l'emploi.

3. Détermination de diamètres critiques (30)

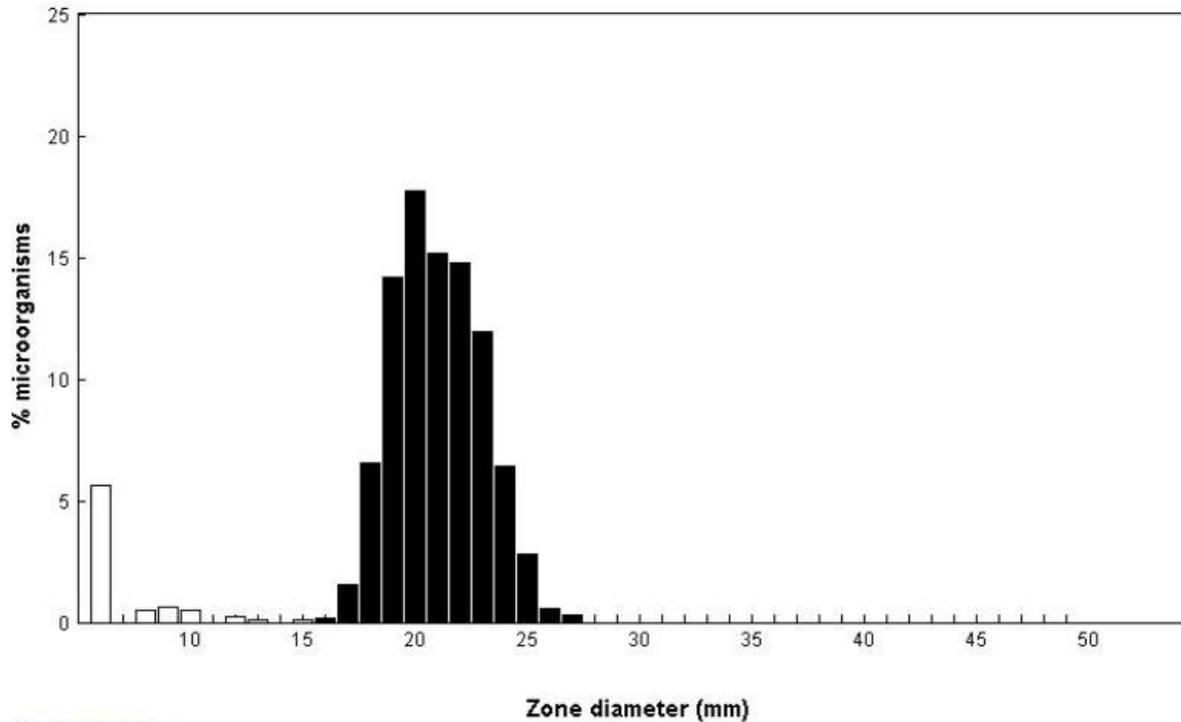
La méthode de diffusion en gélose par des disques imprégnés d'antibiotique est la méthode la plus ancienne pour tester la sensibilité d'un germe à un antibiotique et reste la méthode la plus utilisée dans les laboratoires de routine.

Cette méthode est influencée par la variabilité des disques des différents fabricants et même entre les lots d'un même fournisseur. La puissance du disque et la gélose Mueller Hinton conditionne les résultats de diffusion de l'antibiotique. Pour permettre la coexistence de différents fournisseurs sur le marché, il est nécessaire d'accepter une certaine variabilité mais ceci doit rester limité et contrôlé.

D'après l'EUCAST, lors de l'arrivée d'un nouvel antibiotique sur le marché, les fabricants doivent vérifier que toutes les souches sauvages donnent une zone d'inhibition de diamètre entre 15 et 35 mm. Un diamètre plus petit rendrait difficile la distinction entre les souches de bas niveau de résistance et les souches à haut niveau de résistance. Et un trop grand diamètre rendrait difficile la mise en place de plusieurs disques les uns à côté des autres sur une même gélose. Ainsi, pour l'EUCAST, un disque correct produit une distribution de zones d'inhibition comme la Figure 7.

Gentamicin / Escherichia coli
International wild type zone diameter distribution - Reference database 2014-08-22
EUCAST disk diffusion method

Distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance



Disk content: 10

Epidemiological cut-off (ECOFF): 16 mm (MIC = 2 mg/L)

Wildtype (WT) organisms: \geq 16 mm (MIC = 2 mg/L)

3665 observations (6 data sources)

Figure 7 Exemple d'une distribution des diamètres avec un disque de puissance idéale.

Ensuite, il faut vérifier la reproductibilité d'un même lot de disques, sur un test de plus de 20 disques, on doit retrouver des diamètres avec +/- 1 mm de variation.

De plus, il est nécessaire de vérifier la reproductibilité entre les fabricants des disques.

Enfin, l'EUCAST définit quelles seront les souches utilisées comme contrôles de qualité, ce sont des espèces qui seront amenées à être la cible de l'antibiotique testé en clinique.

Pour déterminer des diamètres de zone d'inhibition critiques pour un nouvel antibiotique, il est indispensable d'établir une corrélation entre les CMI et les diamètres. Au moins 100 souches doivent être testées, incluant souches sauvages et souches résistantes. Au moins 50% des souches testées doivent être dépourvues de mécanismes de résistance vis-à-vis de l'antibiotique. Et un maximum de souches doit avoir des CMI proches de la concentration critique déterminée par l'EUCAST. La méthode des disques doit utiliser une gélose Mueller Hinton et au moins deux fournisseurs différents. Au moins une souche contrôle de qualité doit être incluse dans les tests pour s'assurer du bon déroulement de la procédure. Et on doit aussi

tester 10 souches contrôles en parallèle avec le même matériel. Finalement, une distribution des diamètres de zones d'inhibition retrouvées doit être établie. Ceci doit être composé de 50 à 100 souches pour chaque espèce testée et venant d'au moins quatre laboratoires différents.

Les courbes de corrélation CMI et diamètres d'inhibition sont présentées en deux formats sur le site de l'EUCAST dont l'un représente les diamètres en barres qui sont subdivisés avec chaque CMI représentée par une couleur pour chaque CMI ; en abscisse les diamètres, en ordonnée le nombre de souches (31).

Mais, actuellement, l'EUCAST n'utilise plus les courbes de corrélation mais des courbes de répartition des diamètres en fonction des CMI. En effet, les courbes de corrélation nécessitent un très grand nombre de souches.

II. MATERIEL ET METHODE

Nous avons effectué cette étude sur 93 souches de staphylocoques.

A. Sélection des souches

Nous avons fait une extraction de tous les résultats des diamètres des disques fosfomycine 200 µg et lincomycine 15 µg des staphylocoques entre le 1^{er} janvier 2012 et le 28 juin 2016 au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier d'Aix en Provence, ceci représentait 2438 souches. A noter qu'à partir du 1^{er} février 2015, le laboratoire est passé du CASFM 2013 (inoculum 0.5MF dilué au 1/10^{ème}) à l'EUCAST 2015 (inoculum à 0.5MF).

Critères de sélection

Dans un souci pratique, nous avons décidé de sélectionner 45 souches *S. aureus* et 45 souches non aureus. En effet, pour la détermination de CMI en milieu gélosé, il est possible de tester 96 souches simultanément sur une gélose ; et nous avons inclus des contrôles de qualité.

Pour sélectionner ces 90 souches, nous avons voulu pouvoir représenter l'ensemble des sensibilités possibles pour chaque antibiotique et se concentrer sur les zones où étaient supposés être les diamètres critiques en référence aux anciennes publications du CASFM (Figure 8 et 9).

Ainsi, nous avons choisi de sélectionner des souches ayant des diamètres entre 6 et 40 mm en augmentant le nombre de souches proches du diamètre critique. Pour la fosfomycine, nous nous sommes attachés à sélectionner un maximum de souches ayant un diamètre entre 11 et 23 mm. Et pour la lincomycine, nous nous sommes concentrés sur les souches ayant des diamètres entre 15 et 21 mm.

De plus, pour valider nos méthodes, il a fallu choisir des contrôles. Nous avons décidé de prendre des contrôles de qualité utilisés au laboratoire qui ont des CMI déterminées par l'EUCAST et le CLSI.

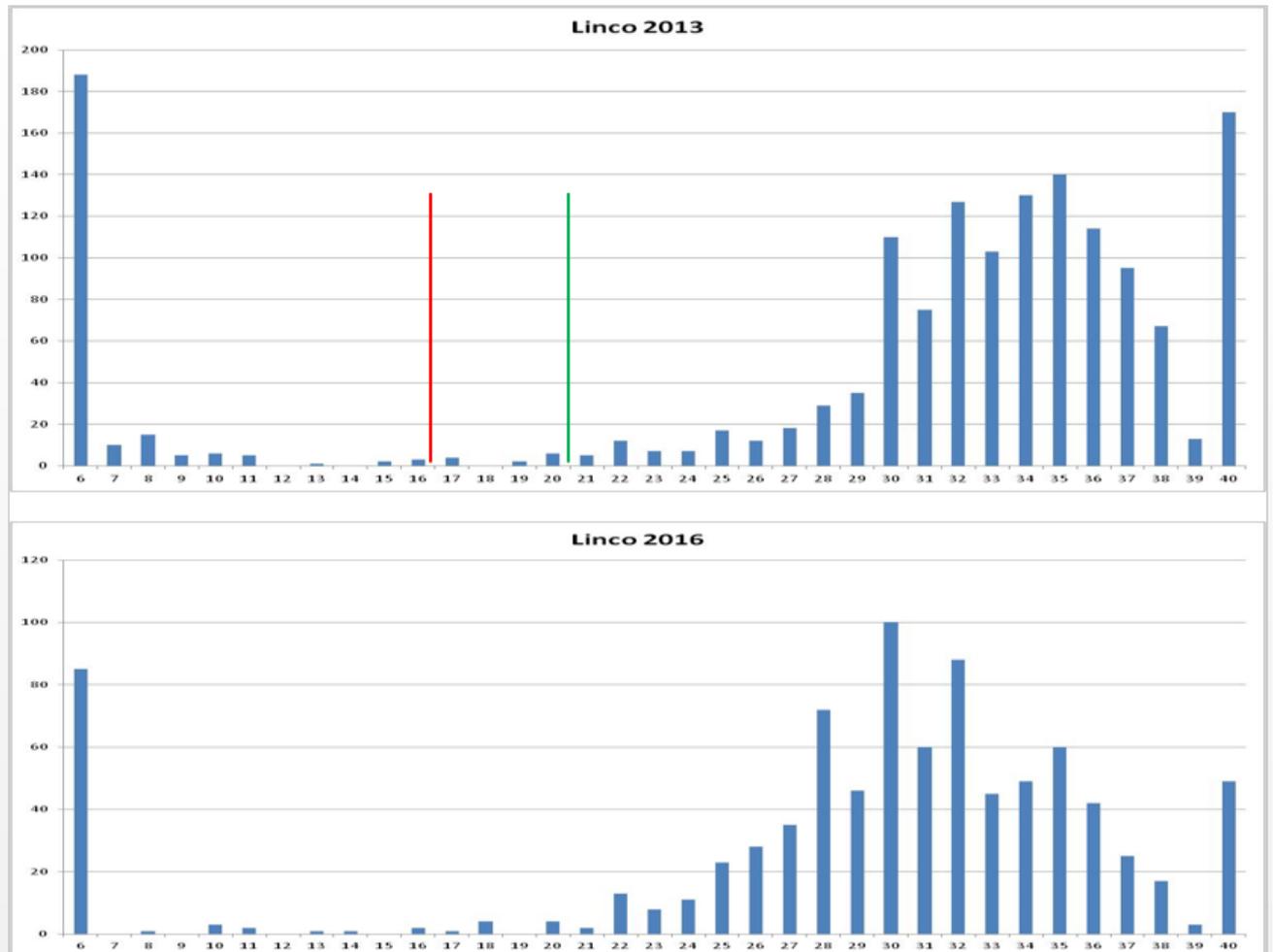


Figure 8 Répartition des diamètres des staphylocoques pour la lincomycine 2013 et 2016 (2016 : pas de diamètres critiques.)

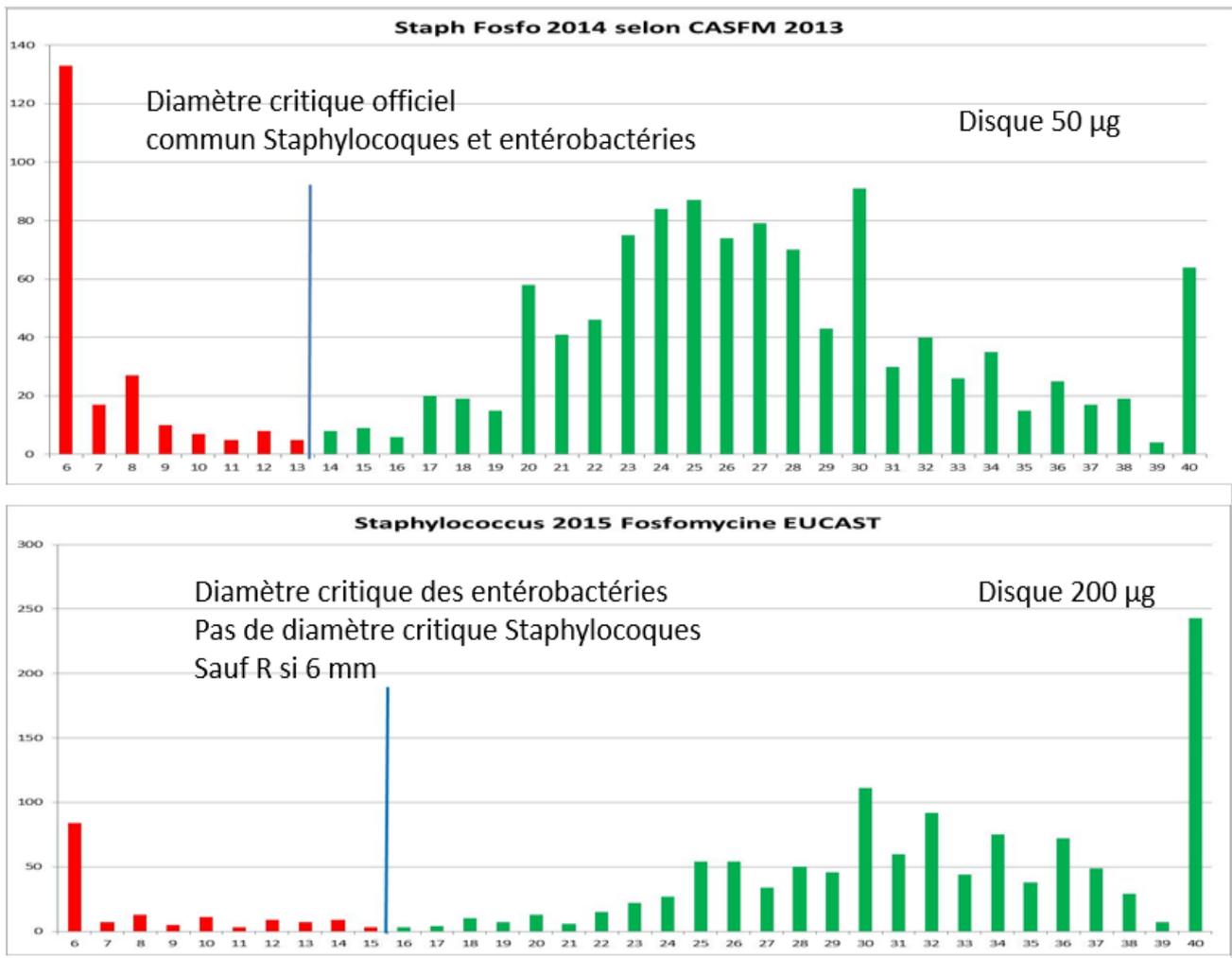
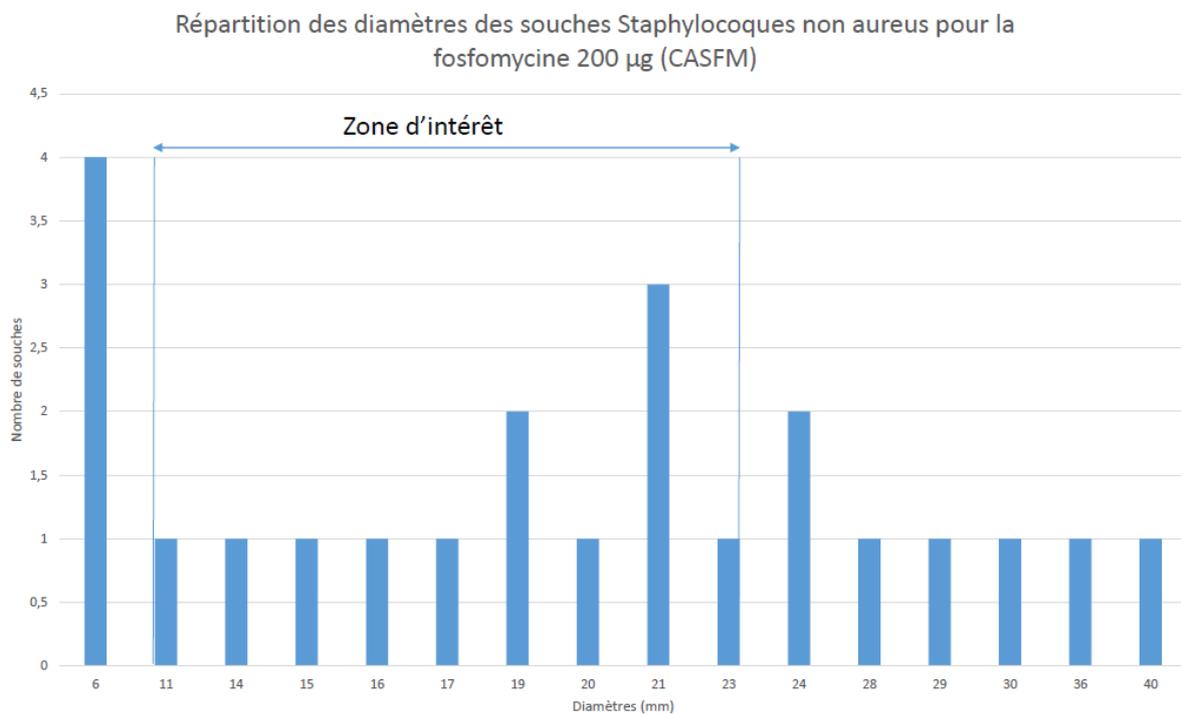
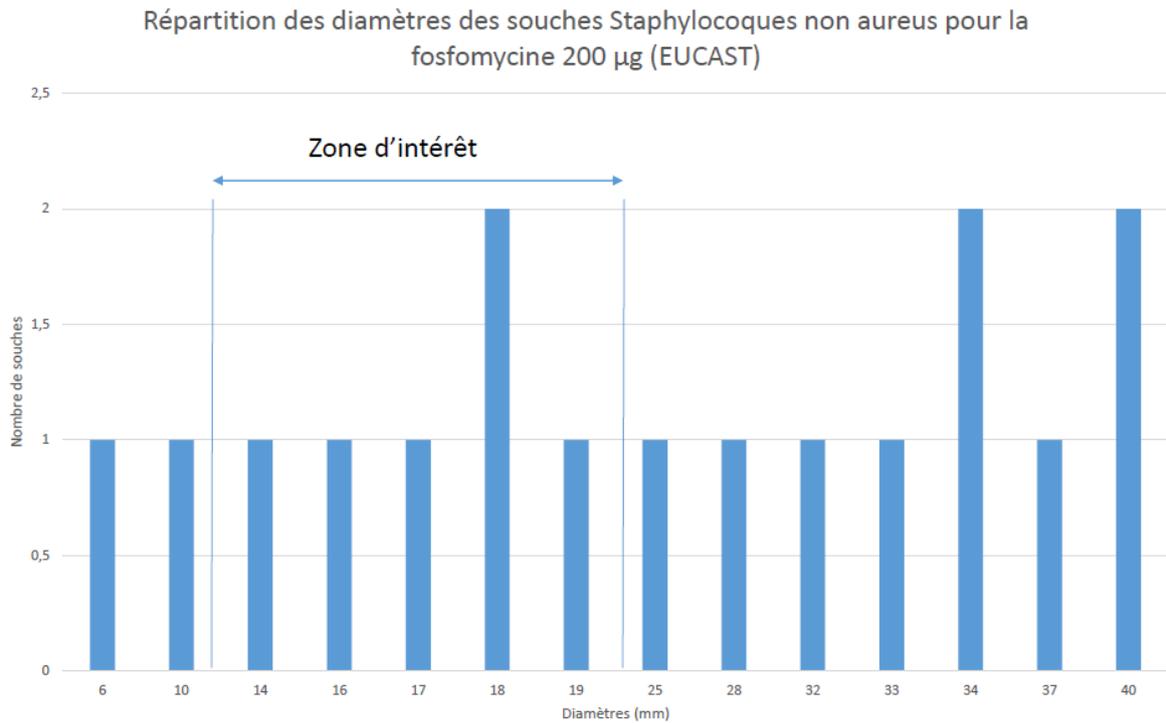


Figure 9 Répartition des diamètres de fosfomycine chez les staphylocoques selon le CASFM 2013 et l'EUCAST 2015

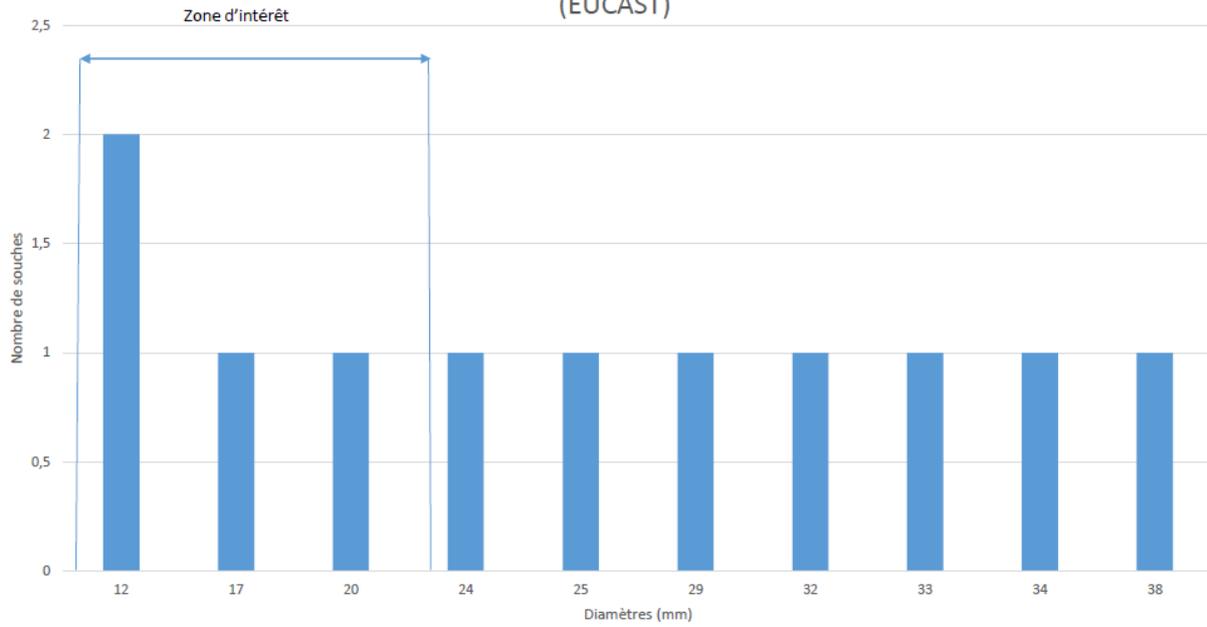
Nous avons choisi :

	Lincomycine (CMI mg/L)		Fosfomycine (CMI mg/L)	
	EUCAST 2016	CLSI 2014	EUCAST 2016	CLSI 2014
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	/	/	0.5 à 4	0,5 à 4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	/	/	0.5 à 2	0,5 à 2
<i>P. aeruginosa</i> 27853	/	/	2 à 8	2 à 8
<i>E. faecalis</i> 29212	16 à 64	/	/	32 à 128
<i>S. aureus</i> 25923	0,5 à 2	/	/	/

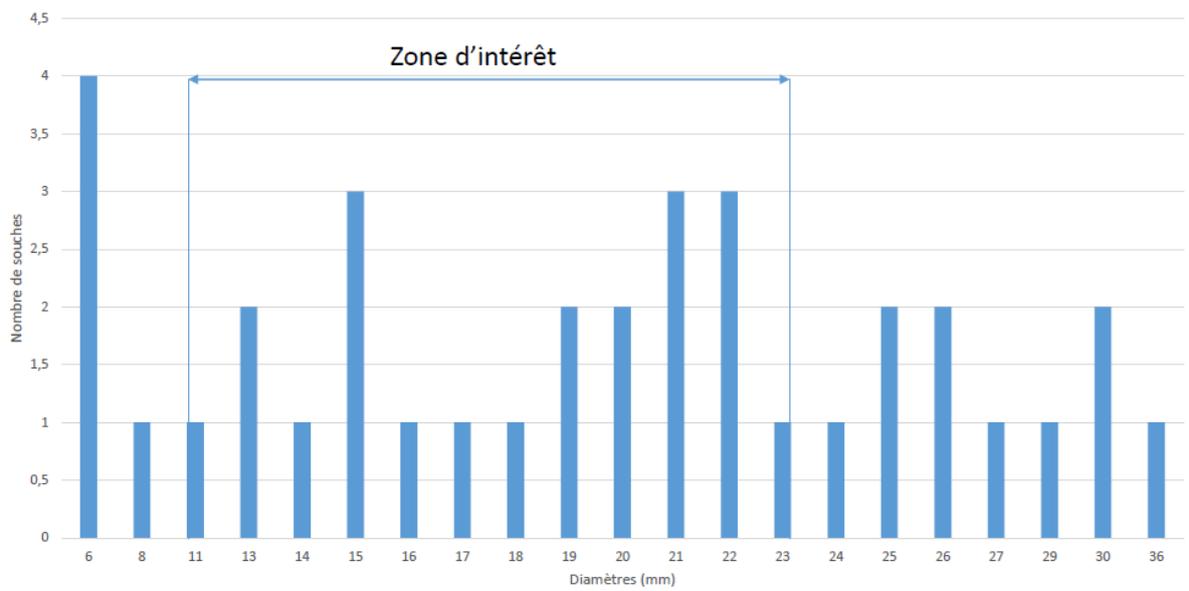
Ainsi, nous avons obtenu un soucier de 98 souches, contrôles compris. Il est composé de 48 *S. aureus* et 45 Staphylocoques non aureus (Annexe 1).



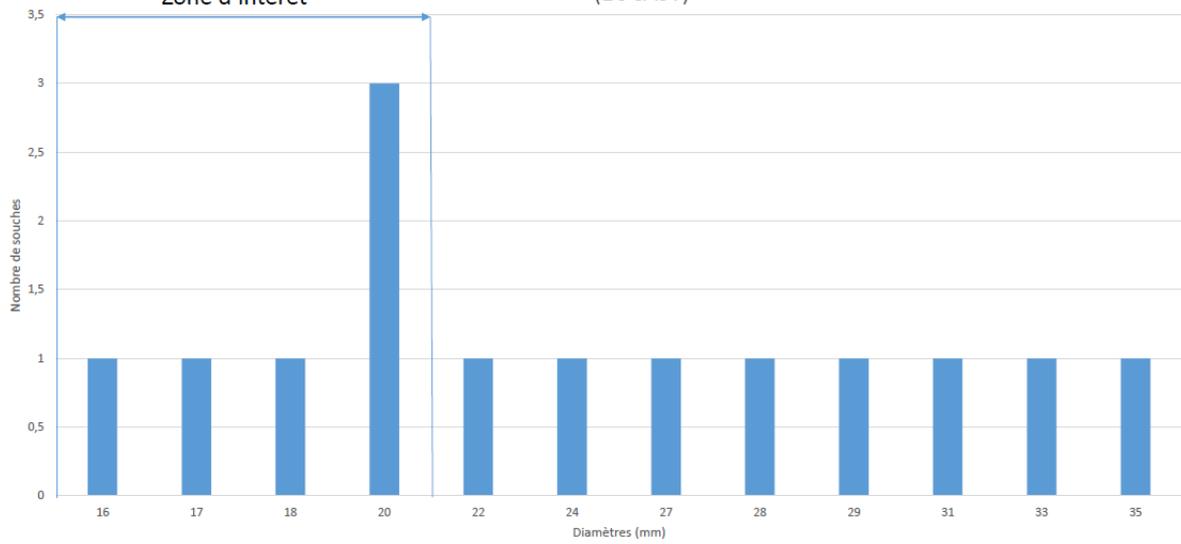
Répartition des diamètres des souches *S. aureus* pour la fosfomycine 200 µg (EUCAST)



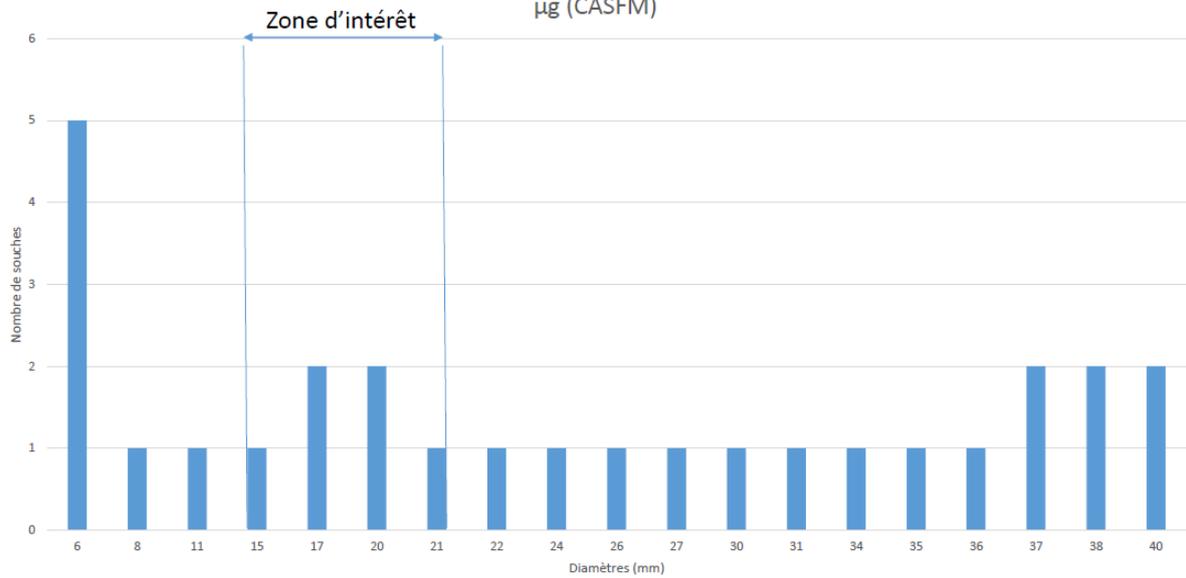
Répartition des diamètres des souches *S. aureus* pour la fosfomycine 200 µg (CASFM)

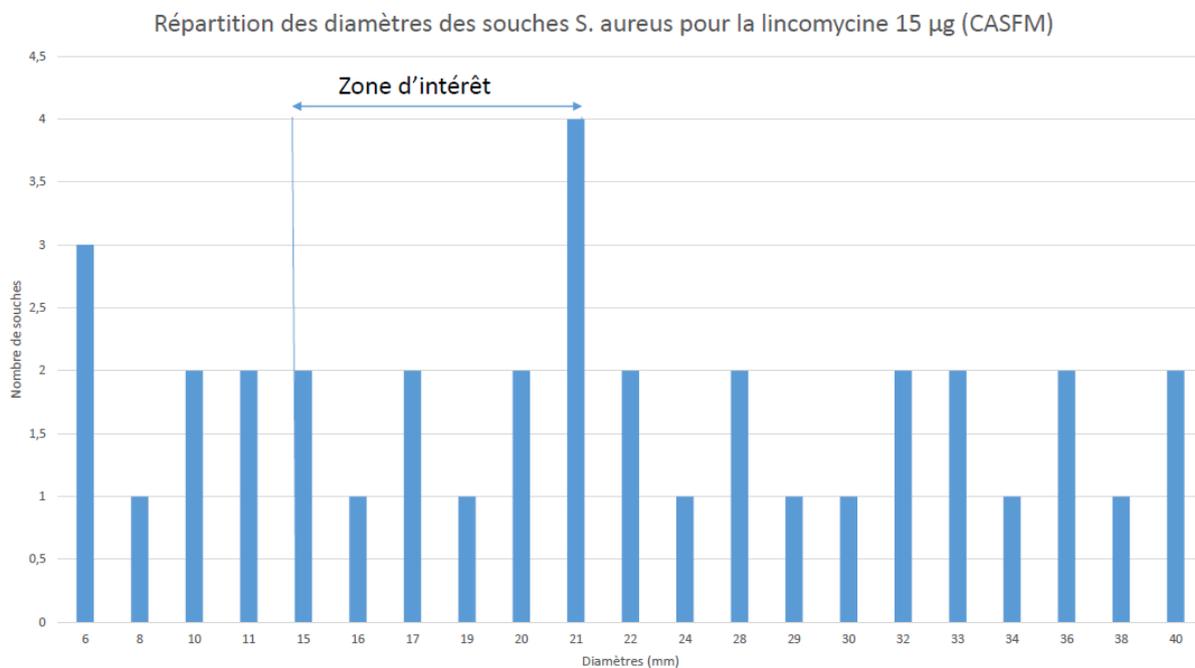
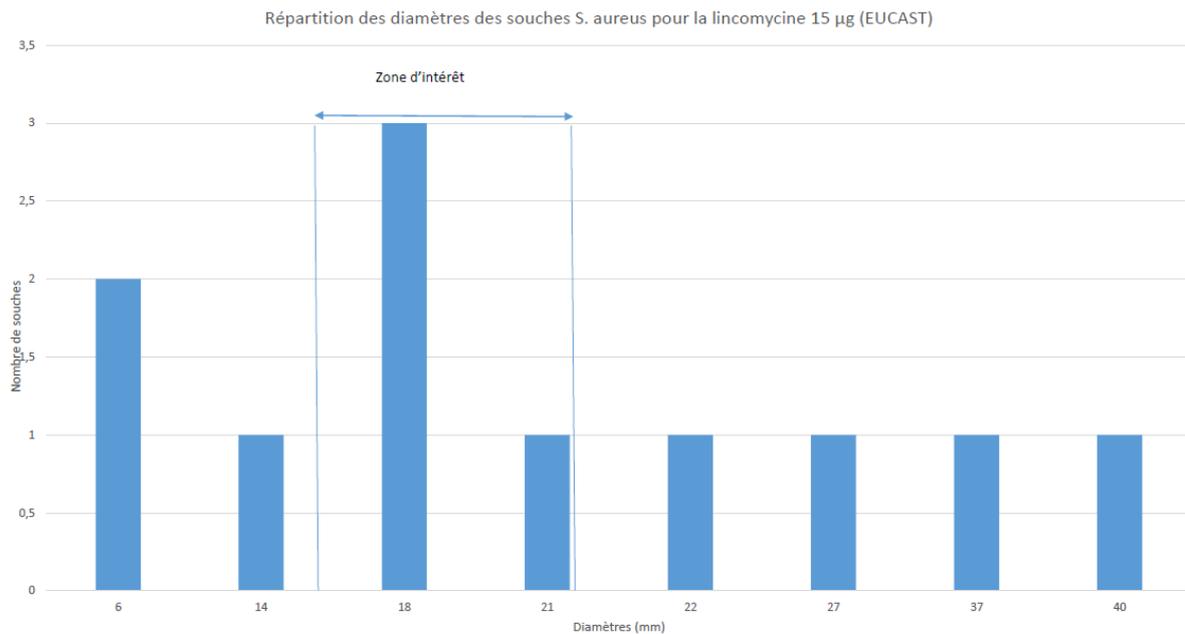


Répartition des diamètres des souches Staphylocoques non aureus pour la lincomycine 15 µg (EUCAST)



Répartition des diamètres des souches Staphylocoques non aureus pour la lincomycine 15 µg (CASFM)





B. Détermination des CMI

Pour rappel, la CMI est la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien (en mg/L) qui, dans des conditions *in vitro* définies, inhibe l'apparition d'une croissance visible d'un micro-organisme au cours d'une période définie.

Pour les méthodes suivantes, il a d'abord fallu désoucheur les souches sélectionnées précédemment en les repiquant sur gélose au sang. Après une pousse d'environ 18h, nous avons commencé à procéder aux manipulations après avoir vérifié que tous les isoléments étaient bien purs et viables.

Ensuite, nous avons préparé les suspensions de chacune des souches à 0.5 MF dans une solution à 0.9% de NaCl. Ces suspensions ont servi pour la microdilution et la dilution en gélose.

Pour les déterminations de CMI en microdilution et en dilution en milieu gélosé, nous avons utilisé l'hydrochloride de lincomycine : $C_{18}H_{34}N_2O_6S.HCl$ (MM : 406,537 + 36.5 (MM_{HCl}) = 443 g/mol) et le sel disodique de fosfomycine $C_3H_5Na_2O_4P$ (MM : 136 + 46 (MM_{Na2}) = 182.02 g/mol) de Sigma-Aldrich (Annexe 2)

Pour la fosfomycine, la gamme de dilution étudiée a été : 0.25 0.5 1 2 4 8 16 32 64 128 256 (mg/L).

Pour la lincomycine, la gamme de dilution étudiée a été : 0.06 0.12 0.25 0.5 1 2 4 8 16 32 64 (mg/L).

Pour une efficacité optimale de la fosfomycine, il a fallu ajouter du glucose-6-phosphate dans le milieu pour une concentration finale du milieu à 25mg/L.

1. CMI en milieu solide

a. *Principe :*

On réalise une série de milieux gélosés dans lesquels est incorporée une gamme de dilutions d'antibiotique. On ensemence des suspensions bactériennes sur ces milieux. Après 18 heures d'incubation 37°C, on note la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance bactérienne visible à l'œil nu : il s'agit de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

b. *Préparation des culots de Mueller-Hinton :*

La poudre utilisée est le Mueller-Hinton Biorad 64884. On pèse 35,0g de poudre que l'on verse dans un litre d'eau stérile (pH final 7.4 +/-2).

On porte à ébullition jusqu'à dissolution complète puis on répartit la gélose encore chaude en différents culots de 50 ml.

On fabrique ainsi 24 culots de MH (11 dilutions x 2 antibiotiques et les témoins) que l'on stérilise à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

c. *Mode opératoire :*

i. Préparation des dilutions d'antibiotiques :

Nous avons travaillé sur des culots de MH de 50 mL.

La plus forte concentration à préparer était de 256 mg/L (12.8 mg d'antibiotique pour un culot). Pour une prise d'essai de 1 mL, nous avons besoin de 12.8 mg d'antibiotique. Nous avons préparé des dilutions de 10mL (128 mg) afin de pouvoir faire les autres dilutions en cascade (Tableau 5). De plus, nous avons ajouté à ces dilutions 25mg/L de glucose-6-phosphate.

Tableau 5 Préparation des solutions mère d'antibiotiques pour la détermination des CMI en milieu solide

Antibiotique	degré de pureté (%)	Pesée (mg)	Solvant (mL)
Fosfomycine	74,72	171	10
Lincomycine	91,8	139	10

ii. Préparation des milieux :

Pour chaque antibiotique, 11 points de gamme de dilution sont prévus : de 0.06 mg/l à 64 mg/l pour la lincomycine et de 0.25 à 256 mg/L. A cela s'ajoutent 2 témoins sans antibiotique (1 en début de série et l'autre en fin de série).

On note sur les boîtes carrées vides le nom de l'antibiotique, la dilution et on met un repère qui nous servira lors du dépôt des échantillons.

On fait fondre les culots de Mueller-Hinton 2 minutes à l'autoclave puis on les laisse dans les étuves portes ouvertes pour les amener environ à 50°C.

Lorsque les culots de Mueller-Hinton sont suffisamment refroidis, on y ajoute la dilution d'antibiotique, on homogénéise et on coule la gélose qu'on laisse se solidifier sous la hotte.

iii. Ensemencement :

Préparation des inoculums :

Selon le CA-SFM, on doit préparer une suspension en bouillon Mueller-Hinton ou en solution saline (0,9 % NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 10⁸ UFC/ml). La recommandation consiste à déposer 10⁴ UFC par spot sur la gélose de MH contenant l'antibiotique.

On prépare une microplaque rectangulaire à fond rond de 96 puits ; on dépose 150 μ l de suspension bactérienne suivant un plan de plaque (de A1 à H12). On met la plaque à 4°C en attendant de réaliser la distribution.

Distribution :

Le dispositif utilisé est un ensemenceur de type Steers. C'est un bloc comprenant des tiges de métal à section droite.

Ces tiges sont plongées dans les cupules de la microplaque contenant les suspensions bactériennes où elles aspirent un volume de 0,3 μ l par tige ; puis le système délivre au contact de la gélose cette prise d'essai. (Figure 10)

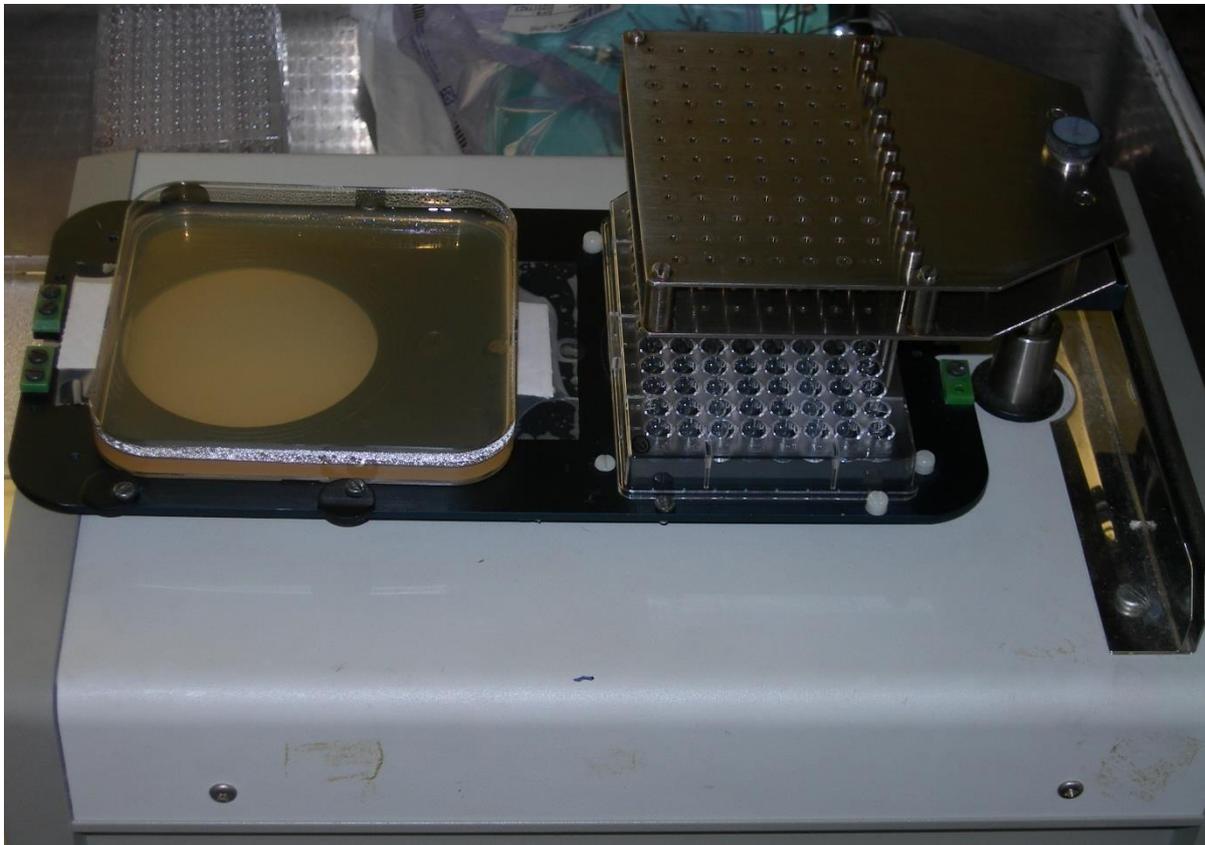


Figure 10 Ensemenceur Steers

On ensemence pour chaque série, tout d'abord une gélose témoin (début de série), puis les géloses contenant l'antibiotique par ordre croissant de concentration, et enfin à nouveau une gélose témoin (fin de série).

Une fois que les spots déposés ont séchés sous la hotte, on incube les boîtes 18 heures à 37°C.

2. CMI en milieu liquide

Nous nous sommes appuyés sur la Norme européenne EN ISO 20776-1 (Avril 2007) qui décrit la microdilution en bouillon pour déterminer les CMI des agents antimicrobiens.

Pour commencer, il est à noter que les essais de la CMI en bouillon sont reproductibles à plus ou moins une dilution.

Les essais sont réalisés sur des plaques de microdilution 96 puits. La méthode est basée sur la préparation de solutions de travail des antibiotiques pour un volume total de 200 µL dans la cupule, c'est-à-dire, 100 µL d'antibiotique et 100 µL de suspension bactérienne. La norme fait référence à des volumes totaux de 100 µL, mais par souci de risque de dessèchement de la cupule, nous avons préféré doubler le volume. On doit utiliser un bouillon Mueller-Hinton pour les dilutions d'antibiotiques et les suspensions.

a) Préparation des solutions d'antibiotiques

Nous avons commencé par préparer des solutions d'antibiotiques en MH à 512 mg/L de 30mL. Pour cela, nous avons d'abord solubilisé les antibiotiques dans de l'eau stérile. (Tableau 6). Et à partir de ces solutions mères d'antibiotiques dans l'eau, nous avons utilisé une prise d'essai de 2 mL dans 28 mL de MH afin d'obtenir les solutions à 512 mg/L d'antibiotiques en MH. Les mêmes poudres ont été utilisées pour la méthode en milieu solide et en milieu liquide, les mêmes degrés de pureté ont été pris en compte.

Tableau 6 Préparation des solutions mères d'antibiotiques pour la détermination de CMI en milieu liquide

Antibiotique	degré de pureté (%)	Pesée (mg)	Eau stérile (mL)
Fosfomycine	74,72	102,8	10
Lincomycine	91,8	83,65	10

A partir de ces solutions à 512 mg/L, nous avons préparé les différentes dilutions.

Préparation des suspensions bactériennes

Une cupule doit contenir entre 2 et 8 x10⁵ UFC/mL. Pour se faire, nous avons dilué au 1/100^{ème} chaque suspension de 0.5MF dans 5 mL de MH (5x10⁵ UFC/mL dans chaque cupule).

Pour une efficacité optimale de la fosfomycine, il a fallu ajouter 25mg/l de glucose-6-phosphate dans chaque cupule. On a ajouté la G6PD sous forme de 70 μ L dans chaque suspension de 5mL (solution de G6P faite avec 37.5 mg de poudre dans 10 mL d'eau).

b) Inoculation des plaques de microdilution

D'après la norme ISO, les plaques doivent être inoculées dans les 30 min de la normalisation de la suspension de l'inoculum afin de maintenir la concentration du nombre de cellules viables. Nous avons d'abord distribué les solutions d'antibiotiques puis les suspensions.

c) Incubation des plaques de microdilution et lecture

Pour éviter le dessèchement, les plaques sont empilées les unes sur les autres ; et pour un chauffage régulier, il convient de ne pas empiler plus de cinq plaques à la fois. Puis celles-ci sont incubées entre 34 et 37°C à l'air ambiant pendant 18 +/- 2 h en chambre humide. Pour la lecture, il est important de vérifier le témoin de croissance positif auquel on comparera les autres cupules pour définir la CMI, la concentration la plus faible de l'antibiotique qui inhibe complètement la croissance visible.

3. CMI par la méthode des bandelettes

Dans la plupart des laboratoires, quand cela est possible, les biologistes utilisent des bandelettes pour déterminer la CMI. Cette méthode utilise le principe d'établissement d'un gradient de concentration d'antibiotique dans un milieu gélosé pour déterminer la sensibilité du germe testé. Ce sont des bandelettes plastiques qui sont imprégnées au niveau de la partie en contact avec la gélose d'antibiotique déshydraté avec un gradient de concentration tout le long de la bandelette. Après incubation une nuit, les CMI sont déterminées au niveau de l'intersection bandelette/croissance bactérienne dans la partie la plus basse de l'ellipse. Les bandelettes fosfomycine contiennent également du G6PD pour éviter toute résistance due à un manque de ce substrat. Nous n'avons pas trouvé de fournisseurs fabriquant des bandelettes pour la lincomycine mais nous avons pu obtenir des bandelettes E-test Biomérieux et des bandelettes Liofilchem pour la fosfomycine. (Caractéristiques en Annexe 4) Nous avons disposé les deux bandelettes sur une gélose MH inoculé par 0.5 MF de chaque souche. (Figure 11)

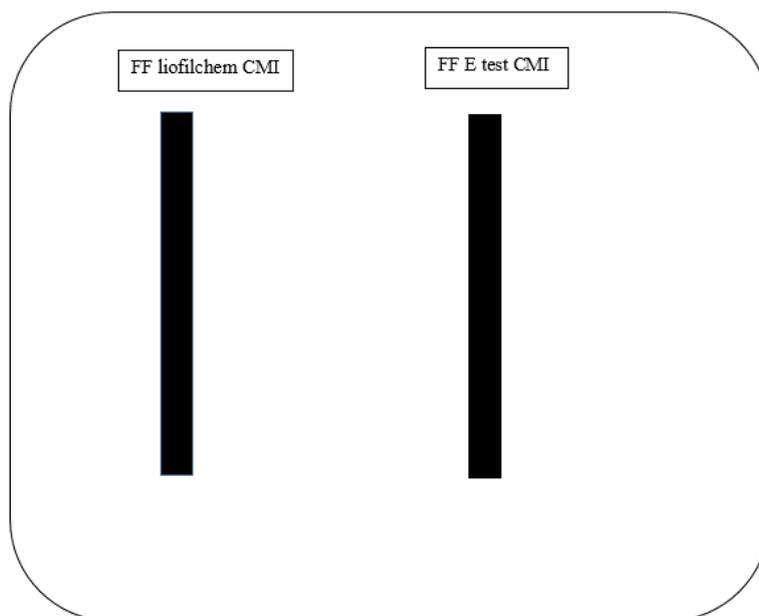
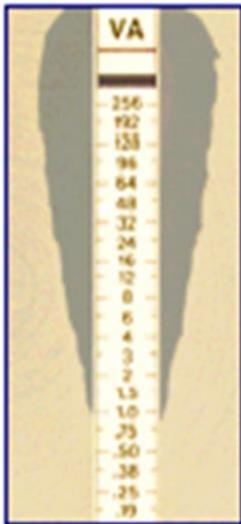


Figure 11 Plan de dépôt des bandelettes fosfomycine

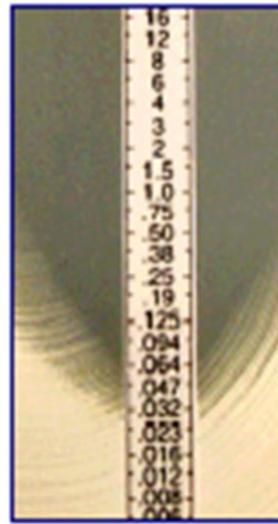
La CMI correspond à la valeur à laquelle on observe l'intersection entre la bandelette et l'ellipse. Si l'intersection se trouve entre deux graduations, la CMI correspond à la valeur la plus haute.

Il y a deux types d'inhibition : nette et progressive.

✓ Inhibition nette



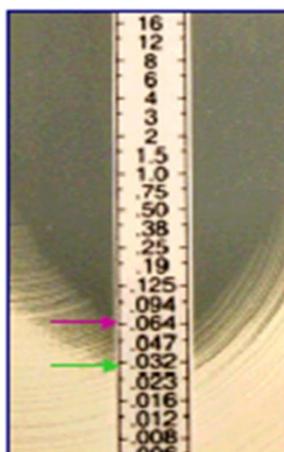
✓ Inhibition progressive



Pour l'inhibition nette, la CMI doit être lue à la limite de croissance du germe.

Pour l'inhibition progressive :

- Si antibiotique bactéricide, lire le 100% d'inhibition (0.064 mg/L sur la photo ci-dessous)
- Si antibiotique bactériostatique, lire le 80% d'inhibition. (0.032 mg/L)



4. Détermination des diamètres des zones d'inhibition

Cette méthode est simple, pratique et bien standardisée. On a utilisé un inoculum de 0.5 MF disposé à la surface d'une gélose Mueller-Hinton. Ces disques de papiers imbibés d'antibiotiques sont commercialisés à concentration fixée. Nous avons utilisé la lincomycine 15 µg et la fosfomycine 200 µg (disque contenant de la G6PD (Annexe 3))

Les milieux sont incubés de 16 à 24h à 37°C. Les zones d'inhibition sont mesurées autour des disques d'antibiotiques au millimètre près. Ce diamètre est directement relié à la sensibilité du germe testé et à la bonne diffusion de l'antibiotique dans la gélose.

Dans la routine, les diamètres sont mesurés automatiquement par une caméra. Dans ce travail, les diamètres ont été mesurés à l'œil nu à l'aide d'une règle graduée.

Nous avons utilisé des disques de différents fournisseurs : Oxoid, Liofilchem, Biorad, BD et I2A. (Figure 12)

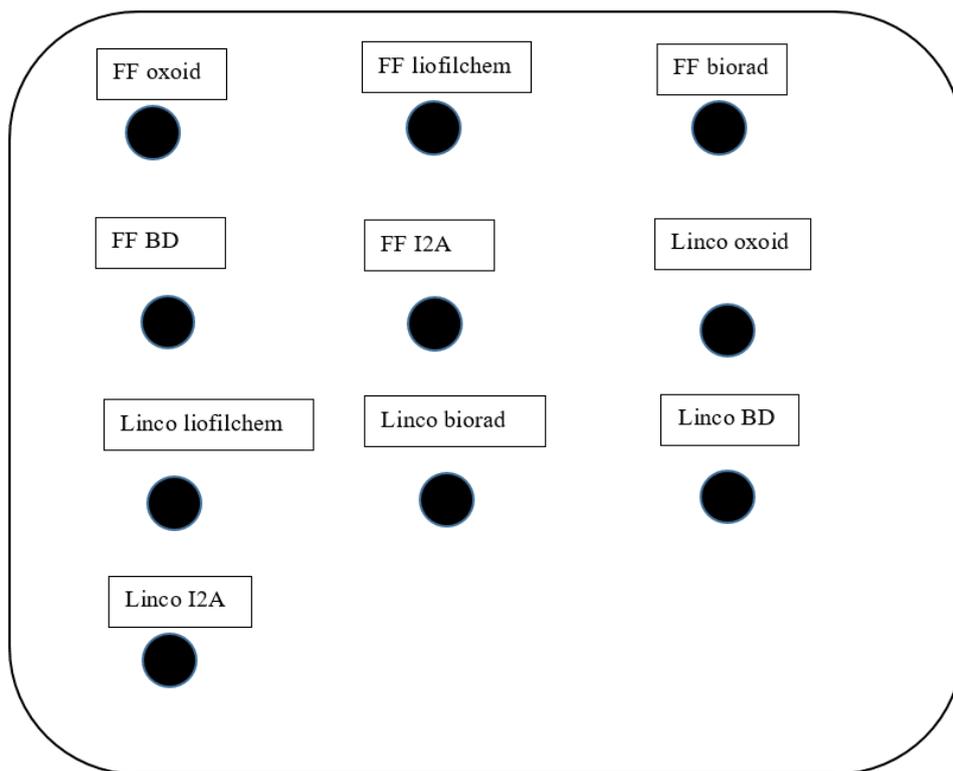


Figure 12 Plan de dépôt des disques

C. Détermination des CMB

La CMB est la plus petite concentration d'antibiotique qui laisse un faible pourcentage de bactéries survivantes : 0.01% de survivants après 24 H de culture. Dans la norme européenne ISO 20776-1, l'inoculum recommandé pour la mesure de la CMI par la méthode de microdilution est de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml (entre 40 à 160 %, soit $2 \cdot 10^5$ à $8 \cdot 10^5$ UFC/ml, ce qui correspond à 10 μ L de chaque puit).

En effet dans 10 μ l de la suspension initiale, on dénombre donc 5000 UFC/ml (2000 à 8000). Lors du repiquage des cupules sans culture visible lors de la mesure de CMI, la plus petite concentration d'antibiotique correspondant à un spot stérile qui indiquera une bactéricidie de $<1 / 5000$ (0.02% - 0.012 à 0,05%).

Après lecture des plaques de microdilution, nous avons agité chaque suspension et prélever 10 μ L de la cupule. Les MH carrées étaient mises préalablement à 37°C afin d'obtenir une absorption et un séchage rapide des inocula. Nous avons lu les CMB à 24h d'incubation à 37°C (air ambiant).

III. RESULTATS

A. Fosfomycine

Les résultats des CMI et des disques sont récapitulés dans l'Annexe 5. Nous avons écarté 5 souches : la souche 31 n'était pas pure, la souche 70 n'a pas poussé sur la gélose des disques et les disques des souches 34, 62 et 75 sont discordants entre eux. (Figure 13 à 16)

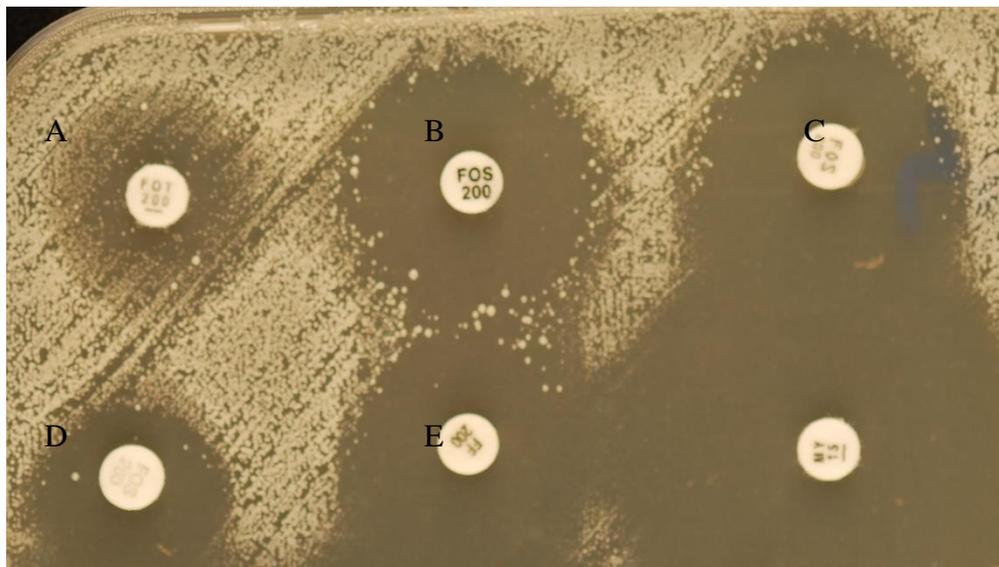


Figure 13 Exemple de discordance entre les disques fosfomycine 200 µg des différents fournisseurs (souche 34) A : Oxoid, B : Liofilchem, C : Biorad, D : BD, E : I2A

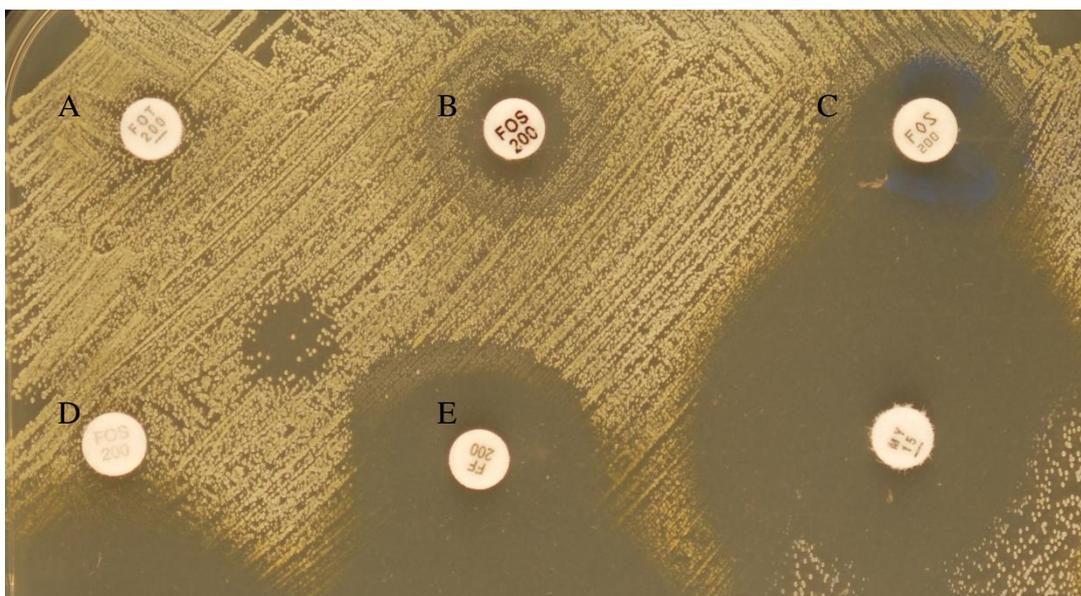


Figure 14 Discordances des disques pour la souche 62, pas pure ?

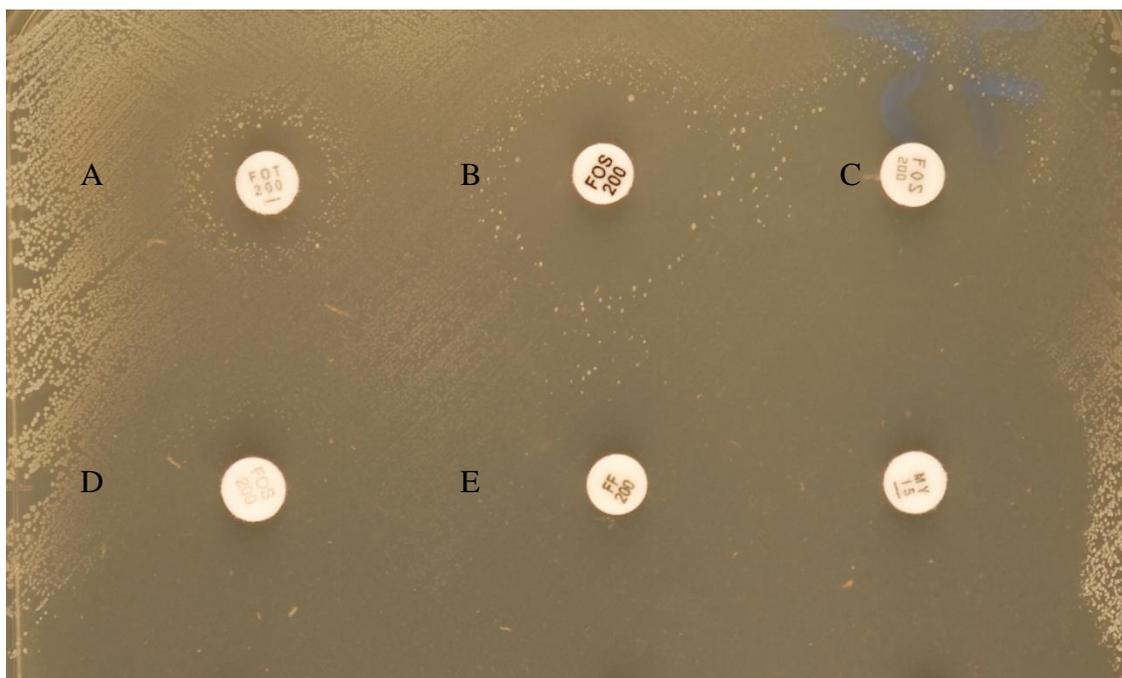


Figure 15 Discordances entre les disques pour la souche 75

Souches	FF 24h CMI solide	FF LF	FF Oxoid	FF I2A	FF BD	FF biorad
34	64	32	24	28	20	30
62	128	18	6	25	6	21
75	32	20	12	15	14	22

Pour les trois souches, ce sont les disques Oxoid et BD qui semblent les plus chargés.

Pour la souche 34, la CMI solide rend la souche résistante et seule le disque BD la rend résistante (cf diamètre critique à 23 mm proposé plus loin).

Pour la souche 62, d'après la photo, la souche ne semble pas pure.

Pour la souche 75, la CMI rend la souche sensible mais aucun disque ne la rend sensible, mais les plus proches du diamètre critique sont Liofilchem et Biorad.

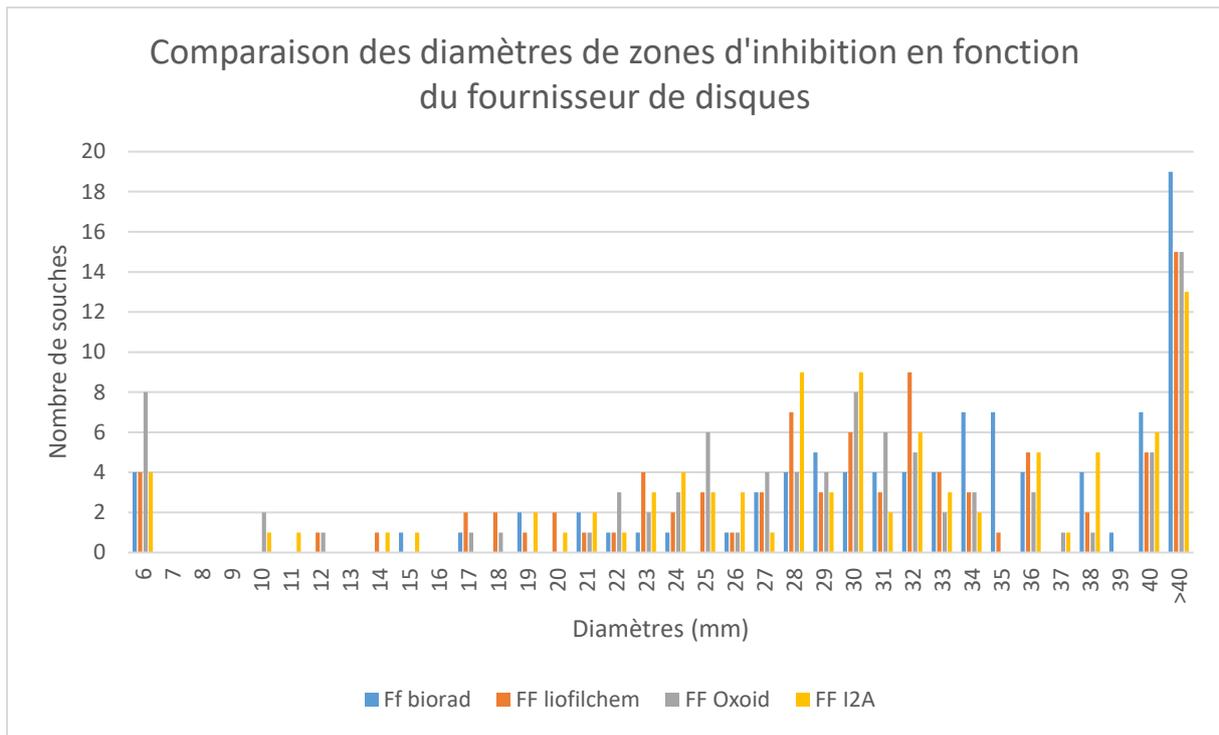


Figure 16 Comparaison des diamètres de zones d'inhibition des différents fournisseurs

Voici les sommes des diamètres pour chaque fournisseur :

FF Biorad	FF liofilchem	FF Oxoid	FF I2A	FF BD
2913	2567	2329	2607	2417

Avec 2913 mm, le disque BIORAD semble, à l'évidence, le disque le plus chargé en fosfomycine. La différence entre chaque fournisseur et Biorad est significative pour chaque fournisseur ainsi qu'entre chaque fournisseur ($p < 1.96$, risque $< 5\%$).

1. Courbes de répartition des diamètres en fonction des CMI

Pour établir les courbes de répartition des diamètres en fonction des CMI, nous nous sommes basés sur la méthode de référence de détermination de la CMI pour la fosfomycine, c'est-à-dire, la dilution en gélose selon la procédure déterminée par l'EUCAST.

Une courbe de répartition a été faite pour chaque marque de disques de fosfomycine 200 µg.

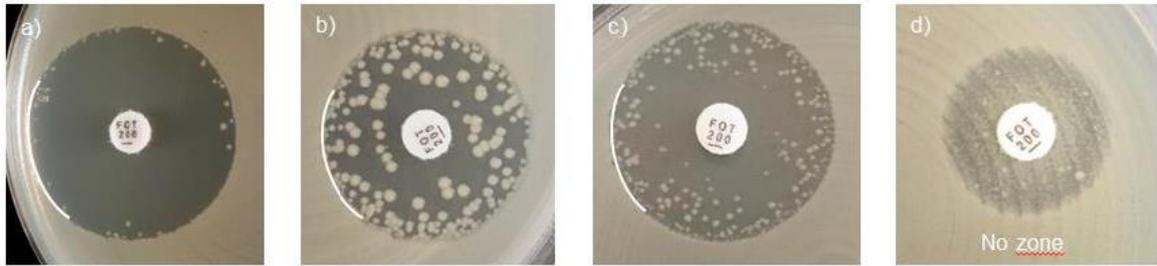
Pour valider notre méthode de détermination de la CMI en gélose, nous avons utilisé trois contrôles de qualité dont voici les résultats (Figure 17).

Souches	FF 24h CMI solide	CMI FF liquide	CMI FF E test	CMI FF LF	CMI EUCAST 2016	CMI CLSI 2014
sauc 25923	8	1	3	4 ou 24	/	/
<i>E. faecalis</i>	16	128	64	>256		32 à 128
sauc 29213	1	1 et 2	2	6	0,5 à 4	0,5 à 4
pyo	4	4	6	12	2 à 8	2 à 8
<i>E. coli</i>	1	8	2	4	0,5 à 2	0,5 à 2

Figure 17 Résultats des contrôles de qualité pour la CMI en milieu solide de la fosfomycine.

Le SAUC 25923 a été utilisé comme CQ pour la lincomycine, il n'y a pas de valeurs attendues pour la fosfomycine sur cette souche. Ainsi, seul *E. faecalis* ne donne pas un résultat correct, mais les trois autres contrôles de qualité répondent parfaitement aux valeurs attendues par l'EUCAST et le CLSI.

Il est à noter que la lecture des diamètres des zones d'inhibition n'est pas évidente. En effet, la présence de colonies dans les zones d'inhibition de disques (ou de bandelettes) est courante, 41% des souches dans l'article de Kaase (32) mais l'emplacement de ces colonies dans la zone d'inhibition serait principalement dû au hasard. Ceci rend plus difficile la lecture et impacte la reproductibilité de la méthode. Ainsi le CLSI et le CASFM recommandent de ne pas tenir compte des colonies dans la zone d'inhibition du moment que l'on confirme que la souche est pure. L'EUCAST, pour la première fois en 2017, nous donne les limites de la considération ou non de ces colonies (Figure 18)



Examples of inhibition zones for Escherichia coli with fosfomycin.

a-c) Ignore all colonies and read the outer zone edge.

Figure 18 Exemples de colonies présentes dans la zone d'inhibition de la fosfomycine, d'après l'EUCAST 2017

Par exemple, pour la souche n°13 et le contrôle de qualité *E. coli*, nous avons choisi de considérer les grands diamètres et de ne pas considérer les quelques colonies dans la zone d'inhibition. (Figure)

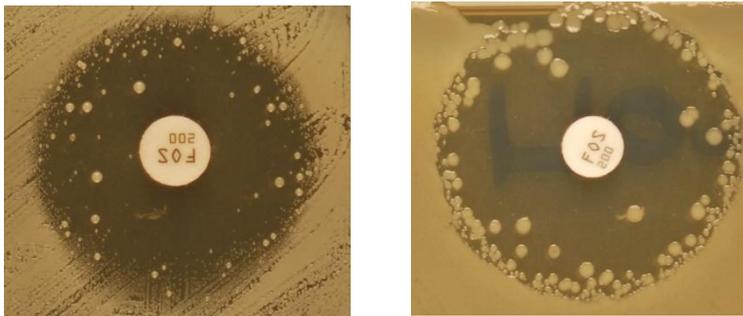
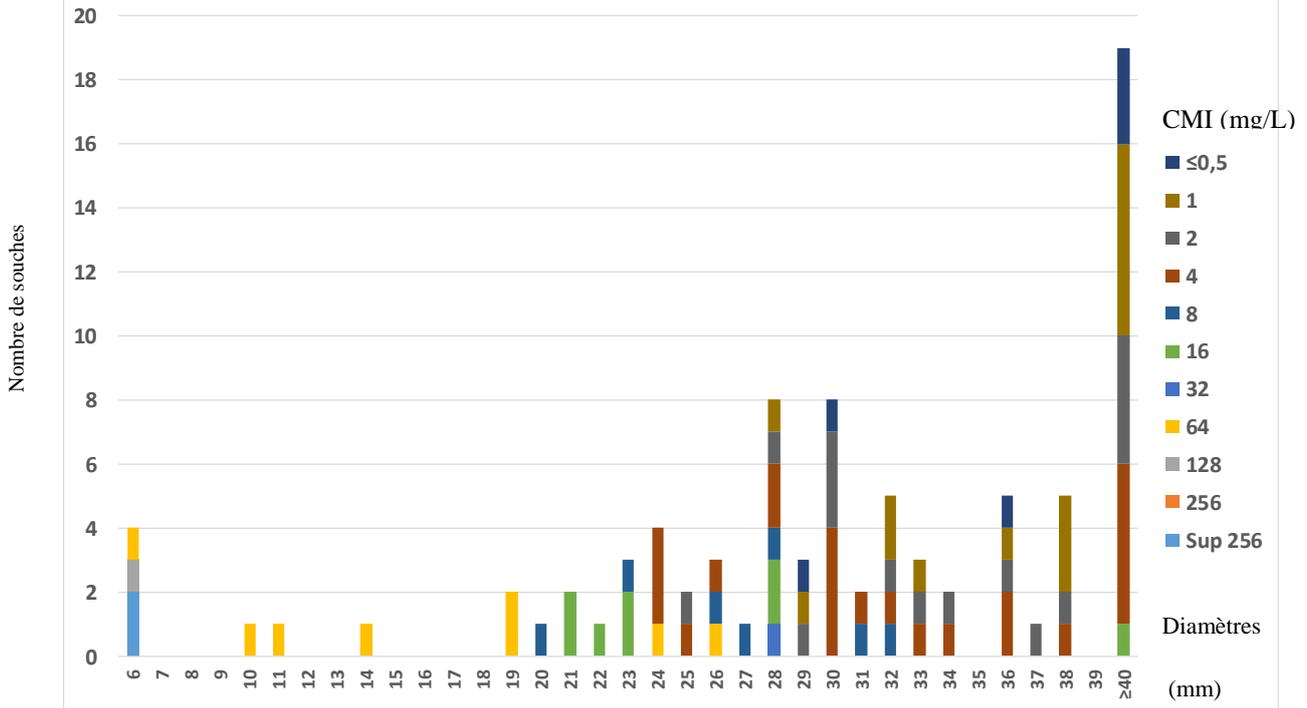


Figure 19 Exemples de colonies dans la zone d'inhibition de disques de fosfomycine (13 et E. coli) non prises en compte

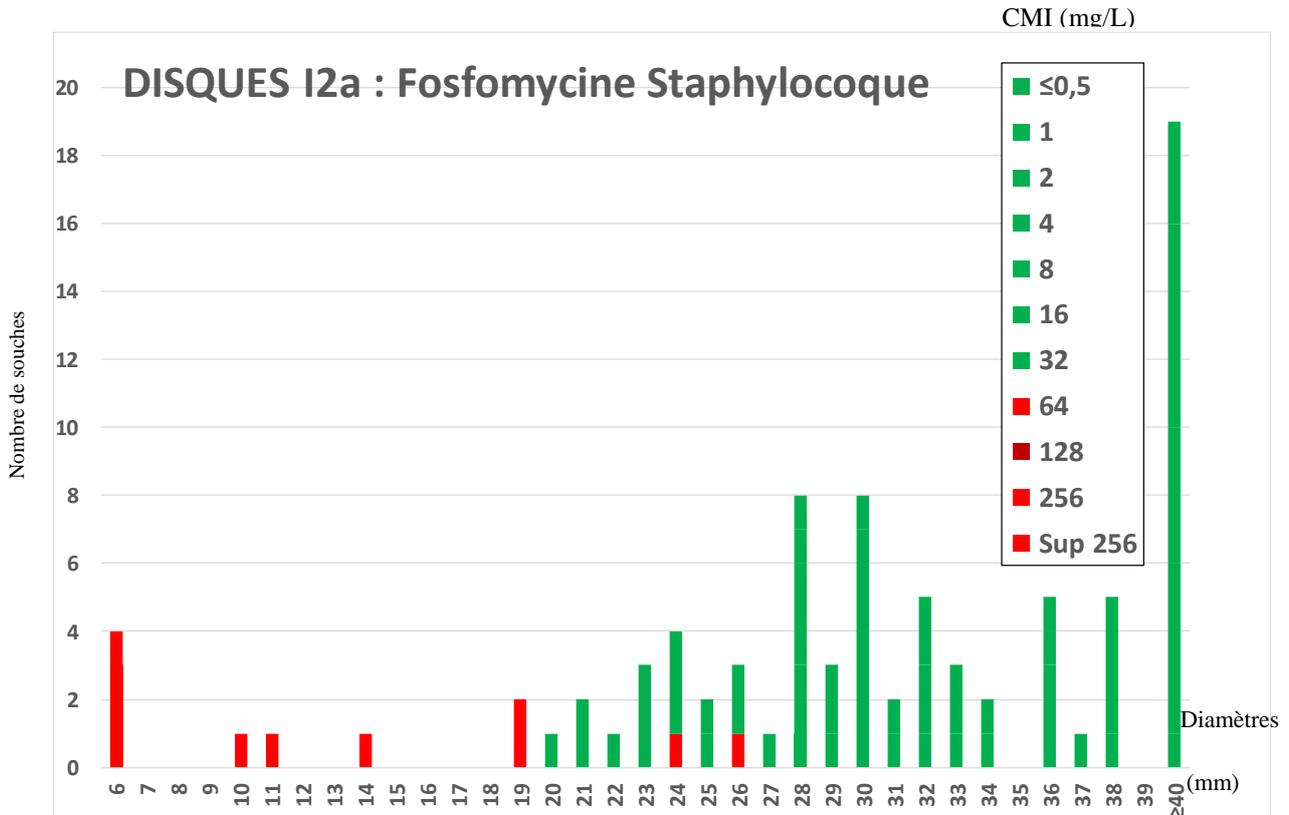
Ainsi, à partir de ces données, nous avons été en mesure de produire des courbes de répartition pour chaque marque de disque de fosfomycine.

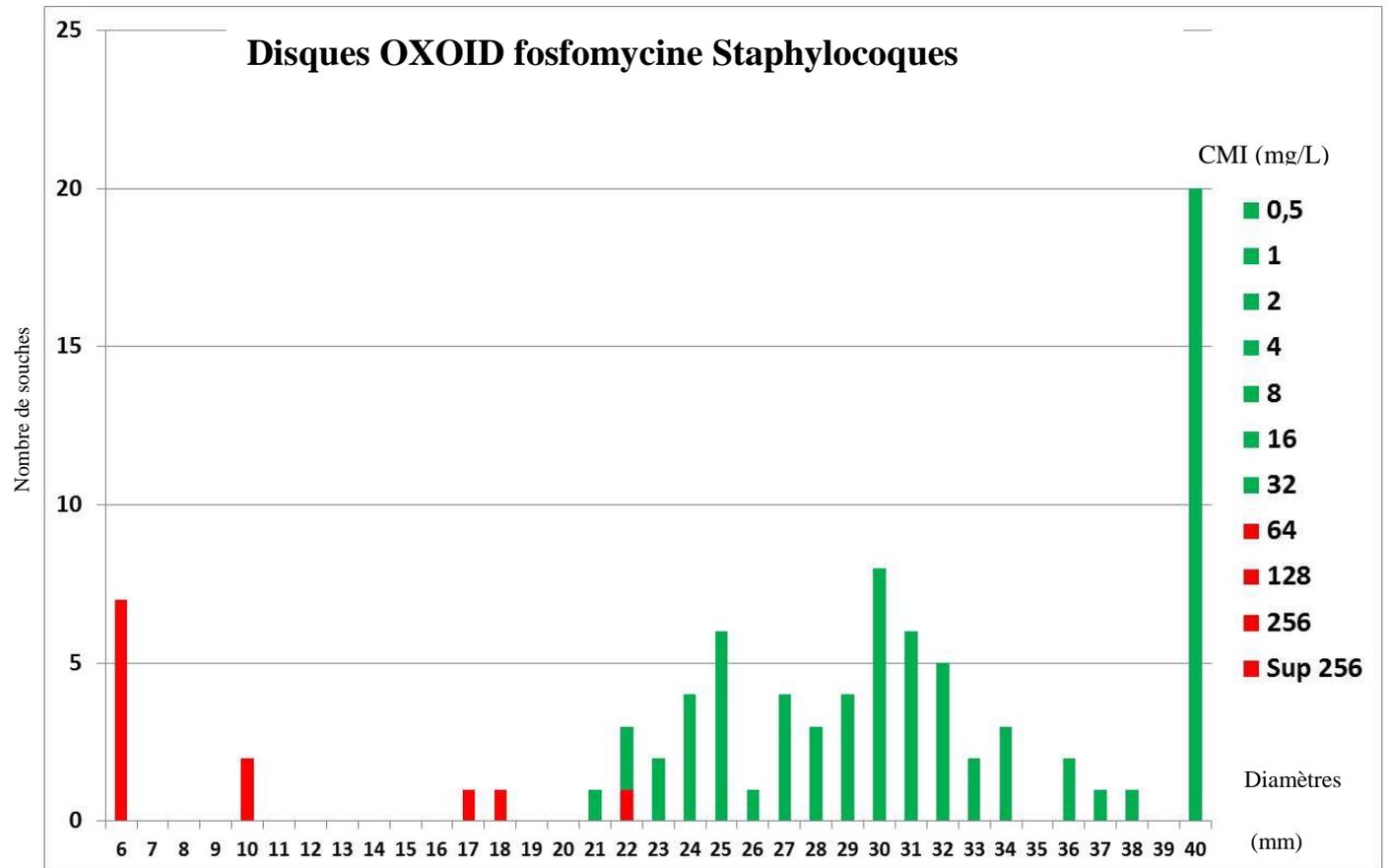
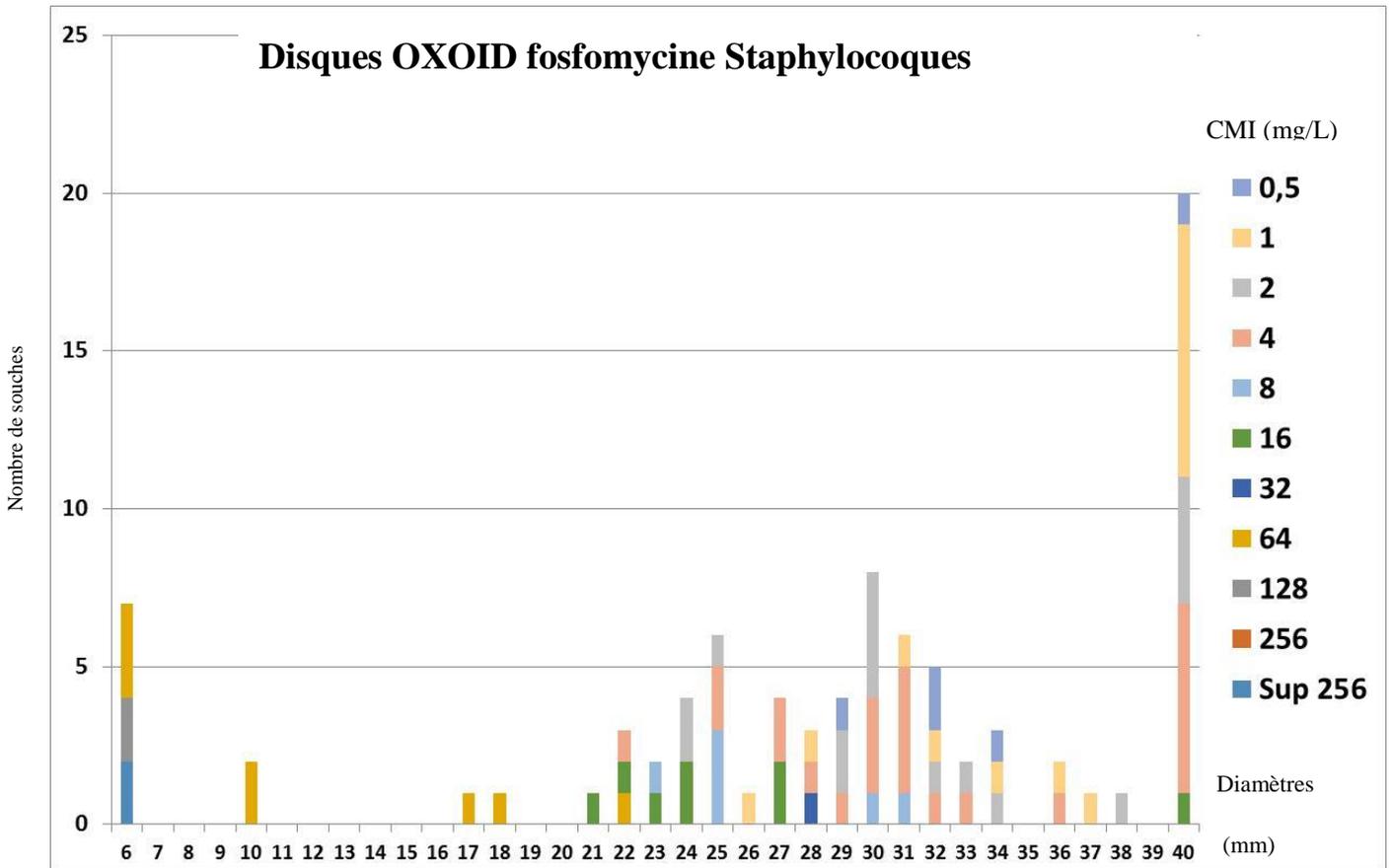
Pour chaque fournisseur de disques, la première courbe donne la répartition des diamètres en fonction des CMI. Pour la deuxième courbe, on considère les souches résistantes (rouge) si la CMI est supérieur à 32 mg/L et sensibles (vertes) si la CMI est inférieure ou égale à 32 mg/L.

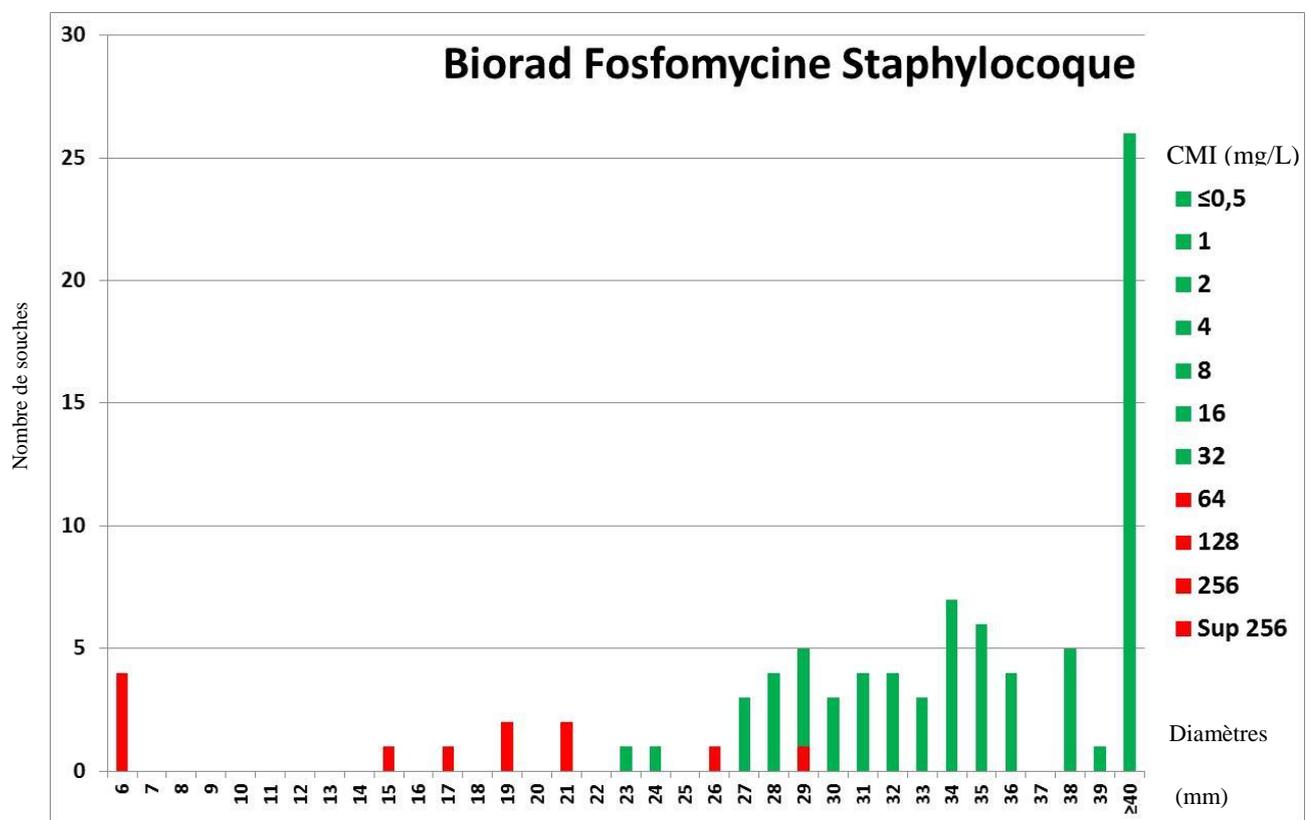
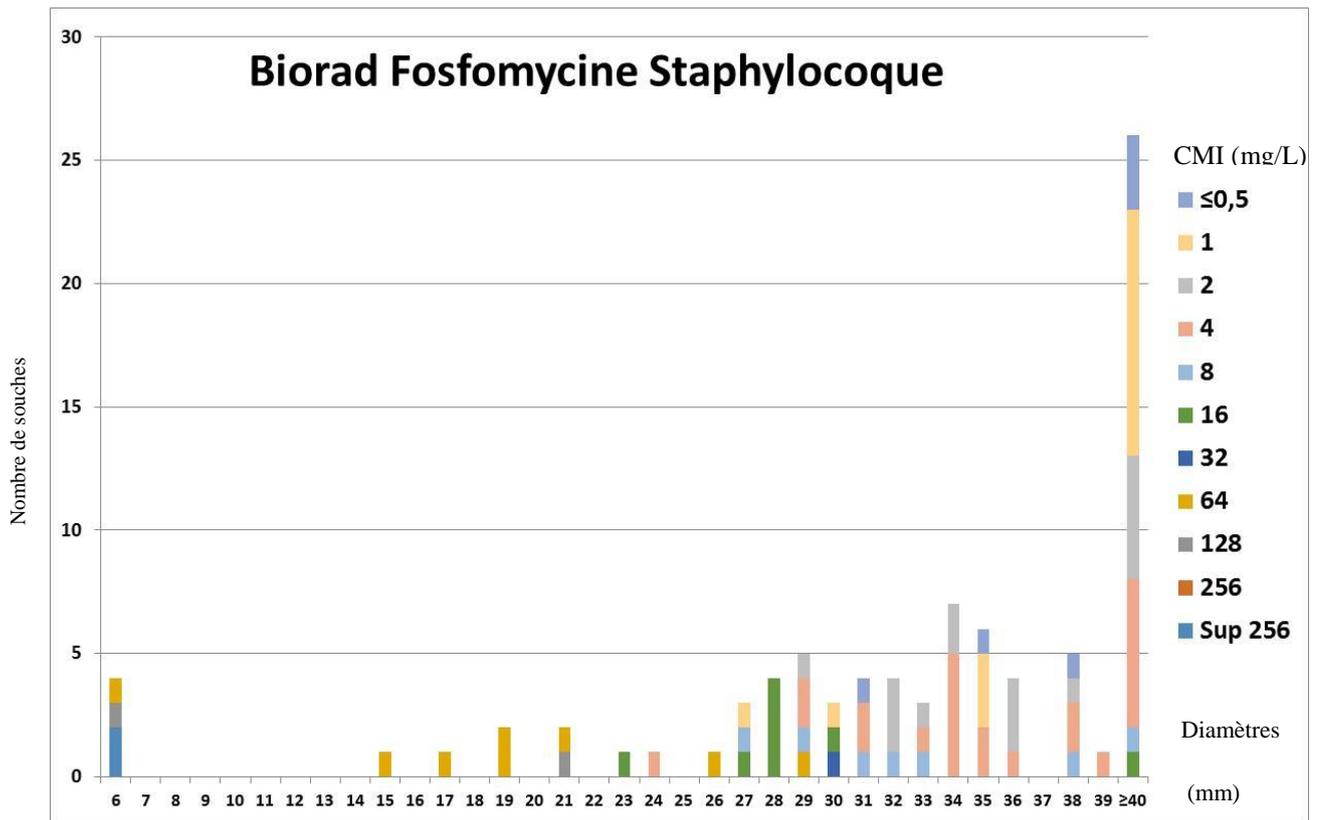
DISQUES I2a : Fosfomycine Staphylocoque



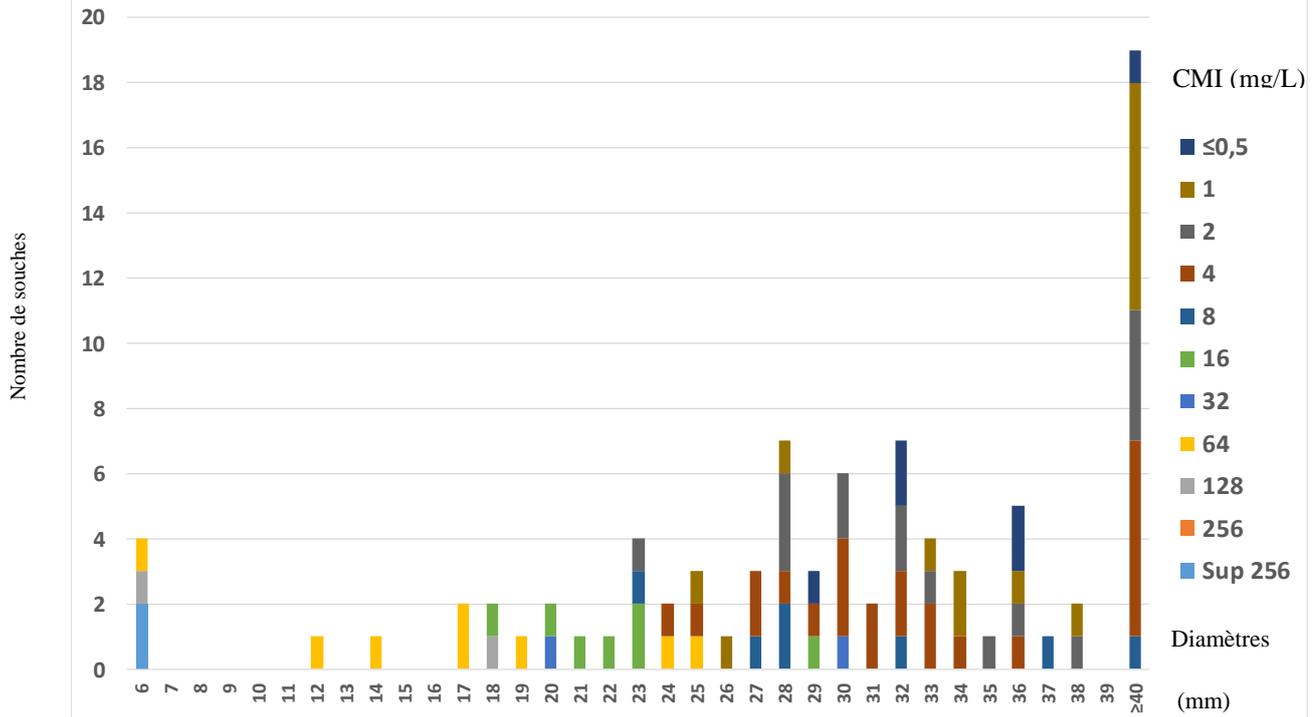
DISQUES I2a : Fosfomycine Staphylocoque



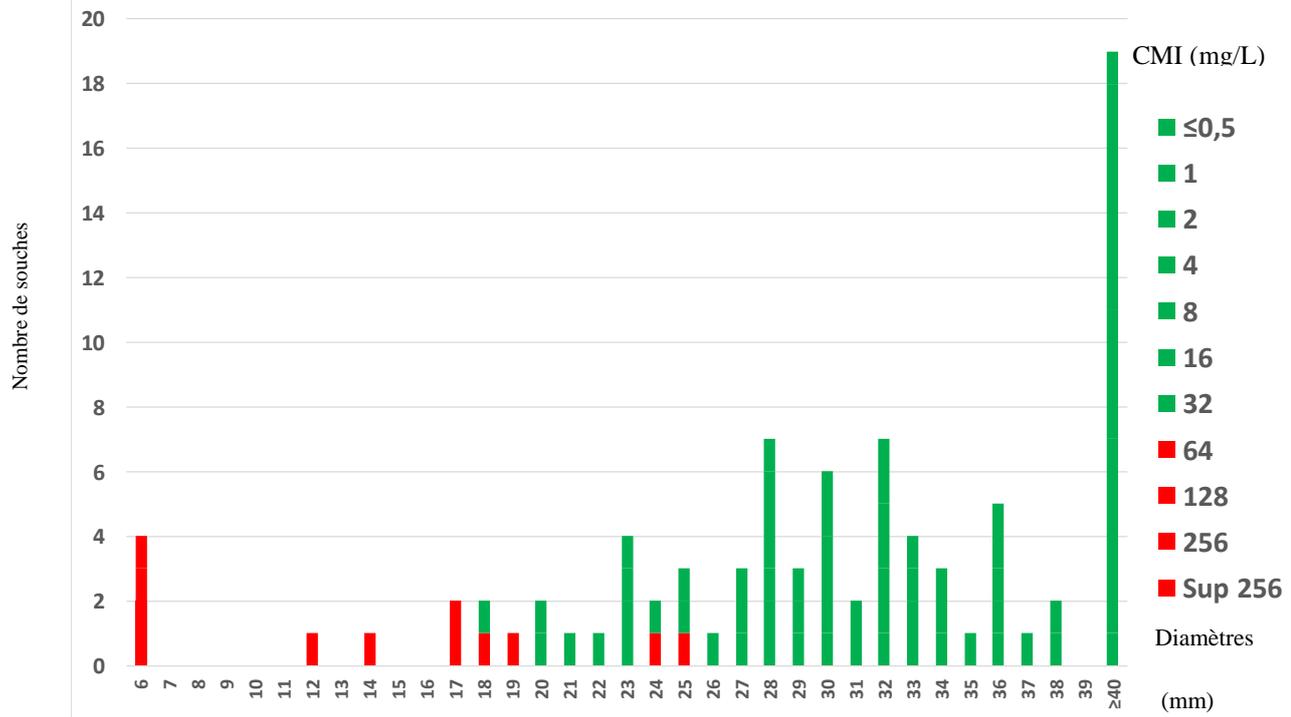


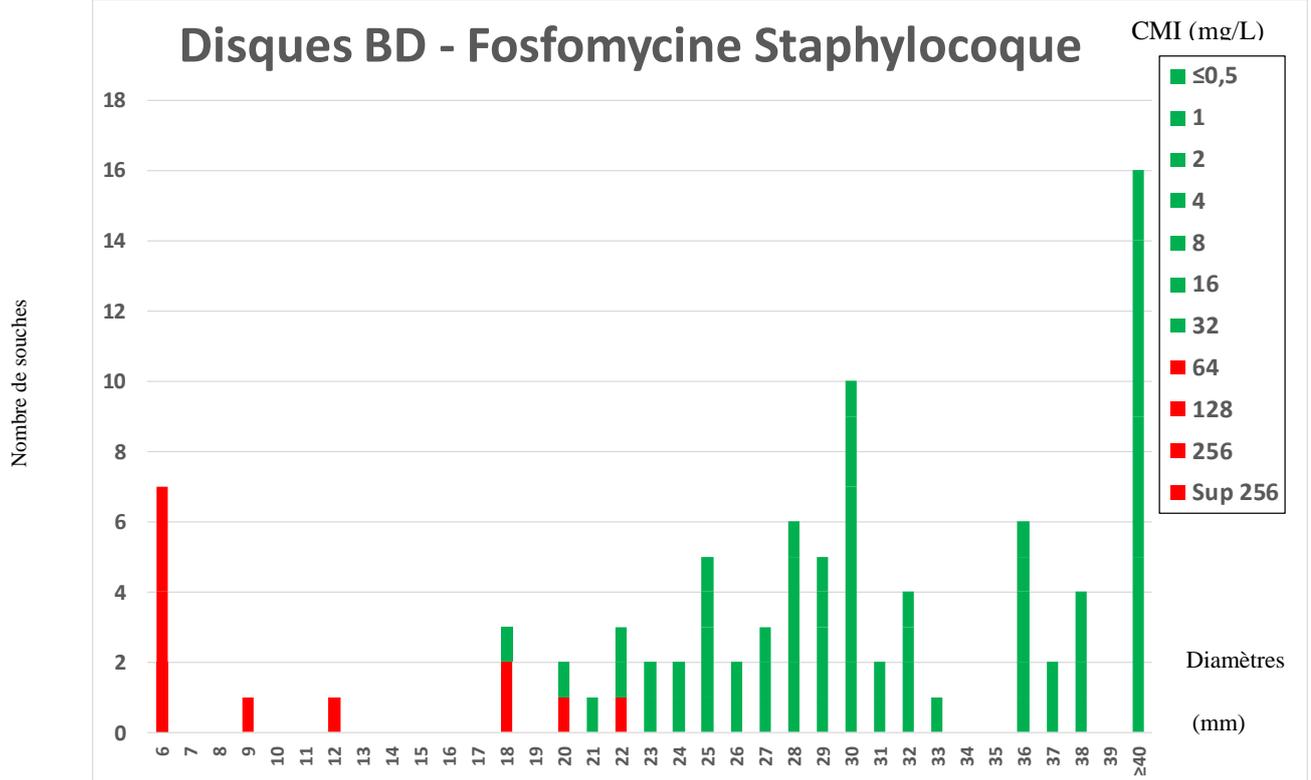
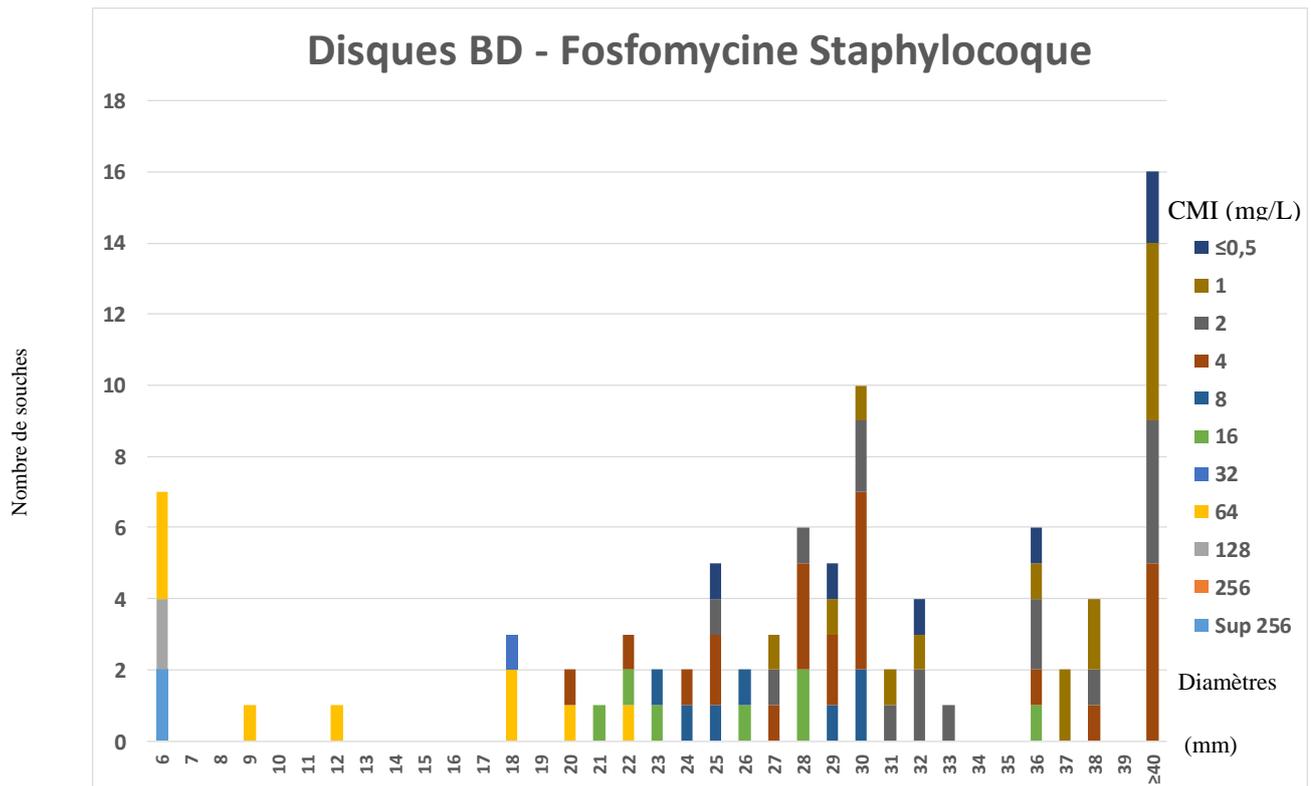


Disques Lyofilchem Fosfomycine Staphylocoque



Disques Lyofilchem Fosfomycine Staphylocoque





En considérant la concentration critique à 32 mg/L de l'EUCAST, nous pouvons proposer un diamètre critique à 23 mm d'après nos données. A noter que suite à ce travail, cette proposition a été retenue par le CASFM 2017, sachant que l'EUCAST en 2017 ne propose toujours pas de diamètre critique pour la fosfomycine chez le staphylocoque.

Les souches 2 et 11 sont résistantes en CMI et de diamètres supérieurs à 23 mm pour les disques Liofilchem, Biorad et I2A.

2. Résultats des différentes méthodes de détermination de CMI

Lecture des CMI en bandelettes

On a observé le même phénomène pour la lecture des bandelettes que pour la lecture des diamètres d'inhibition des disques. Il a fallu ne pas tenir compte des colonies présentes dans les zones d'inhibition (Figure 20).

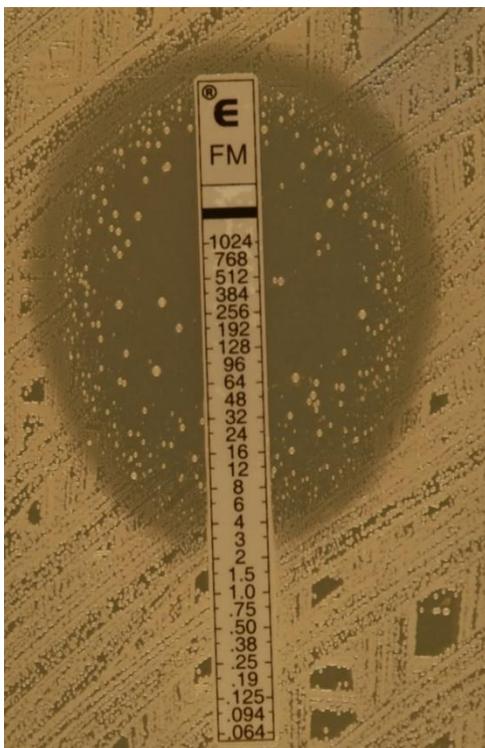


Figure 20 Bandelette E-test fosfomycine pour la souche 9

Il a aussi été observé quelques souches rendues résistantes par la bandelette Liofilchem et sensibles par la bandelette E test (souche 13 Figure 21), les bandelettes Liofilchem étaient-elles déchargées en antibiotique ? (Figure 22)

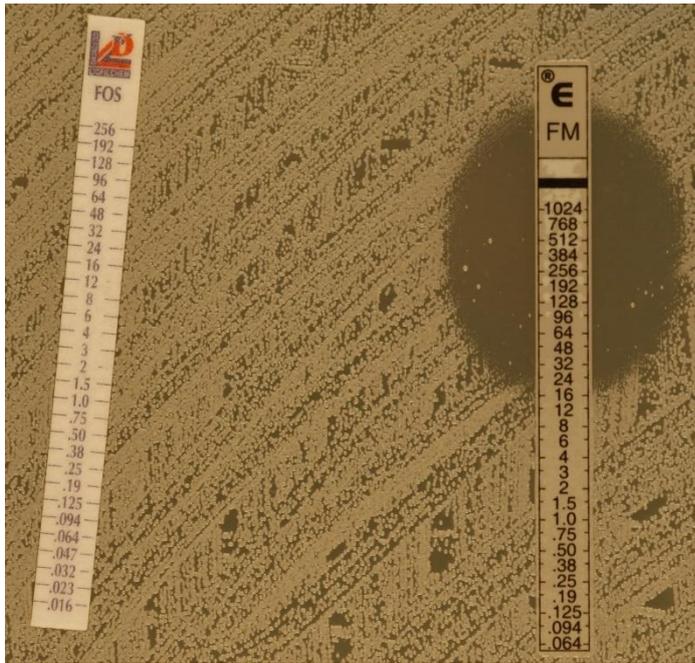


Figure 21 souche 13 : Résistance par Liofilchem (à gauche) et sensible par E-test (à droite)

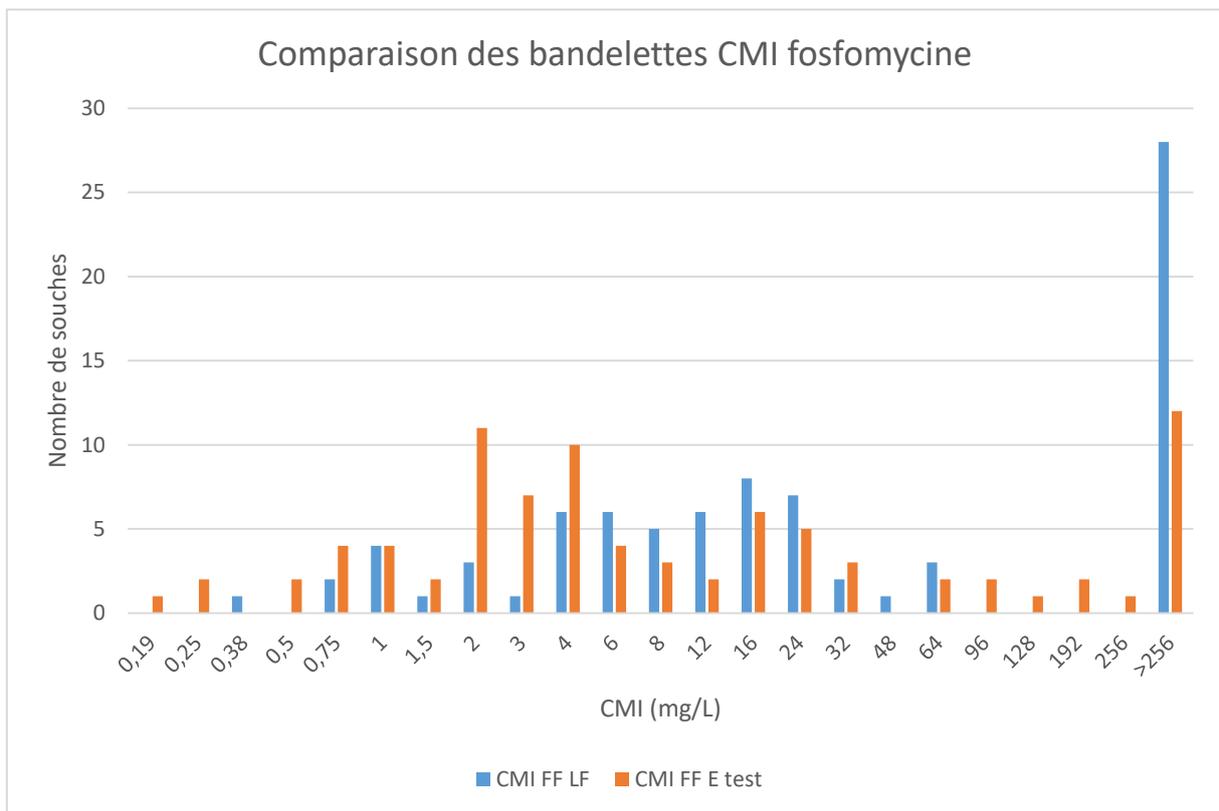


Figure 22 Lecture des CMI mesurées par les bandelettes (LF : Liofilchem)

On constate que les CMI mesurées par la bandelette Liofilchem sont plus hautes que celles mesurées par la bandelette E-TEST. En particulier, on a 28 souches qui ont une CMI supérieure ou égale à 256 avec la bandelette Liofilchem et seulement 14 souches avec la bandelette E-TEST.

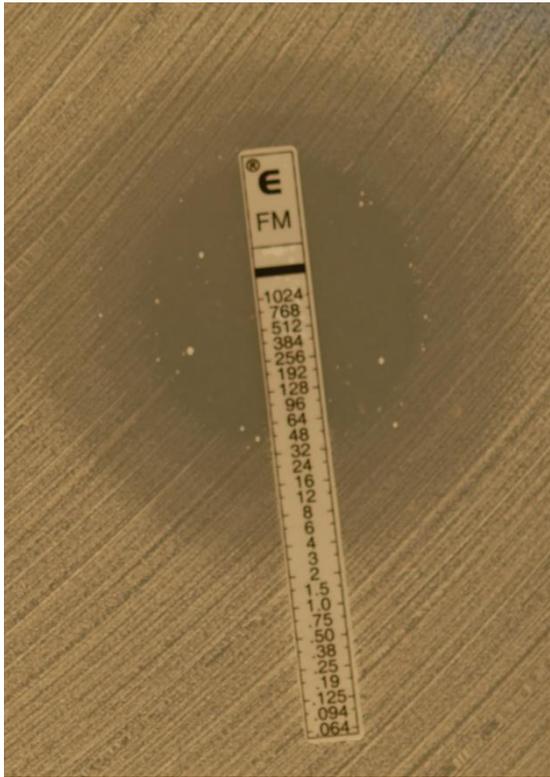
Ceci est confirmé si on fait la somme des CMI pour toutes les souches (les CMI > 256 et > 1024 ont été comptées comme 256 mg/L) : la somme des CMI Liofilchem est très supérieure à celle des CMI par la méthode de référence.

FF CMI solide (mg/L)	FF CMI liofilchem	FF CMI E test
1675,75	7909,13	4868,69

Quelques souches sont sensibles d'après la méthode de référence et résistantes en bandelette E-test (Figure 23).

Table 7 : 4 souche sensibles en CMI solide et résistantes en CMI E test

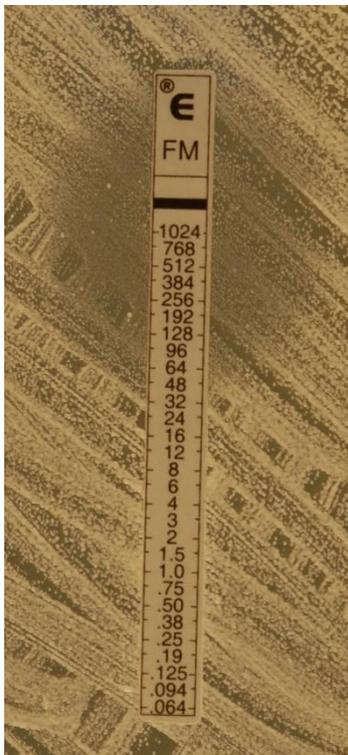
	FF CMI solide (mg/L)	FF CMI E test	FF biorad	FF liofilchem	FF Oxoid	FF I2A	FF BD
60	16	64	43	44	40	44	36
75	32	1024	22	20	12	15	14
86	8	96	29	27	23	26	24
87	16	512	23	22	6	21	10



E test fosfomycine souche 60



E test fosfomycine souche 75



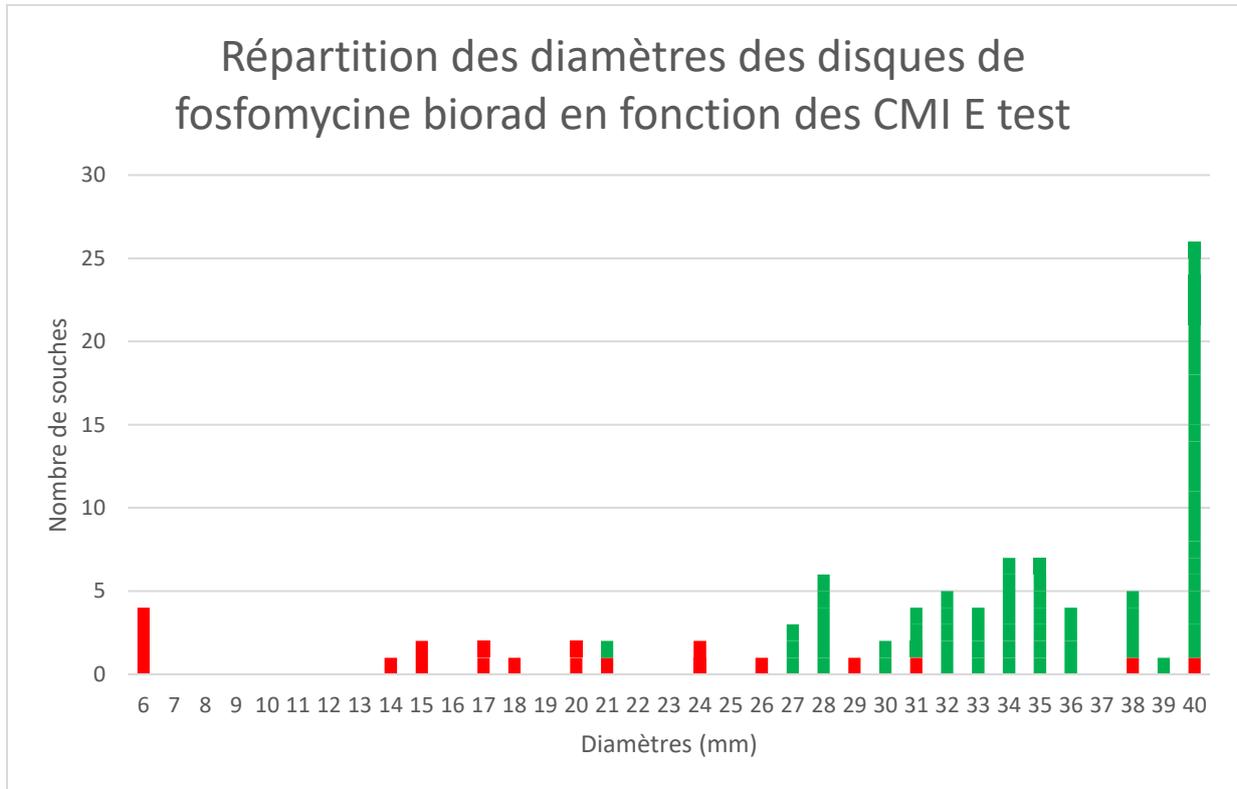
E test fosfomycine souche 87



E test fosfomycine souche 86

Figure 23 Souches dont la CMI la rend résistante en E test et sensible en CMI de référence

Pour exemple, voici la courbe de répartition des diamètres Biorad en fonction des CMI E-Test.



Lecture des CMI en microdilution

Pour pouvoir déterminer la CMI en microdilution, il faut se référer au témoin positif pour déterminer s'il y a une pousse ou non dans chaque puit. De plus, nous avons été confrontés au phénomène de saut de puit ou « skip tube phenomenon » (souche R Figure 24). Ceci est une des raisons pour laquelle la méthode en microdilution n'est pas admise pour déterminer la CMI à la fosfomycine. En effet, en milieu liquide, des colonies phénotypiquement résistantes conduisent à des valeurs de CMI plus élevées qu'en milieu solide, ce qui rend difficile la reproductibilité des résultats (33).

Pour des antibiotiques comme la fosfomycine et la pénicilline qui agissent contre la synthèse de la paroi bactérienne, peut-être que les colonies persistantes résistent du fait de leur état de « quiescence »/non division ?

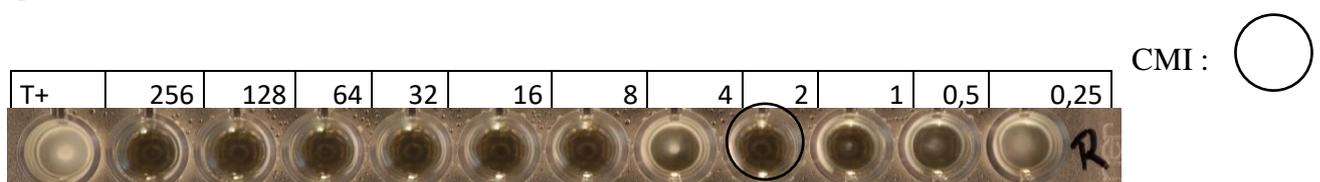


Figure 24 Saut de puit fosfomycine pour la souche R

Lecture des CMI solide

Les CMI sont déterminées à la plus faible concentration d'antibiotique où il y a extinction du spot de la souche. (Voir exemples pour les CMI de la lincomycine)

Comparaison des méthodes de détermination de la CMI fosfomycine

Voir tableau ci-après

CMI solide FF													
Différence	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	n	%
>3				1	2	8	16	32	64	128	>128	4	4,8%
3			3	1	3		1					7	8,3%
2		1		4	3	2	3		2			15	17,9%
1		2	5	1	3				1	1		12	14,3%
CMI liquide FF	0	1	6	5	0	1	1	1	4	1		19	22,6%
-1			1	2	7				1	1		12	14,3%
-2		2		1	3				1			12	14,3%
-3							1					2	2,4%
-4												0	0,0%
<-4										1		1	1,2%
CMI solide FF													
Différence	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	n	%
16								2				3	3,8%
12							1					1	1,3%
8					1				6			7	9,0%
7												0	0,0%
6						1						1	1,3%
5												0	0,0%
4					1							1	1,3%
3			2		4	1						7	9,0%
2	1	1	2	2	3	2	1	1	2		2	15	19,2%
1		2	2	5	3	2	1		1			16	20,5%
0	5	8	5	8	2	2	5	1	1	2	2	20	25,6%
-1		2	2	1	1							6	7,7%
-2			1									1	1,3%
CMI solide FF													
Différence	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	n	%
64								32	64	128	>128	1	1,3%
32		1			2	1	1					4	5,1%
16						2						2	2,5%
8			1		3		7					11	13,9%
6			1	1								2	2,5%
5												0	0,0%
4	1							3				7	8,9%
3			2		4	1						9	11,4%
2		2	2	4	7	1			8			24	30,4%
1		2	1	5	4					2		14	17,7%
0	4	2	2	2	4	5,1%							
-1			1									1	1,3%

La méthode en microdilution donne des résultats à +/- une dilution équivalents à la CMI de référence pour 51.2% des souches testées, les bandelettes E-test pour 65.2% et les bandelettes Liofilchem pour seulement 32%. La méthode des bandelettes a tendance à donner des CMI plus élevées. En effet, les résultats des CMI par bandelettes E-test donnent des dilutions à :

+1 et +2 pour 29.7% et 48.1% des souches, pour respectivement les bandelettes E-test et Liofilchem

+1 et +2 et +3 pour 48.7% et 59.5% des souches

+1 et +2 et +3 et > +3 pour 65.4% et 93.7% des souches par rapport à la méthode de référence.

Ainsi, pour les bandelettes E-test, 10 souches sont rendues résistantes alors qu'elles sont rendues sensibles par la méthode de référence. Et pour Liofilchem, 24 souches sont rendues résistantes alors qu'elles sont rendues sensibles par la méthode de référence.

B. Lincomycine

Les résultats des CMI et des disques sont récapitulés dans l'Annexe 6. Nous avons dû écarter la souche 31 (pas pure pour les disques) ainsi que quelques souches qui n'avaient pas poussé en milieu liquide (Tableau 8).

Tableau 8 Bilan des souches qui ont poussé ou non dans la technique de CMI en milieu liquide pour la lincomycine

	pas de pousse lincomycine (témoin)
CMI liquide	44/68/75/87/E/K/Q/S/X/W

1. Courbes de répartition des diamètres en fonction des CMI

Pour la détermination des CMI, les deux contrôles de qualité concernés ont des résultats corrects en méthode de référence (liquide) et en méthode en milieu solide.

Souches	CMI linco solide 24h	CMI linco liquide 24h	linco liquide 48h	CMI CLSI
saur 25923	0,5	1	1 et 2	0,5 à 2
e faecalis	16	16	64	16 à 64
saur 29213	0,5	0,5	0,25 et 1	
pyo	>256	>64	64	
E. coli	>256	>64	64	

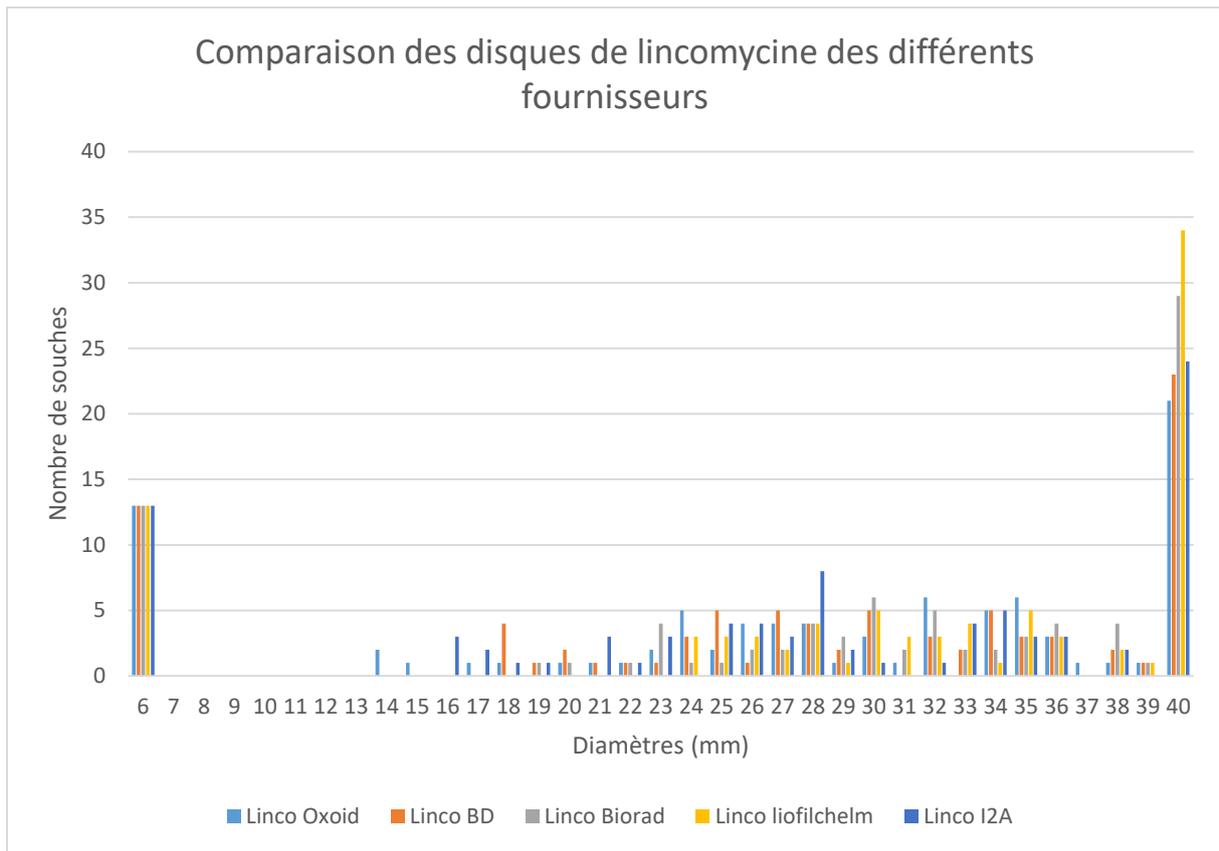


Tableau 9 Somme des diamètres

Linco Oxoid	Linco liofilchelm	Linco Biorad	Linco BD	Linco I2A
2273	2484	2540	2345	2308

Le disque lincomycine Biorad semble être le plus chargé.

2. Résultats des différentes méthodes de détermination de CMI

CMI en gélose

Les CMI en gélose sont déterminées à la première dilution d'antibiotique où il y a extinction du spot.

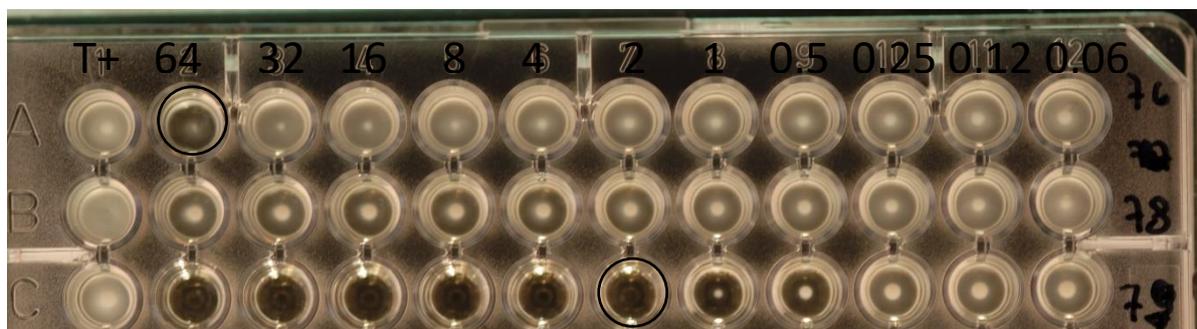


Figure 25 CMI en gélose, lincomycine 0.25 mg/L



Figure 26 CMI en gélose, lincomycine 0.50 mg/L

CMI en microdilution



Comparaison des méthodes de détermination des CMI

Tableau 10 Comparaison des CMI solide et des CMI liquides lues à 48h

	CMI liquide												n	%
	Différence	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64		
CMI solide	>3			1 (S)									1	1,18%
	3								1				1	1,18%
	2												0	0,00%
	1	1		1		1							3	3,53%
	0			1	2		1				2	20	26	30,59%
	-1				11	4			3				18	21,18%
	-2				1	8	1	1	5	1	6		23	27,06%
	-3					1	2		5	1	2		11	12,94%
-4							1		1			2	2,35%	

Tableau 11 Comparaison des CMI solides et des CMI liquides lues à 24h

	CMI liquide à 24h											n	%
	Différence	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64		
CMI solide	>3											0	0,00%
	3											0	0,0%
	2	1			1						21	23	27,1%
	1			1		1						2	2,4%
	0			6	3				2		2	13	15,3%
	-1			1	17							18	21,2%
	-2					3		2	3			8	9,4%
	-3				1	1	1	2	3	3	4	15	17,6%
-4							1	4	1		6	7,1%	

Ainsi, la méthode en milieu solide est en accord à +/- une dilution pour 55.3% à 48h contre 38.8% à 24h des souches testées. Cette méthode a tendance à donner des CMI plus faibles.

Quelle méthode choisir comme référence ?

La méthode de référence est la mesure de CMI en milieu liquide ; en effet, pour la clindamycine, l'EUCAST utilise le milieu liquide pour établir ses courbes.

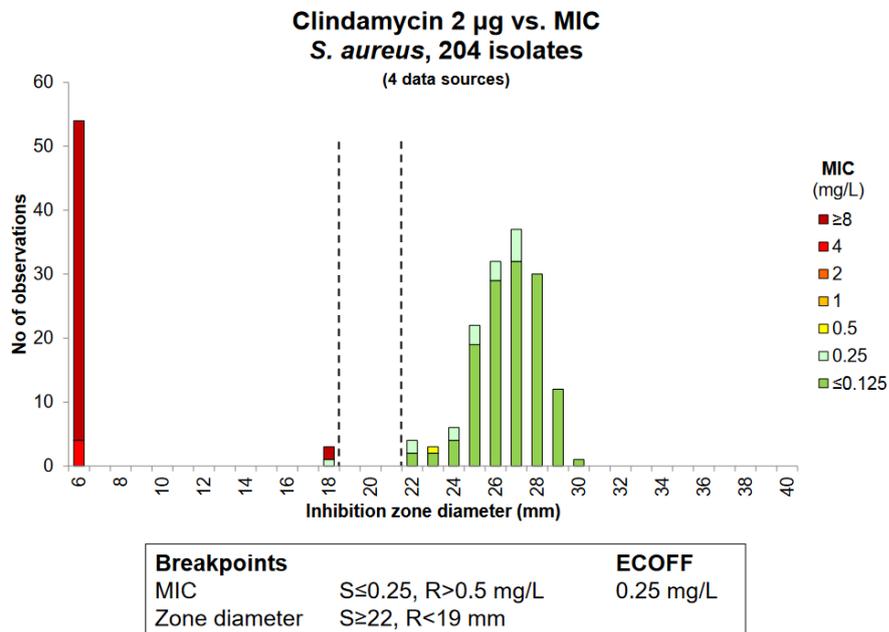


Figure 27 Courbe de répartition des disques en fonction des CMI de la clindamycine sur *S. aureus*, EUCAST février 2017

Lecture des diamètres

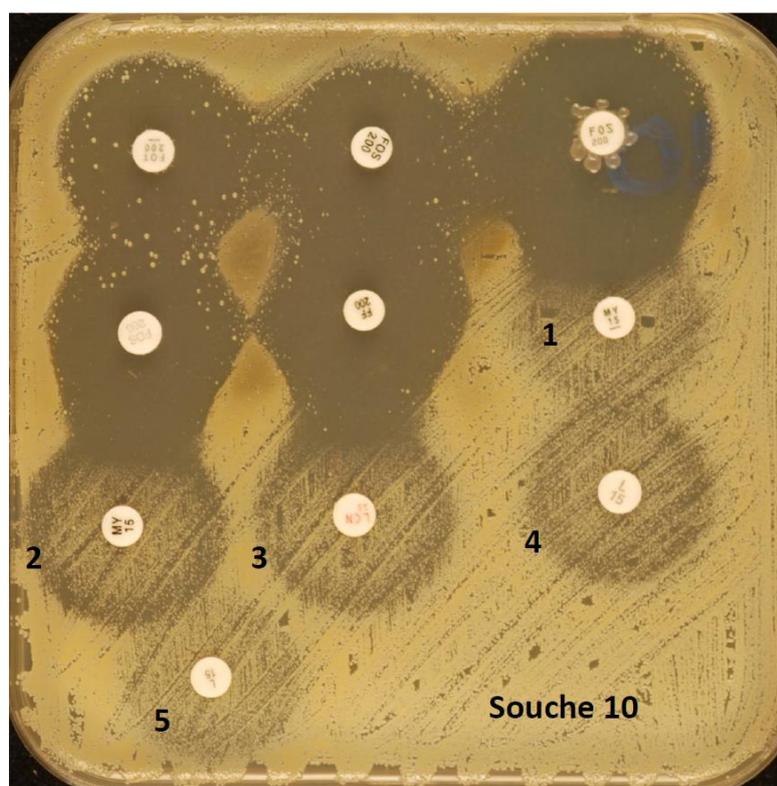
Pour la lincomycine, nous avons mesuré les diamètres d'inhibition après 24 et 48 H d'incubation (Annexe 7).

A 24h, un voile était présent pour certaines souches autour des disques, nous avons lu le diamètre le plus grand en considérant le caractère bactériostatique de la lincomycine. Mais, à 48h d'incubation, ces voiles se sont révélés être plus importants, et en comparant avec les CMI trouvées (> 64 mg/L pour ces souches), nous avons déterminé les diamètres des zones d'inhibition à 48h en rendant un diamètre contre le disque pour ces souches.

En effet, les diamètres lus à 48 H d'incubation étaient corrélés avec la mesure des CMI, nous avons décidé de garder les mesures de diamètres à 48 H pour les répartitions présentées ci-après. Quelques exemples de discordances sont présentés dans le Tableau 12 ainsi que quelques exemples de géloses à 48h.

Tableau 12 Discordances 24 / 48 H pour les diamètres lincomycine

Souches	Linco Oxoid 24h	Linco Oxoid 48h	Linco BD 24h	Linco BD 48h	Linco Biorad 24h	Linco Biorad 48h	Linco liofilhelm 24h	Linco liofilhelm 48h	Linco I2A 24h	Linco I2A 48h	CMI linco solide 24h	CMI linco liquide 24h	linco liquide 48h
10	32	6	30	6	33	6	33	6	28	6	>256	>64	64
14	32	25	39	25	36	25	36	31	27	20	2	16	16
30	31	6	30	6	30	6	32	6	26	6	>256	>64	64
41	24	6	25	6	26	6	27	6	25	6	64	>64	64
54	30	6	27	6	29	6	31	6	28	6	>256	>64	64
55	27	6	36	6	30	6	30	6	25	6	256	>64	64
58	24	6	24	6	27	6	28	6	27	6	>256	>64	64
66	27	6	27	6	30	6	30	6	28	6	>256	>64	64
67	28	6	28	6	31	6	33	6	28	6	>256	>64	64
A	30	6	28	6	33	6	33	6	26	6	>256	>64	64
S	27	6	25	6	28	6	28	6	27	6	>256		0,5



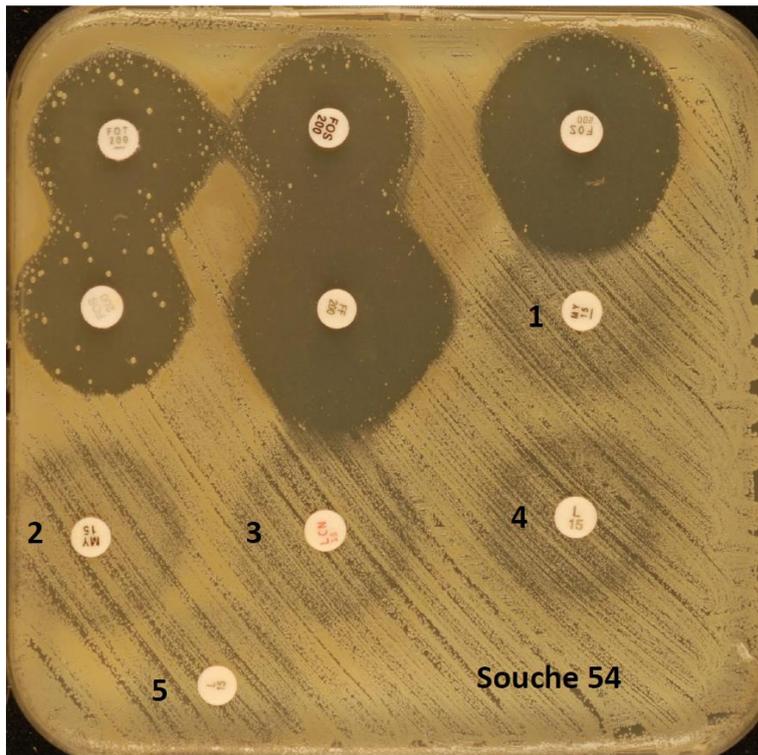
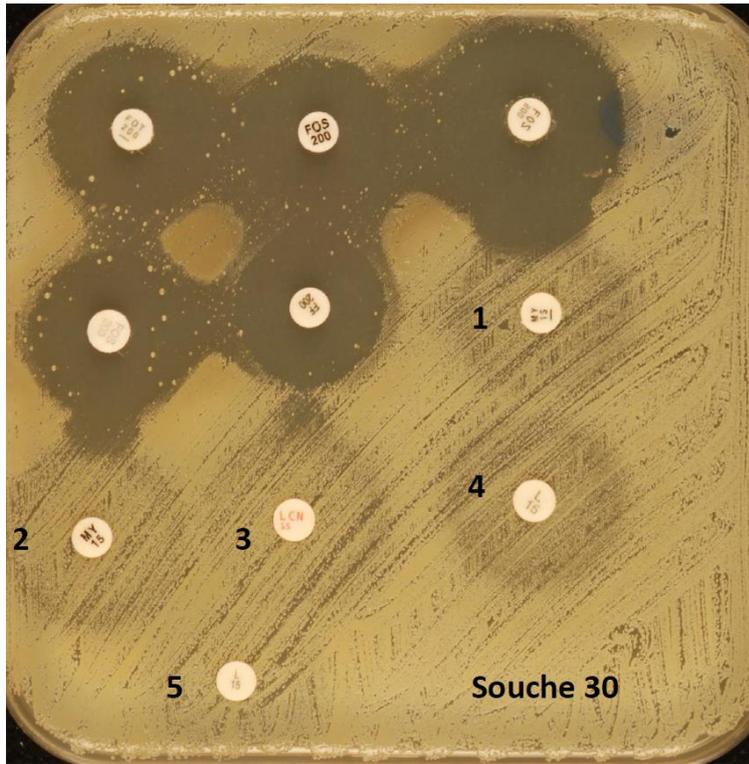


Figure 28 Lecture des diamètres lincomycine en 48 H.

Pour ces 3 souches, la lecture des diamètres en 24 H était supérieure à 27 mm. (1 : oxoid, 2 : Liofilchem, 3 : Biorad, 4 : BD, 5 : I2A).

Il faut noter que 2 souches : 62 et 84 posaient systématiquement un problème : la CMI catégorise ces 2 souches résistantes, alors que le diamètre d'inhibition est ≥ 34 mm (catégorisation probablement sensible). C'est d'ailleurs les 2 seules discordances très majeures, à part la souche 63 qui pose le même type de problème avec le seul disque Liofilchem. Et la souche 39 est catégorisée sensible à la lincomycine alors que sa CMI en milieu liquide la catégorise intermédiaire, à noter que la CMI en milieu solide la catégorise sensible.

Souches		Oxoid 48h	LF 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h	CMI solide 24h	CMI liquide 24h	CMI liquide 48h
39	20122091	34	40	39	34	33	1	4	4
62	20141204	39	40	40	40	40	4	16	16
84	20161200	35	40	38	35	40	4	16	16

Les résultats antérieurs du CH d'Aix sont présentés dans l'annexe 8.

Ces trois souches ont été reprises à la vue de ces résultats. (Tableau 13)

Tableau 13 Trois souches discordantes entre CMI et diamètres

			Disques refaits suite aux résultats discordants CMI/diamètres								
			Linco 48h	induction	Pristina	Linco	Synercid	Clinda	Erythro	Spira	Clinda bis
souche 62	Col petite blanche	S. epi	40	0	31	13	30	25	11	26	26
	Col grosse blanche	s. epi		0	34	13	32	28	12	28	28
	Col grosse jaune	s. pasteur		0	31	31	28	30	32	25	30
souche 39		S aureus	34-40	0	28	25	29	28	32	25	30
souche 84	grande colonie	S epi	35-40	0	33	23	31	23	12	25	25
	petite colonie	S epi		0	32	16	30	18	12	24	20

Pour la souche 39, le diamètre contrôlé est à 29 mm contre 34 à 40 mm suivant les fournisseurs pendant notre étude. Mais le diamètre antérieur retrouvé à Aix (24 mm) nous conforte pour rendre le diamètre contrôle pour cette souche.

Pour la souche 84, il y a deux colonies différentes, dont le phénotype est très proche malgré une résistance un peu plus forte à la lincomycine de la grande colonie. Le résultat antérieur du CH d'Aix étant à 16 mm, on a gardé la valeur du contrôle à 16 mm pour les courbes de répartition.

Pour la souche 62, il y avait finalement 3 colonies. L'une, très différente des deux autres semble être une contamination et a faussé nos résultats. Les deux autres colonies semblent être les mêmes. Elles sont bien résistantes en disque et en CMI pour la lincomycine.

Pour l'établissement des courbes de répartition, nous avons rectifié les diamètres retrouvés par les diamètres contrôlés dans le tableau plus haut.

D'après l'EUCAST 2017, la souche 62 est résistante à l'érythromycine (<18mm) et sensible à la clindamycine (>22 mm). Et l'EUCAST recommande de rechercher le caractère inductible de cette résistance (antagonisme érythromycine clindamycine).

En l'absence d'induction, l'EUCAST recommande de répondre sensible à la clindamycine, spiramycine et lincomycine.

Et en présence d'induction, il recommande de répondre sensible à spiramycine, lincomycine et clindamycine avec le message suivant : « de rares échecs cliniques ont été rapportés par sélection de mutants constitutifs résistants. »

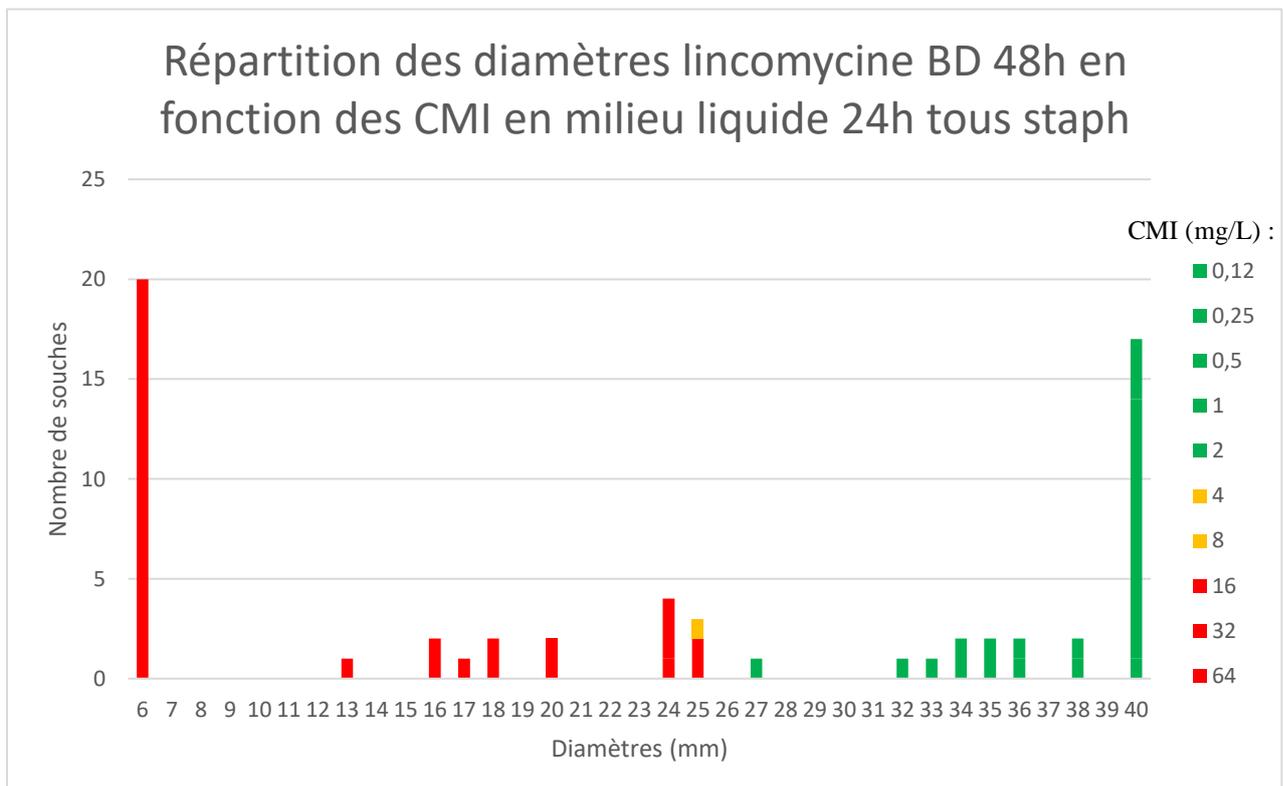
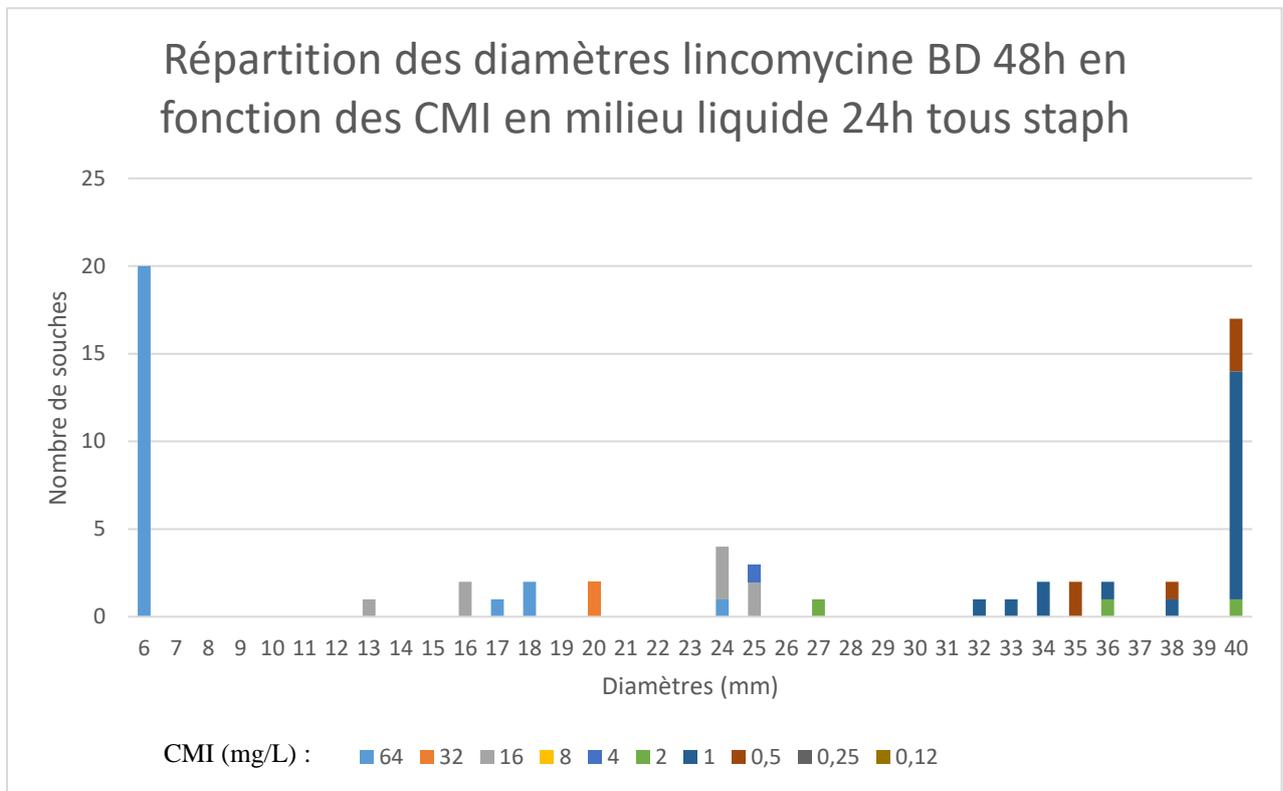
Pour la souche 62, il n'y a pas d'image d'induction et pourtant la lincomycine est bien résistante. Cette souche est probablement de phénotype L (génotype *lnu(A)*).



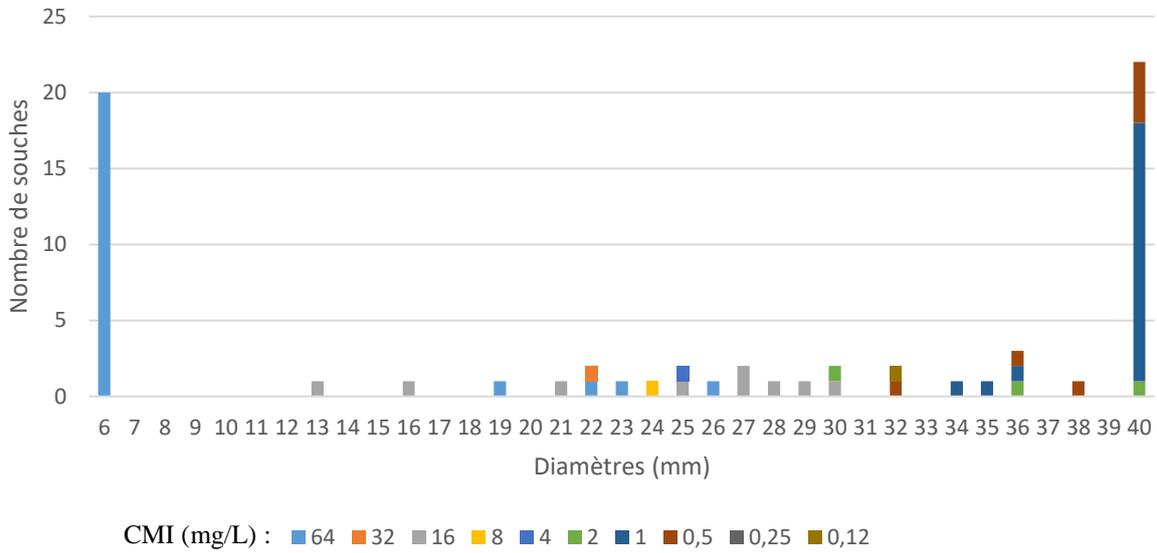
Figure 29 souche 62 Absence d'induction E : érythromycine (résistante); L : lincomycine (résistante), DA : clindamycine (sensible)

Courbes de répartition :

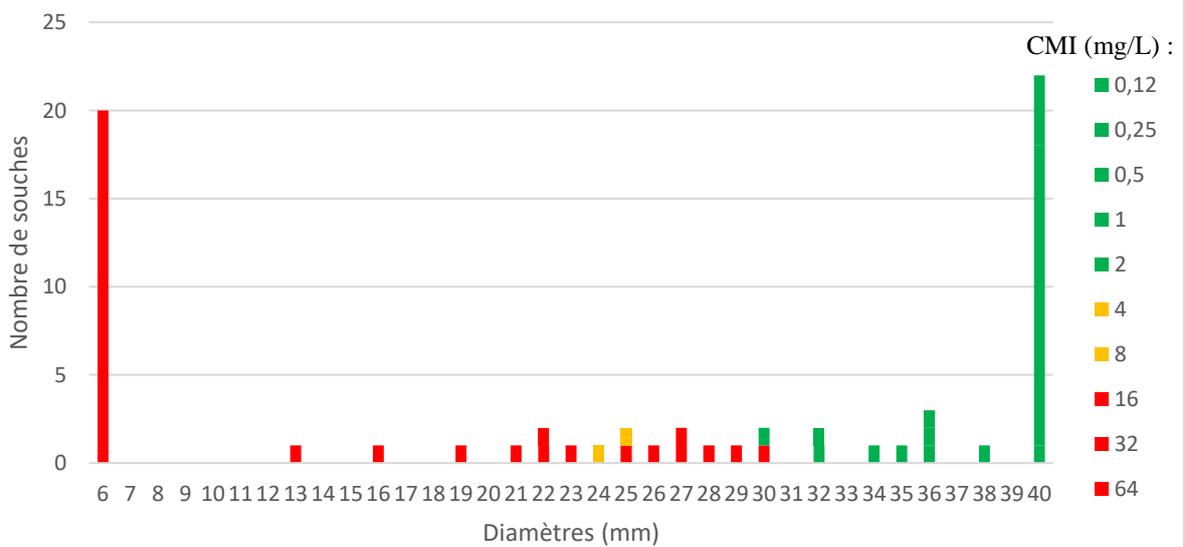
Pour chaque fournisseur, on a considéré les concentrations critiques de la lincomycine pour catégoriser les souches R (en rouge), I (en jaune), et S (en vert).



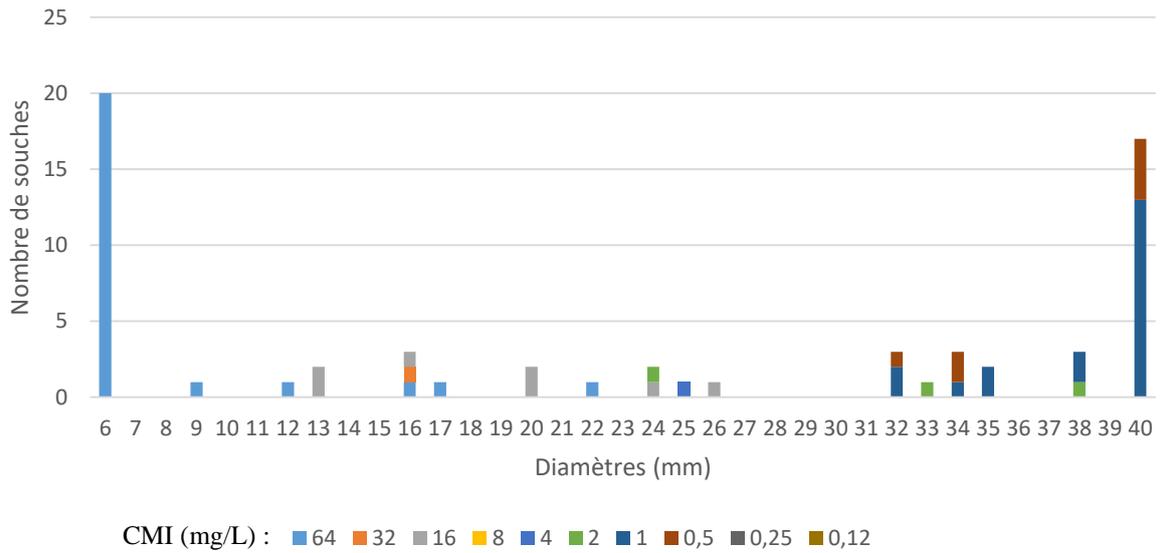
Répartition des diamètres lincomycine Biorad 48h en fonction des CMI en milieu liquide 24h tous staph



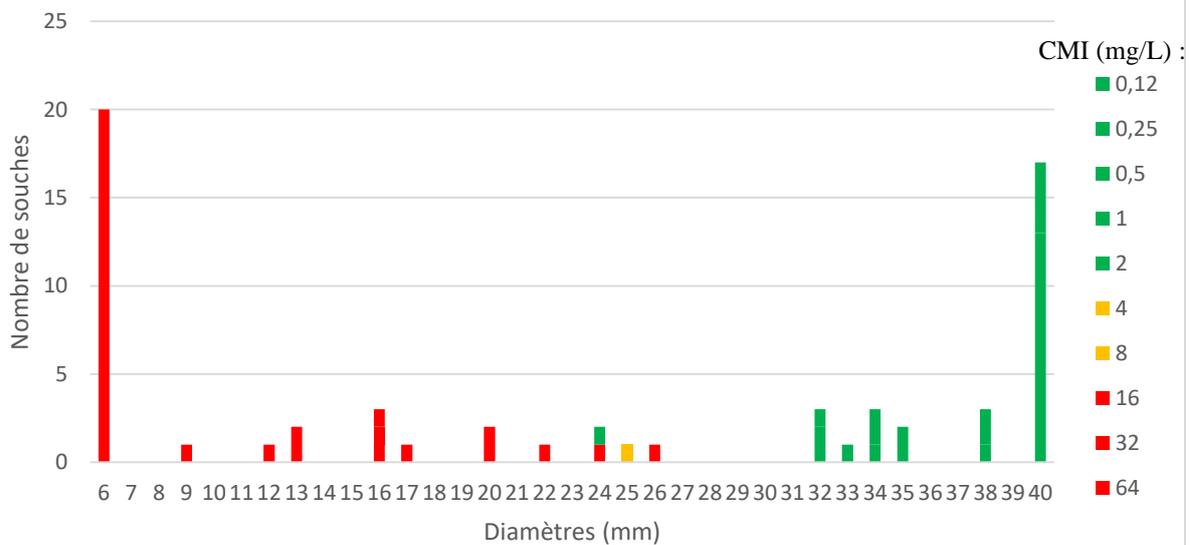
Répartition des diamètres lincomycine biorad 48h en fonction des CMI en milieu liquide tous staph



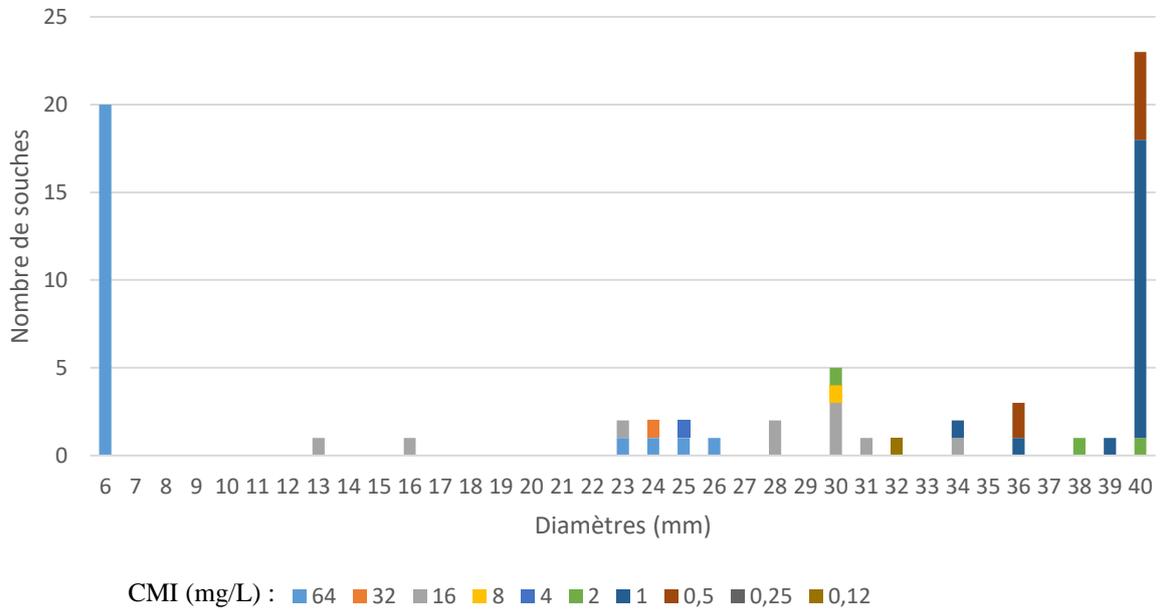
Répartition des diamètres lincomycine I2A 48h en fonction des CMI en milieu liquide 24h tous staph



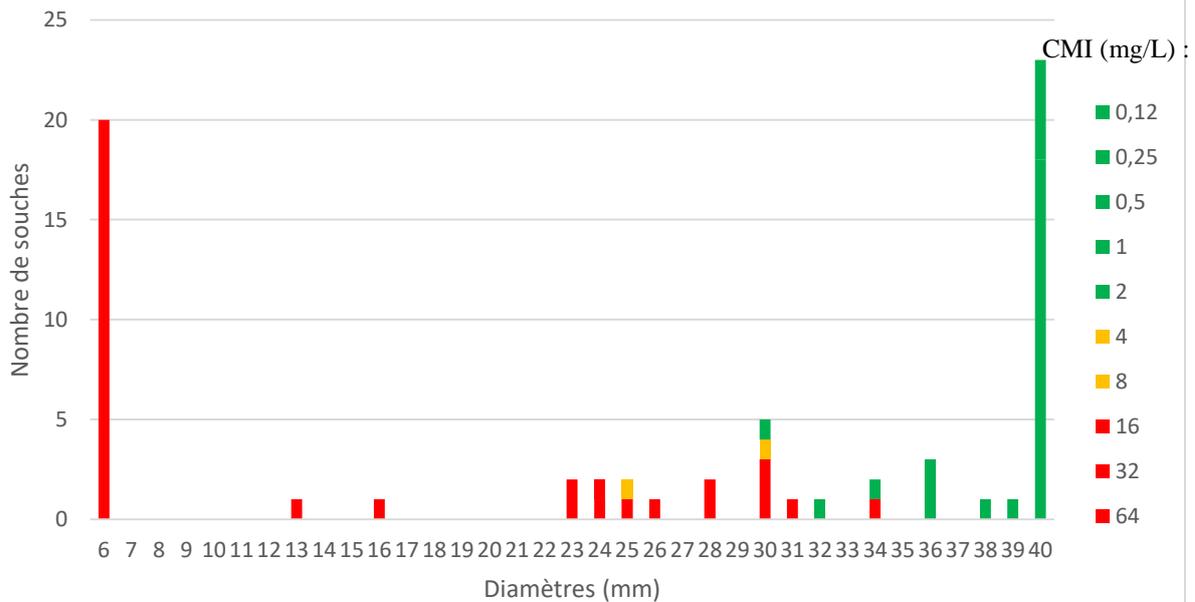
Répartition des diamètres lincomycine I2A 48h en fonction des CMI en milieu liquide 24h tous staph



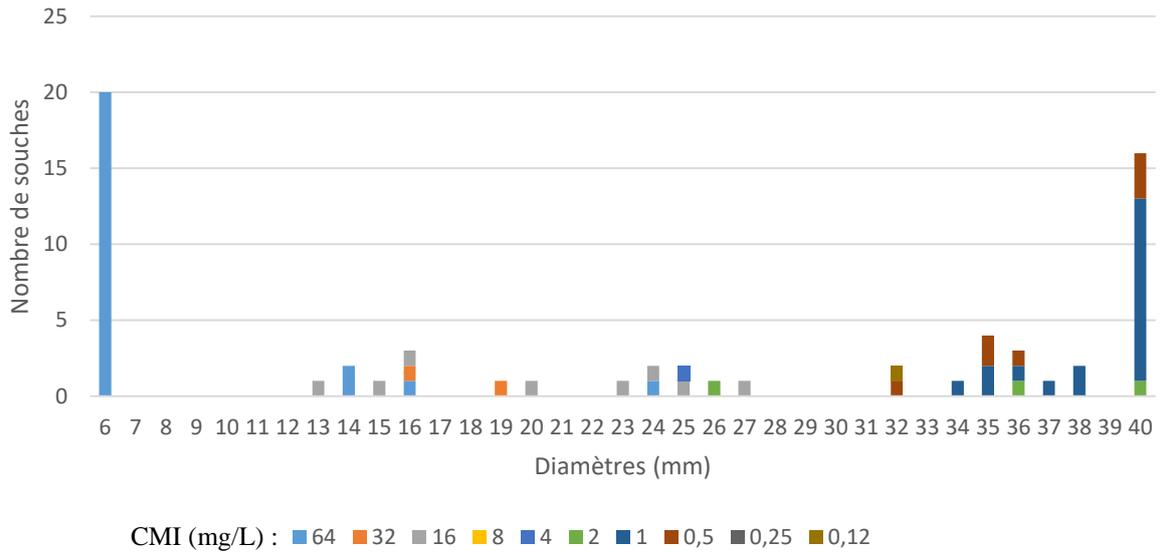
Répartition des diamètres lincomycine 48h en fonction des CMI en milieu liquide tous staph



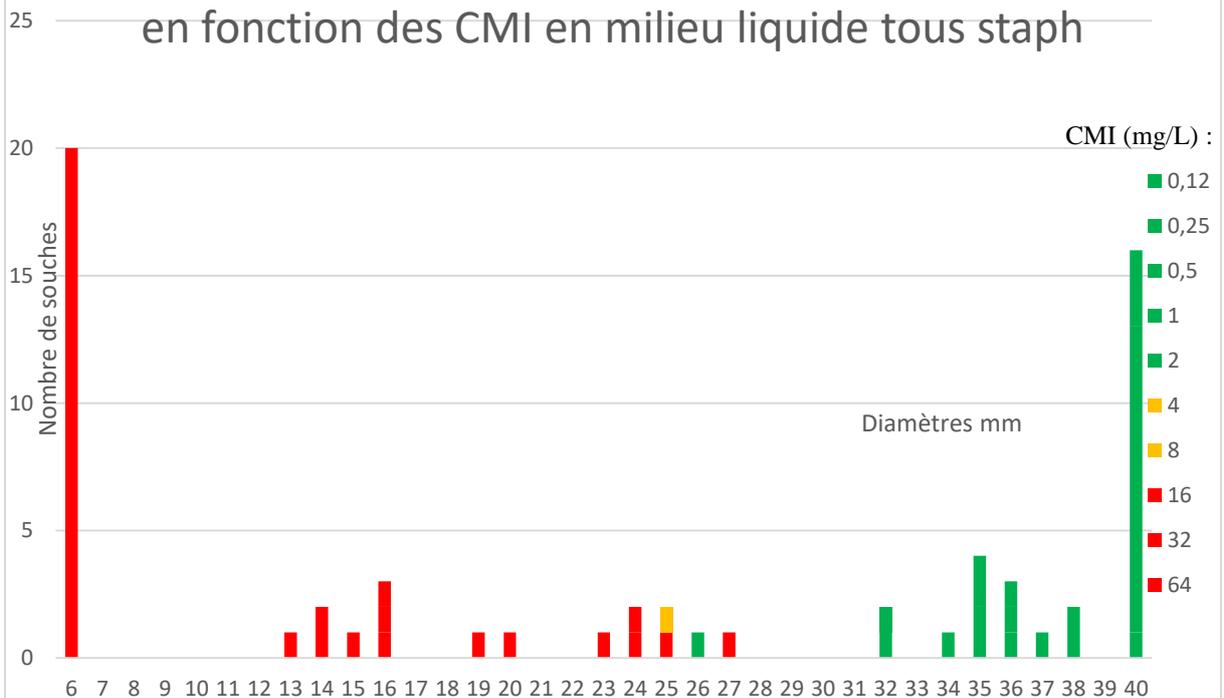
Répartition des diamètres lincomycine LF 48h en fonction des CMI en milieu liquide tous staph



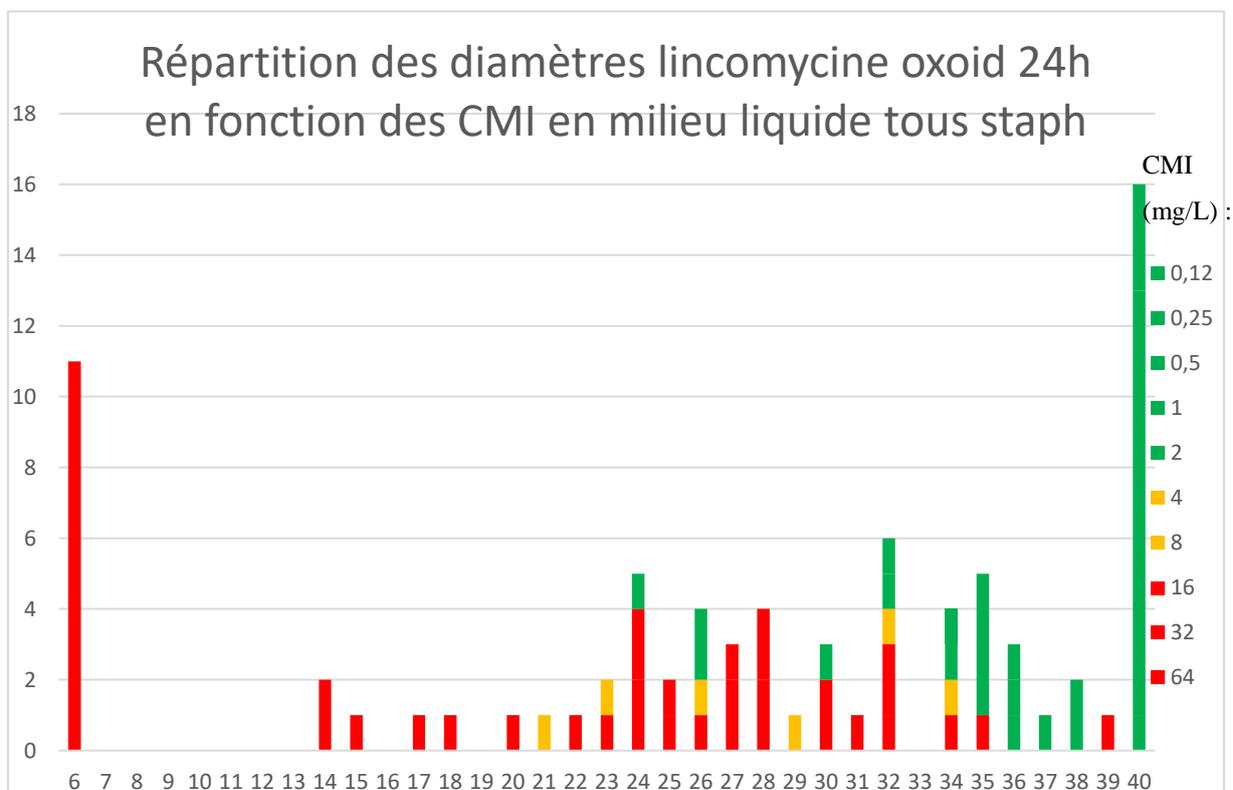
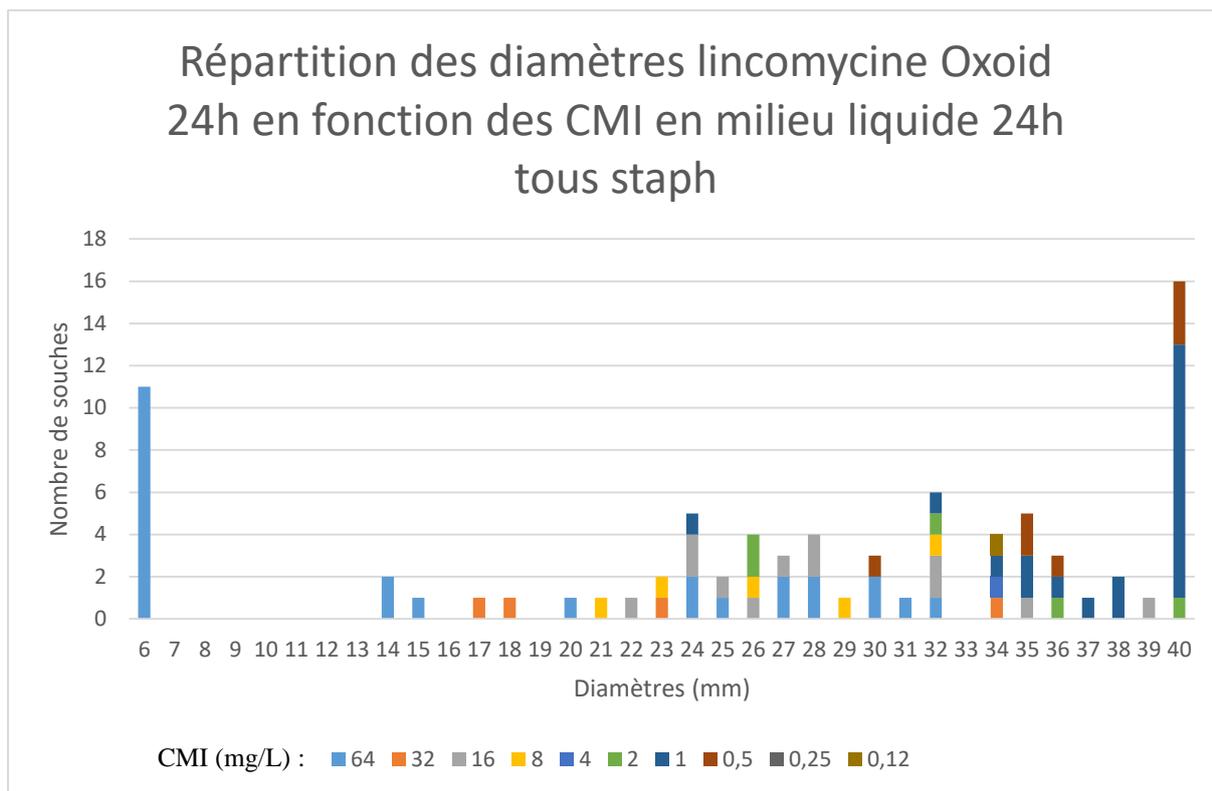
Répartition des diamètres lincomycine Oxoid 48h en fonction des CMI en milieu liquide 24h tous staph



Répartition des diamètres lincomycine oxoid 48h en fonction des CMI en milieu liquide tous staph



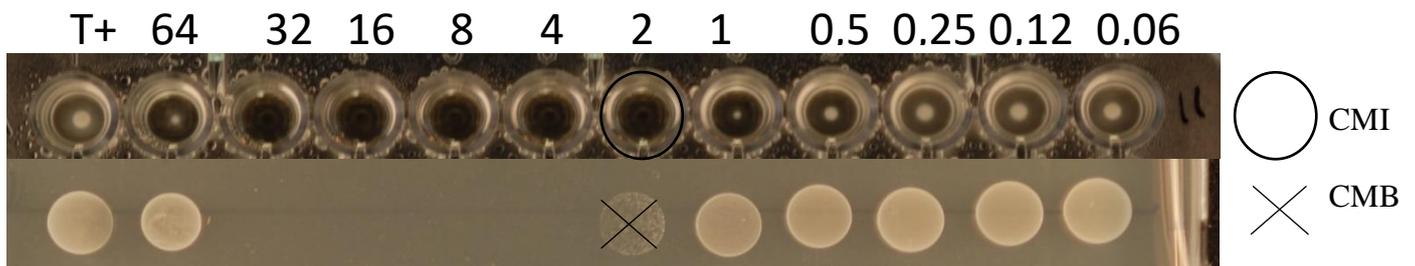
Voici un exemple de courbe de répartition avec la lecture à 24h des disques :



En effet, avec une lecture des disques à 24h, la courbe devient très difficile à interpréter.

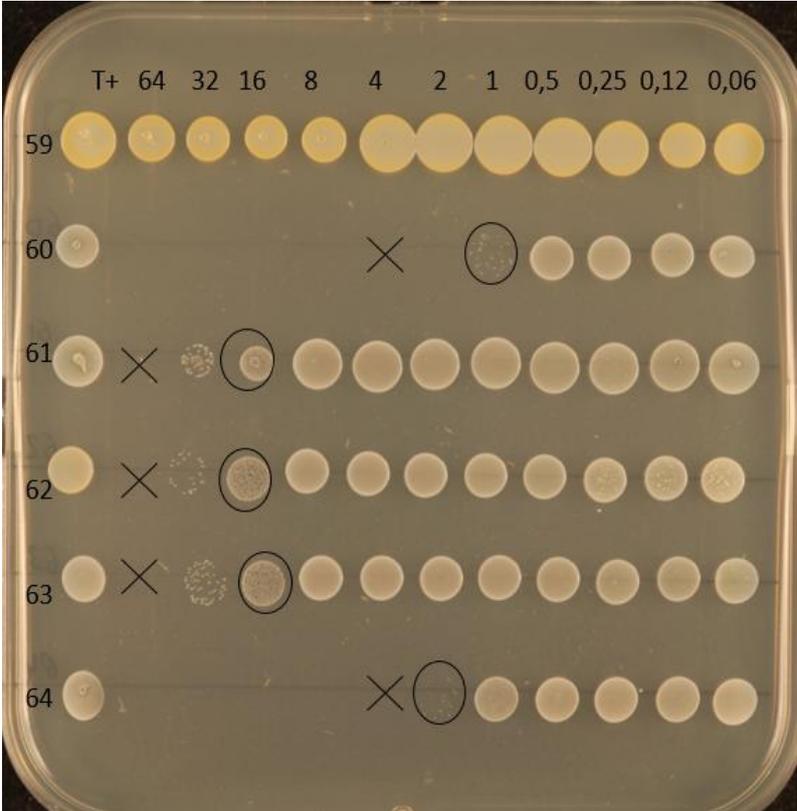
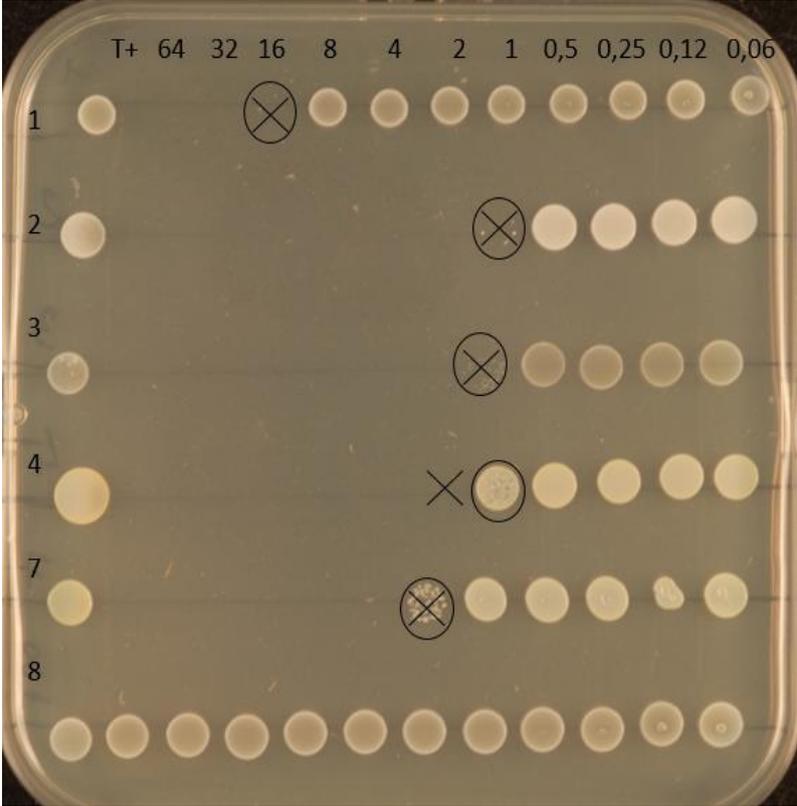
Ainsi, à partir des courbes de répartition des disques BD, I2A et Oxoid, on pourrait proposer un diamètre critique de 26 mm. Mais pour Biorad et Liofilchem, on serait plutôt aux alentours de 31 mm. On peut donc proposer un diamètre critique de 31 mm.

3. CMB

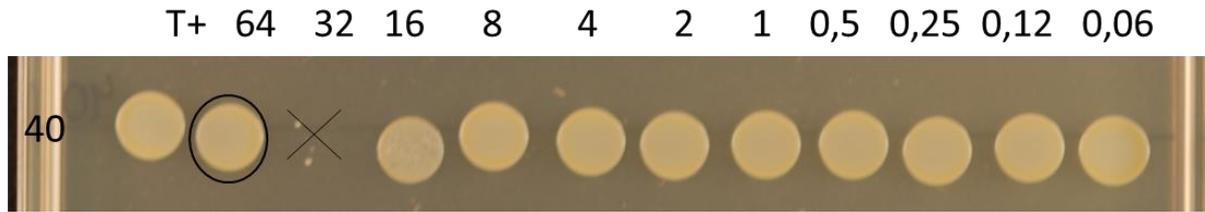


Dans l'exemple ci-dessus (souche 11), la CMI est à 2 mg/L et la CMB est à 2 mg/L également. De même pour les souches de 1 à 8, les CMB sont très proches des CMI.

Mais, pour les souches 61 à 63, il y a un écart de deux dilutions (CMB 4 fois supérieure à la CMI), en effet on observe une petite pousse dans les puits contenant des concentrations plus fortes d'antibiotiques que la CMI.



Quelques sauts de puits dont la souche 40 :



Globalement, on retrouve 38 souches (43.7%) avec une CMB égale à la CMI, 27 souches où elle est deux fois supérieure à la CMI (31.0%), 15 souches où elle est 4 fois supérieure (17.2%) ; pour 6 souches, elle est 8 fois supérieure à la CMI (6.9%), et pour une souche elle est 16 fois supérieure.

CMI 24h (mg/L)	égale CMI	x 2 CMI	x 4 CMI	x 8 CMI	x 16 CMI
0,5			1		
0,25					
0,5		5	1	1	1
1	2	10	8	2	
2	1	2		2	
4			1		
8		4		1	
16	7	2	4		
32		4			
64	28				
	38	27	15	6	1
	43,7%	31,0%	17,2%	6,9%	1,1%

IV. DISCUSSION

A. La fosfomycine

Nous n'avons pas assez de souches proches des concentrations critiques pour établir des courbes de concordance, ce qui est souvent le cas d'ailleurs pour les répartitions proposées par l'EUCAST. Mais d'après nos données, nous pouvons proposer un diamètre critique de la fosfomycine 200 μ g envers les staphylocoques à 23 mm (sensible si \leq 23 mm ; résistant si $<$ 23 mm). Alors que l'EUCAST ne propose pas de diamètres critiques pour la fosfomycine en 2017 sur *Staphylococcus*, le CASFM a retenu notre proposition de 23 mm.

Pour arriver à ce résultat, nous avons utilisé la méthode de détermination de la CMI en milieu gélosé à différentes concentrations de fosfomycine. Mais nous avons aussi utilisé en parallèle la microdilution et les bandelettes imprégnées de fosfomycine. Ainsi, nous avons observé des différences significatives sur les résultats de CMI. En effet, pour la CMI en milieu liquide, 48.8% des CMI étaient rendues supérieures de plus de 2 dilutions d'écart, 25.6% pour les bandelettes E-test et 45.6% pour les bandelettes Liofilchem. En ce qui concerne les bandelettes Liofilchem, il semblerait qu'il y ait eu un problème de bandelettes déchargées en antibiotique (souches avec des CMI $>$ 256 mg/L). Ainsi, on compte 28 souches qui ont une CMI supérieure ou égales à 256 avec la bandelette Liofilchem et seulement 14 souches avec la bandelette E-TEST.

L'EUCAST ne valide pas la détermination des CMI en milieu liquide pour la fosfomycine ; d'une part en raison du phénomène de saut de puit qui rend difficile la lecture de CMI, d'autre part, en raison de la persistance de bactéries plus aisée en milieu liquide et qui est aussi fonction de l'inoculum.

Pour le phénomène de saut de puits, Gunnison (34) en 1964, ont essayé de déterminer la nature des colonies qui persistent après la valeur dite de CMI pour la pénicilline sur *S. aureus*. Génétiquement sensible mais phénotypiquement résistante, ces colonies persistantes peuvent être à l'origine d'échec thérapeutique car ce seraient des souches indifférentes à l'antibiotique dans leur « état quiescent » au moment de l'interaction avec l'antibiotique testé (« drug-indifference » terme de McDermott 1958). En effet, quand ils ont repiqué ces souches « persistantes », les isollements ont donné des souches totalement sensibles.

Pourtant, la méthode en dilution liquide est utilisée par tous les automates, et on rend des CMI à la fosfomycine pour le staphylocoque. Cependant, les résultats d'un contrôle de qualité organisé par le centre hospitalier d'Aix en Provence qui a envoyé une souche de *S. aureus* sensible à la fosfomycine à une cinquantaine de centres hospitaliers relativise ce propos. Tous les utilisateurs d'automates ont catégorisé la souche sensible à la fosfomycine, alors qu'on pouvait s'attendre à des résultats résistants (28 Vitek, 2 Microscan et 1 Phoenix).

L'automate Vitek rend la fosfomycine pour les entérobactéries et les staphylocoques sur deux cartes différentes, allant respectivement de 16 à 256 mg/L et de 8 à 128 mg/L.

Thermo Scientific commercialise le système sensititre. Ce système utilise des résultats de CMI mesurés et non extrapolés. Ceci offre une plus grande sensibilité pour détecter des résistances, une meilleure mesure de l'efficacité de l'antibiotique, il utilise la méthode en microdilution. Il permet d'éliminer les tests supplémentaires faits en routine dans de nombreux laboratoires. Malheureusement, ce nouveau système ne comprend pas la fosfomycine, en effet la méthode en microdilution n'est pas la méthode de référence pour déterminer les CMI à cet antibiotique.

Le CLSI et l'EUCAST ne valident pas la microdilution pour la détermination des CMI de la fosfomycine.

L'EUCAST 2017 publie, pour la première fois, dans ses recommandations, un diamètre critique pour tester la sensibilité à la fosfomycine sur les entérobactéries.

En effet, l'EUCAST reconnaît que la détermination des CMI et des diamètres de zone d'inhibition est difficile à mettre en œuvre. Il est rappelé qu'il peut exister des colonies dans la zone d'inhibition. D'autre part, la détermination des CMI par la méthode en microdilution est toujours non validée, la méthode de référence restant la détermination en gélose solide (ISO 20776-1).

Pour le CLSI, il n'y a pas de valeurs critiques fosfomycine pour les staphylocoques. Les concentrations et diamètres critiques pour les entérobactéries sont présentés dans le Tableau 14.

De plus, pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition, nous avons utilisé des disques de fournisseurs différents. Nous nous sommes rendu compte qu'il y avait des discordances entre les différents fournisseurs, et les courbes de répartition en sont impactées.

Avec une somme des diamètres de 2913 mm, le disque BIORAD semble à l'évidence, le disque le plus chargé en fosfomycine.

FF Biorad	FF liofilchem	FF Oxoid	FF I2A	FF BD
2913	2567	2329	2607	2417

La différence entre les disques Biorad et les autres fournisseurs est significative.

De même, pour les CMI fosfomycine en bandelettes, nous avons écarté les bandelettes liofilchem, les bandelettes étaient-elles déchargées en antibiotique ?

FF CMI solide (mg/L)	FF CMI liofilchem	FF CMI E test
1675,75	7909,13	4868,69

Une étude de juin 2016 de l'EUCAST avait montré une différence significative entre les activités antibiotiques des disques venant de différents fournisseurs. Seize disques d'antibiotiques de neuf fournisseurs différents avaient été testés en triplicats sur des souches de contrôle qualité avec des diamètres de zone d'inhibition déjà déterminés. Une première étude avait été faite en 2014, puis en 2015, les fabricants de disques ont recommencé l'expérience en utilisant des lots différents pour les disques ayant eu des résultats discordants.

L'EUCAST en concluait qu'il était important que les laboratoires qui travaillent avec ces disques utilisent un contrôle de qualité interne qui doit être à +/- 1 mm de la valeur.

Antimicrobial disk	Bio-Rad		Liofilchem		BD		Abtek		SirScan		Oxoid		HiMedia		Bioanalyse		Mast		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Benzylpenicillin 1 unit					L				H	H			NA	NA	H	H			
Amoxicillin-clav. 30 µg	H	H*					L						H	H		L			
Piperacillin-tazo. 36 µg							L	L	H				NA	NA					
Oxacillin 1 µg			L		L				L				H	H	L				
Mecillinam 10 µg							L		H				H		H				
Cefotaxime 5 µg ¹							NA		L				NA	NA					
Cefoxitin 30 µg ²	H*	H*	H	H*			NA	L					L*	L*		L			
Ceftazidime 10 µg							L	L					L	H					
Meropenem 10 µg ¹	H		H*				L	L			H		H						
Ciprofloxacin 5 µg ²	L				L		L	L					H	H*		L	L		
Norfloxacin 10 µg							L		L				H*	H					
Pefloxacin 5 µg			L	L	L		NA	NA	NA				H						
Gentamicin 10 µg					H		L		NA				H	H					
Tobramycin 10 µg	NA	NA	H										H*	H*					
Erythromycin 15 µg			L		L		L		L				H	H	L*	L			
Tetracycline 30 µg			L	L*	L*		L		L*					L	L				L

Mean value within ± 1 mm of the target value
Mean value >1 mm but within ± 2 mm of the target value
Mean value >2 mm from target value but still within the QC range
Mean value out of the QC range
Disk included in first study, but not supplied for second study

NA = Not Available
H = High, mean value >1 mm above target
L = Low, mean value >1 mm below target
* One or more readings out of QC range

Figure 30 Résultats de l'étude de l'EUCAST, juin 2016

Ainsi, il est possible de proposer un diamètre critique de la fosfomycine pour les staphylocoques dans certaines infections nécessitant une bithérapie pour des infections sévères à staphylocoque multi-résistant.

Mais la fosfomycine, à l'heure actuelle, est surtout utilisée dans le traitement monodose de la cystite aiguë simple de la femme jeune à entérobactérie devant une bandelette urinaire positive et sans avoir fait d'ECBU (recommandations de la SPILF 2015).

L'EUCAST 2017 publie un diamètre critique à 24 mm avec une CMI à 32 mg/L pour les entérobactéries.

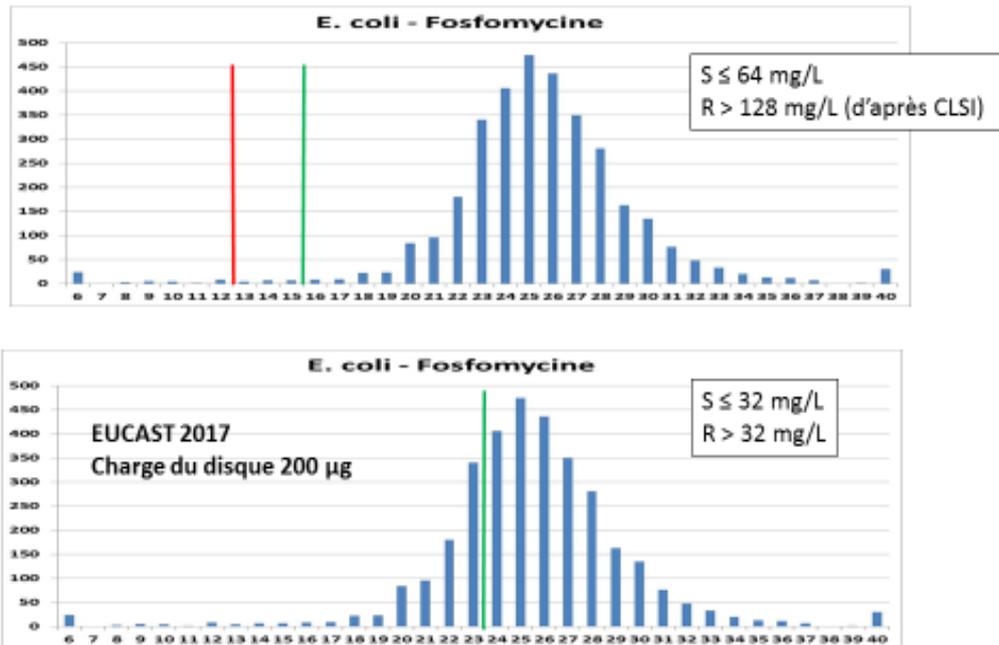
D'un autre côté, le CLSI publie les concentrations et diamètres critiques présentées ci-dessous.

Tableau 14 Concentrations et diamètres critiques de la fosfomycine pour les Entérobactéries d'après le CLSI

Diamètres (mm)			CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
S	I	R	S	I	R
≥ 16	13-15	≤ 12	≤ 64	128	≥ 256

Le CLSI précise : ces valeurs ne sont valables que pour les infections urinaires à *E. coli*, la seule méthode validée pour déterminer la CMI est la méthode de dilution en milieu gélosé et la microdilution ne doit pas être utilisée.

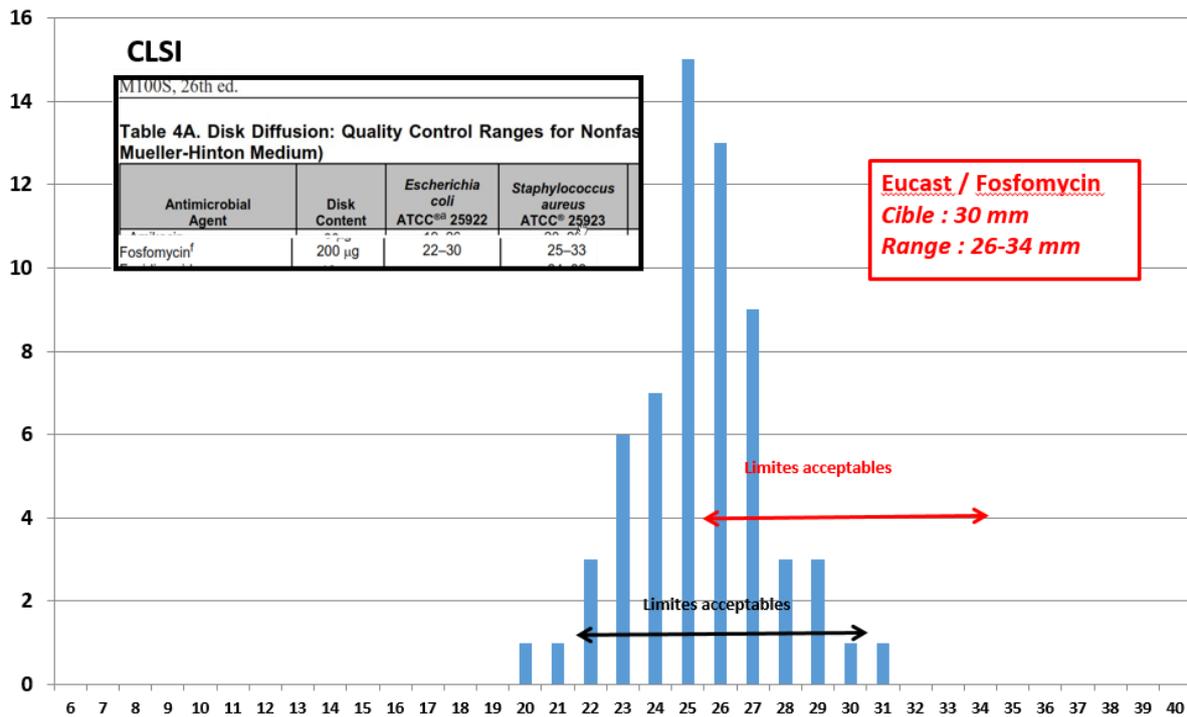
En général, une dilution correspond à 3 à 4 mm sur un diamètre de zone d'inhibition. Mais on passe d'un diamètre de 16 mm à 24 mm pour une dilution (32 à 64 mg/L), on augmente considérablement le nombre de souches d'entérobactéries considérées comme résistantes.



On peut se poser la question de la conduite à tenir pour les souches dont le diamètre d'inhibition est entre 16 et 24 mm. Faut-il faire des CMI ? Ou considérer le diamètre critique du CASFM à 19 mm et considérer toutes les souches avec un diamètre supérieur à 19 mm résistantes ? Dans son communiqué de 2017, le CASFM n'a pas retenu le diamètre critique de 24 mm, mais 19 mm.

D'ailleurs pour le même contrôle de qualité, E. coli ATCC 25922, l'EUCAST et le CLSI ne donnent pas les mêmes valeurs attendues pour les diamètres : de 22 à 33 mm pour le CLSI, de 26 à 34 mm pour l'EUCAST. Si on observe la courbe de répartition des souches, on comprend que le CLSI est plus juste. Les disques de fosfomycine utilisés par l'EUCAST étaient-ils trop chargés ?

CQ Fosfomycine E coli 25 922



B. La lincomycine

Pour la lincomycine, les courbes de répartition montrent que l'on peut considérer une souche comme sensible si le diamètre du disque lincomycine 15 µg est supérieur ou égal à 31 mm et résistante s'il est inférieur à 31 mm. Pour établir les courbes de répartition, nous avons utilisé la méthode en milieu liquide (microdilution) car c'est la méthode de référence ; d'ailleurs, l'EUCAST utilise cette méthode pour la clindamycine qui est un antibiotique très proche de la lincomycine. Il faut également souligner que, dans la courbe de répartition présentée plus haut, l'EUCAST ne présente que 3 souches avec un diamètre compris entre 6 et 22 mm. Nous avons volontairement choisi un nombre important de souches ayant des diamètres compris dans cette zone. Mais nous avons testé en parallèle la méthode de dilution de l'antibiotique en gélose et nous avons obtenu 17.65% des souches avec une CMI inférieure de plus de deux dilutions d'écart avec la CMI lue en méthode de référence.

De même que pour la fosfomycine, nous avons observé quelques discordances entre les disques des différents fournisseurs.

Il est recommandé de lire les diamètres à 24h. Pourtant, nous avons comparé les diamètres lus à 24 et 48h aux CMI. Et nous avons choisi de rendre les diamètres lus à 48h car certains

diamètres lus à 24h étaient rendus sensibles en disque et résistant en CMI ; alors qu'à 48h, on lisait résistant contre le disque.

L'automate Vitek teste la lincomycine pour les staphylocoques sur la carte AST631 avec une gamme de CMI de 1 à 16 mg/L.

Le CLSI recommande de rechercher l'image d'antagonisme à l'aide d'un disque de clindamycine (2 µg) et d'érythromycine (15 µg) espacés de 15 à 20 mm. En pratique, au laboratoire, la lincomycine est préférée à la clindamycine afin de ne pas à avoir à rapprocher autant les disques d'antibiotiques (image même avec un espacement de 30 mm). Si le phénotype MLS_B est retrouvé, la souche doit être dite résistante à l'érythromycine et à la clindamycine, si le résultat brut de la clindamycine est sensible.

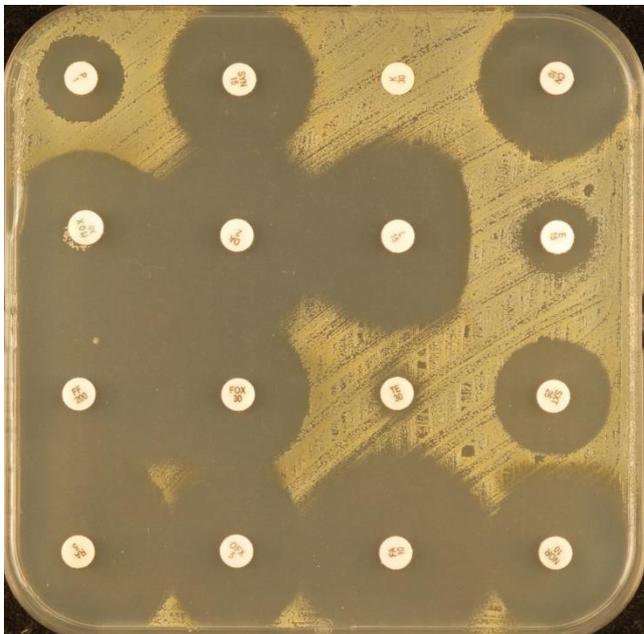


Figure 31 Exemple de phénotype MLS_B avec image en D de la lincomycine à côté de l'érythromycine

Mais avec ces nouvelles informations, le disque de lincomycine peut devenir plus qu'un moyen de connaître le caractère MLS_B d'une souche.

Dans le cas d'une souche résistante à l'érythromycine et sensible à la clindamycine, le CASFM recommande de rechercher le caractère inductible de cette résistance (antagonisme érythromycine clindamycine).

En l'absence d'induction, le CASFM recommande de répondre sensible à la clindamycine, spiramycine et lincomycine si le résultat brut de la clindamycine est sensible.

Et en présence d'induction, il recommande de répondre sensible à spiramycine, lincomycine et clindamycine, si le résultat brut de la clindamycine est sensible, avec le message suivant : « de rares échecs cliniques ont été rapportés par sélection de mutants constitutifs résistants. »

Mais, dans notre étude, la souche 62 était sensible à la clindamycine, sans image d'induction entre l'érythromycine et la clindamycine. D'après la recommandation du CASFM, cette souche devrait être catégorisée sensible à la lincomycine, alors qu'en fait elle est résistante. Ainsi, nous pouvons critiquer la recommandation du CASFM qui, en l'absence d'induction, catégorise la lincomycine sensible sans avoir à la tester. Cette souche est probablement du génotype Lnu(A). Ainsi, en présence d'une souche sensible à la clindamycine, résistante à l'érythromycine, il serait bon de tester la résistance à la lincomycine afin de ne pas passer à côté d'une souche de génotype lnu (A), ou plus simplement, de tester la lincomycine.

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration permettant de détruire ou de tuer (bactéricidie) 99,99 % des bactéries après 18 à 24 heures de contact avec l'antibiotique. La CMI et la CMB sont caractéristiques d'un antibiotique pour une souche donnée. L'analyse de la concentration minimale bactéricide et de la concentration minimale inhibitrice (CMB/CMI) permet de caractériser l'effet de l'antibiotique étudié sur une souche bactérienne donnée. Lorsque le rapport $CMB / CMI = 1$, l'antibiotique est dit « bactéricide absolu », s'il est proche de 1, l'antibiotique est dit « bactéricide », s'il est supérieur à 2, l'antibiotique est dit simplement « bactériostatique ». En dépit d'efforts de standardisation des méthodes de détermination des CMB, il subsiste des différences d'un auteur à l'autre qui sont liées à la variabilité des conditions expérimentales utilisées : divers facteurs peuvent jouer : Composition des milieux, taille de l'inoculum, souches de phénotypes différents, etc.

Ainsi, certains auteurs catégorisent les souches ayant un rapport égal à 4 comme bactéricide, entre 8 et 16 bactériostatiques et à 32 comme tolérante à l'antibiotique.

De ce fait, les bêta-lactamines, aminosides, fluoroquinolones, glycopeptides et synergistines, rifampicine et fosfomycine sont considérés comme des antibiotiques bactéricides. A l'inverse, les macrolides, l'acide fusidique (mais bactéricide à concentration élevée), les cyclines, sulfonamides et triméthoprime sont considérés comme bactériostatiques.

On peut se demander où est la place de lincomycine, macrolide ayant une structure et un mécanisme original par rapport aux autres membres de cette famille d'antibiotiques.

Pour 74.7% des souches testées, la concentration minimale bactéricide de la lincomycine était $\leq 2 \times$ CMI, ce qui donne un caractère plutôt bactéricide à l'antibiotique. Pourtant, il subsiste quelques souches dont la CMB se trouve être très supérieure à la CMI.

Les macrolides sont considérés comme des bactériostatiques. La clindamycine, dérivé de la lincomycine par une chlorosubstitution du groupe hydroxyle, est décrite comme une substance d'activité microbienne puissante. Selon la sensibilité du germe et la concentration de l'antibiotique, la clindamycine peut exercer un effet bactériostatique, mais bactéricide à forte dose.

La lincomycine est très proche de la clindamycine, on peut considérer la bactéricidie de la lincomycine comme dose dépendante.

Le rendu de la CMB au clinicien semble pertinente pour l'informer d'un éventuel échec possible s'il souhaite traiter son patient par de la lincomycine pour une infection qui nécessite un traitement bactéricide.

V. CONCLUSION

Pour conclure, cette étude a permis de proposer des diamètres critiques pour la fosfomycine 200 µg et la lincomycine 15 µg sur les staphylocoques, sachant que ni L'EUCAST, ni le CASFM ne proposaient des diamètres en 2016, le CASFM ayant retenu notre proposition pour la fosfomycine en 2017. Ainsi, le biologiste pourra répondre de manière simple à une interrogation du clinicien sur la sensibilité de la souche incriminée par rapport à l'antibiotique. Mais, l'antibiogramme en gélose n'est pas la seule option du biologiste, la technique en milieu liquide automatisée est aussi très répandue, malgré la recommandation de ne pas utiliser le milieu liquide pour tester la fosfomycine ; un contrôle de qualité ponctuel a cependant montré des résultats d'automates corrects ; une étude plus complète est nécessaire pour confirmer cette affirmation.

Pour la méthode des disques, le choix du fournisseur s'avère fondamental : notre étude montre que le disque de fosfomycine commercialisé par Biorad est manifestement trop chargé.

La mesure de la CMI à la fosfomycine en cas d'infection sévère est recommandée. La méthode de dilution en milieu solide, méthode de référence, est inapplicable en routine. On pourrait envisager l'utilisation des bandelettes.

Dans ce cas encore, le choix du fournisseur de bandelettes s'avère fondamental. Ainsi, dans notre étude, les bandelettes fournies par Liofilchem s'avèrent défectueuses. Pour l'autre bandelette testée et présente sur le marché, la bandelette E-TEST, la lecture est très difficile. La zone d'inhibition n'était pas nette, décroissante sur une longue distance, on ne sait pas à quel endroit la CMI doit être lue. Est-ce la raison pour laquelle la société bioMérieux a arrêté (ponctuellement ?) la commercialisation des bandelettes E-TEST fosfomycine.

Ces éléments aboutissent au fait qu'il est actuellement très difficile de mesurer une CMI à la fosfomycine, à moins de pratiquer la méthode fastidieuse de CMI par dilution en milieu solide. On pourrait cependant admettre qu'une CMI mesurée par une bandelette, avec une lecture tenant compte de toute culture visible, pourrait permettre de catégoriser la souche sensible si la CMI mesurée est inférieure ou égale à 32 mg/L.

L'utilisation des disques pour mesurer la sensibilité des staphylocoques à la lincomycine nous incite à recommander une lecture des zones d'inhibition après 48 H d'incubation, certaines souches apparaissant faussement sensibles en 24 H.

Les disques commercialisés par Biorad et Liofilchem sont plus chargés que les autres. Avec ces disques, on observe que des souches résistantes à la lincomycine ont des diamètres jusqu'à 30 mm, alors que les souches résistantes ont des diamètres inférieurs à 26 mm avec les autres disques. C'est pourquoi, un diamètre critique de 31 mm est proposé.

La mesure des CMI par la méthode de dilution, non recommandée pour la lincomycine, donne des résultats inférieurs à ceux de la méthode de référence.

Enfin, le test lincomycine s'avère fondamental pour le staphylocoque. En effet, une souche qui possède le gène *lnu(A)* apparaît sensible à la clindamycine sur l'antibiogramme actuel, puisque la lincomycine n'est pas testée, faute de diamètre critique. Le communiqué du CASFM 2017 recommande de catégoriser cette souche sensible à la lincomycine en absence d'induction, ou sensible avec une remarque (de rares échecs cliniques ont été rapportés par sélection de mutants constitutifs résistants) en présence d'induction. Le test de lincomycine nous permet de souligner une discordance très majeure : souche résistante à la lincomycine rendue au clinicien sensible à la lincomycine. Une modification du communiqué semble nécessaire, il faudrait mettre en place le test de la lincomycine en routine. Il semble plus logique de tester uniquement la lincomycine, une sensibilité à la lincomycine permet de conclure à une sensibilité à la clindamycine, mais l'inverse n'est pas vrai.

La CMB est un outil supplémentaire au clinicien pour connaître les risques d'échecs thérapeutiques dans l'éventualité d'une CMB très éloignée de la CMI.

Elle n'est à priori pas utilisable pour la fosfomycine, le milieu liquide n'étant pas recommandé.

Avec la méthodologie proposée sur les galeries commercialisées (galerie lincomycine non commercialisée à l'heure actuelle), elle est devenue simple dans sa mise en œuvre (35), cette technique devrait être de plus en plus utilisée dans les laboratoires de bactériologie, et demandée par les prescripteurs. Malgré sa réputation d'antibiotique bactériostatique, la lincomycine s'est avérée bactéricide sur certaines souches dans notre étude.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Courvalin, P. (1985). *L'antibiogramme*, MPC-VIDEOM.
- 2 - Hendlin, D., Stapley, E. O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A. K., Wolf, F. J., Miller, T. W., Chalet, L., Kahan, F. M. & other authors. (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomycetes. *Science* **166**, 122–123.
- 3 - Woodyer, R. D., Shao, Z., Thomas, P. M., Kelleher, N. L., Blodgett, J. A., Metcalf, W. W., van der Donk, W. A. & Zhao, H. (2006). Heterologous production of fosfomycin and identification of the minimal biosynthetic gene cluster. *Chem Biol* **13**, 1171–1182.
- 4 - Sastry, S. & Doi, Y. (2016). Fosfomycin: Resurgence of an old companion. *J Infect Chemother* **22**, 273–280.
- 5 - Formation de la paroi bactérienne - IBS - Institut de Biologie Structurale - Grenoble / France. (n.d.). .
- 6 - El Zoeiby, A., Sanschagrín, F. & Levesque, R. C. (2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* **47**, 1–12.
- 7- Vömel W. (1982). Bakteriologische und pharmakokinetische Grundlagen der klinischen Anwendung von Fosfomycin. In: Linzenmeier G (ed) Aktuelle Aspekte zur bakteriologischen Resistenzbestimmung und Resistenzsituation. *Vieweg Wiesb Ger.*
- 8 - Zhanel, G. G., Walkty, A. J. & Karlowsky, J. A. (2016). Fosfomycin: A First-Line Oral Therapy for Acute Uncomplicated Cystitis. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2016**.
- 9 - Courvalin Patrice et Lelclerq Roland. (1985). *Antibiogramme*, ESKA 2012.
- 10 - Salhi, A. (1978). Activité bactériostatique in vitro de la Fosfomycine: Etude préliminaire multicentre avant tout usage thérapeutique en France. *Médecine Mal Infect* **8**, 677–684.

- 11 - Thalhammer, F. (2001).** Die Infektion beim diabetischen Fußs-Syndrom. In *Infekt Aktuelle Aspekte*, pp. 249–263. Springer.
- 12- Badelon, O., Bingen, E., Sauzeau, C., Lambert-Zechovsky, N., de Ribier, A. & Bensahel, H. (1988).** [Choice of first-line antibiotic therapy in the treatment of bone and joint infections in children]. *Pathol Biol (Paris)* **36**, 746–749.
- 13 - Hepping, N. & Simon, A. (2009).** Fosfomycin in paediatric cancer patients: a feasible alternative to glycopeptides? *Int J Antimicrob Agents* **33**, 389.
- 14 - M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement - M100S25_sample.pdf. (n.d.). .**
- 15 - EUCAST: Clinical breakpoints V6. (2016, January 20). .**
- 16 - Mason, D. J., Dietz, A. & DeBoer, C. (1963).** Lincomycin, a new antibiotic. I. Discovery and biological properties. *Antimicrob Agents Chemother* **1962**, 554–559.
- 17 - Lincomycin & Clindamycin. (n.d.). PharmaFactz.**
- 18 - Chang, F. N., Sih, C. J. & Weisblum, B. (1966).** Lincomycin, an inhibitor of aminoacyl sRNA binding to ribosomes. *Proc Natl Acad Sci* **55**, 431–438.
- 19 - Tenson, T., Lovmar, M. & Ehrenberg, M. ans. (2003).** The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* **330**, 1005–1014.
- 20 - Leclercq, R. (2002).** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* **34**, 482–492.
- 21 - Kehrenberg, C., Ojo, K. K. & Schwarz, S. (2004).** Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother* **54**, 936–939.

- 22 - Pal, N., Sharma, B., Sharma, R., Vyas, L. & others. (2010).** Detection of inducible clindamycin resistance among Staphylococcal isolates from different clinical specimens in western India. *J Postgrad Med* **56**, 182.
- 23 - Donay, J.-L., Mathieu, D., Fernandes, P., Pregermain, C., Bruel, P., Wargnier, A., Casin, I., Weill, F. X., Lagrange, P. H. & Herrmann, J. L. (2004).** Evaluation of the automated Phoenix system for potential routine use in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* **42**, 1542–1546.
- 24 - Tang, P., Low, D. E., Atkinson, S., Pike, K., Ashi-Sulaiman, A., Simor, A., Richardson, S. & Willey, B. M. (2003).** Investigation of Staphylococcus aureus isolates identified as erythromycin intermediate by the Vitek-1 system: comparison with results obtained with the Vitek-2 and Phoenix systems. *J Clin Microbiol* **41**, 4823–4825.
- 25 - Sirot, J., Courvalin, P. & Soussy, C.-J. (1996).** Definition and determination of in vitro antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria. *Clin Microbiol Infect* **2**, S5–S10.
- 26 - Courvalin, P., Drugeon, H., Flandrois, J. & Goldstein, F. (1996).** *Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques.*, Maloine.
- 27 - Woolfrey, B. F., Lally, R. T. & Tait, K. R. (1986).** Influence of technical factor variations on serum inhibition and bactericidal titers. *J Clin Microbiol* **23**, 997–1000.
- 28 - Woolfrey, B. F., Lally, R. T. & Ederer, M. N. (1985).** Evaluation of oxacillin tolerance in Staphylococcus aureus by a novel method. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 381–388.

- 29 - Pelletier, L. L. & Baker, C. B. (1988).** Oxacillin, cephalothin, and vancomycin tube macrodilution MBC result reproducibility and equivalence to MIC results for methicillin-susceptible and reputedly tolerant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 374–377.
- 30 - EUCAST SOP 1.0 Setting breakpoints -**
EUCAST_SOP_9.0_Disk_diffusion_breakpoints_and_QC_ranges.pdf. (n.d.). .
- 31 - Matuschek, E., Brown, D. F. J. & Kahlmeter, G. (2014).** Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* **20**, O255–O266.
- 32 - Kaase, M., Szabados, F., Anders, A. & Gatermann, S. G. (2014).** Fosfomycin susceptibility in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from Germany. *J Clin Microbiol* **52**, 1893–1897.
- 33 - Grimm, H. (1979).** In vitro investigations with fosfomycin on Mueller-Hinton agar with and without glucose-6-phosphate. *Infection* **7**, 256–259.
- 34 - Gunnison, J. B., Fraher, M. A. & Jawetz, E. (1964).** Persistence of *Staphylococcus aureus* in penicillin in vitro. *Microbiology* **35**, 335–349.
- 35 - Brieu N. , J. Gallou, A. Homor, C. Pachetti, M. Giaime, C. Ferrali, H. Chardon. (2016).** Mesure de la Concentration Minima Bactéricide (CMB) à chaque mesure de CMI en milieu liquide à moindre coût. RICAI. P 021

VII. ANNEXES

Annexe 1 Souchier pour l'étude

Date de prélèvement	Germe	Numéro de souchier	FF200	L15	N° perso
Non connue	SEPI	20120024	15	27	1
02/01/2012	SHAE	20120026	13	38	2
11/01/2012	SEPI	20120097	14	40	3
16/01/2012	SAUR	20120129	22	32	4
26/01/2012	SAUR	20120190	14	34	7
02/02/2012	SEPI	20120239	21	6	8
03/02/2012	SAUR	20120237	16	29	9
14/02/2012	SAUR	20120292	23	8	10
Non connue	SWAR	20120357	15	30	11
16/03/2012	SAUR	20120445	6	6	13
19/03/2012	SEPI	20120476	23	22	14
27/03/2012	SAUR	20120513	15	30	16
31/03/2012	SAUR	20120542	19	38	18
13/04/2012	SEPI	20120610	6	6	21
13/04/2012	SEPI	20120611	11	11	22
Non connue	SAUR	20120725	6	11	23
11/05/2012	SEPI	20120770	24	6	25
15/05/2012	SEPI	20120801	6	6	26
19/05/2012	SAUR	20120820	22	36	27
09/06/2012	SHAE	20120958	14	34	29

Date de prélèvement	Germe	Numéro de soucier	FF200	L15	N° perso
19/06/2012	SAUR	20121015	15	10	30
19/07/2012	SAUR	20121233	13	32	31
23/08/2012	SHAE	20121459	16	37	34
06/09/2012	SAUR	20121584	20	21	35
11/10/2012	SAUR	20121791	24	21	36
14/10/2012	SAUR	20121798	29	17	37
29/10/2012	SAUR	20121896	26	20	38
Non connue	SAUR	20122091	18	24	39
29/01/2013	SAUR	20130175	30	19	40
Non connue	SAUR	20130419	8	28	41
09/03/2013	SAUR	20130456	22	21	42
11/03/2013	SAUR	20130469	11	6	43
22/04/2013	SSAP	20130729	8	40	44
Non connue	SEPI	20131077	16	31	47
18/06/2013	SEPI	20131125	21	21	48
29/07/2013	SEPI	20131374	28	15	51
11/09/2013	SAUR	20131657	30	21	52
20/01/2014	SAUR	20140141	21	20	54
28/01/2014	SAUR	20140187	19	15	55
05/02/2014	SEPI	20140264	24	17	56
17/02/2014	SAUR	20140352	13	33	57
20/02/2014	SAUR	20140374	27	17	58

Date de prélèvement	Germe	Numéro de soucier	FF200	L15	N° perso
17/03/2014	SAUR	20140546	17	11	59
30/05/2014	SEPI	20141143	21	36	60
08/06/2014	SEPI	20141205	30	17	61
08/06/2014	SEPI	20141204	6	20	62
08/06/2014	SEPI	20141206	40	20	63
Non connue	SHOM	20141234	17	24	64
08/07/2014	SAUR	20141433	25	16	66
08/07/2014	SAUR	20141434	25	16	67
15/07/2014	SLUG	20141497	19	37	68
Non connue	SCAP	20150666	14	32	70
Non connue	SHOM	20150699	6	33	71
08/06/2015	SAUR	20151231	20	18	72
10/06/2015	SAUR	20151245	29	18	73
Non connue	SEPI	20151771	18	27	75
07/10/2015	SEPI	20152227	40	18	76
05/12/2015	SEPI	20152764	25	20	77
11/12/2015	SAUR	20152817	32	21	78
02/02/2016	SAUR	20160319	12	40	79
Non connue	SEPI	20160601	34	29	81
09/04/2016	SHOM	20161021	19	35	82
29/04/2016	SEPI	20161200	37	16	84
10/05/2016	SEPI	20161295	33	17	85

Date de prélèvement	Germe	Numéro de soucier	FF200	L15	N° perso
10/05/2016	SEPI	20161289	28	20	86
23/05/2016	SLUG	20161414	17	20	87
13/06/2016	SAUR	20161588	33	18	88
16/06/2016	SSIM	20161613	40	16	89
Non connue	SEPI	20161674	32	22	90
27/05/2012	SAUR	20120877	21	22	A
13/03/2013	SAUR	20130478	26	40	B
13/05/2013	SAUR	20130914	6	10	D
16/01/2014	SEPI	20140135	19	35	E
19/03/2014	SAUR	20140562	20	28	F
31/03/2014	SAUR	20140647	21	22	G
18/10/2014	SEPI	20142101	20	8	I
14/11/2014	SAUR	20142336	6	40	J
14/12/2014	SAUR	20142548	15	6	K
Non connue	SEPI	20150527	16	24	L
Non connue	SAUR	20152178	38	37	O
Non connue	SEPI	20152730	10	31	P
16/02/2016	SAUR	20160484	17	6	Q
Non connue	SAUR	20160966	24	22	R
Non connue	SAUR	20161011	25	14	S
Non connue	SAUR	20161216	34	27	T
Non connue	SCAP	20161612	18	28	U

Date de prélèvement	Germe	Numéro de soucier	FF200	L15	N° perso
31/03/2015	SAUR	20150714	12	6	V
Non connue	SEPI	20160522	34	28	X
07/08/2013	SEPI	20131447	36	38	W
01/04/2012	SAUR	20120540	36	33	Y
10/04/2012	SAUR	20120577	40	36	Z
13/07/2013	SEPI	20131269	29	6	XX
29/07/2013	SEPI	20131438	6	26	XZ
	S.aureus 25923	CQ lincomycine			
	E. faecalis 29212				
	S. aureus 29213	CQ fosfomycine			
	P. aeruginosa 27853				
	E. coli 25922				

Annexe 2 Caractéristiques des poudres

Poudre	Fosfomycine disodique	Lincomycine hydrochloride	DG6P	MH carrés
N° de lot	125M4168V	112K0566V	SLBQ7157 V	28092016 (Biorad 64884)
Date de péremption				27/10/2016

Annexe 3 Caractéristiques des disques

Disques	Fosfomycine 200		Lincomycine 15	
BD	6095989	30/04/2017	5014508	31/01/2018
Biorad	6D5058	15/04/2018	6B5173	15/02/2018
Liofilhelm	42116032	21/04/2019	70116073	01/07/2019
I2A	160411A	mai-18	150713C	janv-18
Oxoid	18799464	30/06/2018	1832318	31/03/2019

Annexe 4 Caractéristiques des bandelettes CMI

CMI	Fosfomycine		Lincomycine	
Liofilhelm	63016068	30/06/2019	/	/
Biomérieux E tests	1004851860	14/04/2021	/	/

Annexe 5 Résultats pour la fosfomycine : CMI et diamètre

Souches	FF 24h CMI solide	FF liquide 24h	FF liquide 48h	CMI FF E test	CMI FF LF	FF Aix	FF LF	FF Oxoid	FF 12A	FF BD	FF biorad
saur 25923	8	1	1	3	4 ou 24		29	27	27	28	29
<i>e faecalis</i>	16	128 et 64	128	64	>256		27	24	28	23	28
saur 29213	1	1	1 et 2	2	6		34	31	34	32	37
pyo	4	1	4	6	12		38	32	38	32	37
<i>E.coli</i>	1	8	8	2	4		29	29	30	28	31
1	8	1	2	32	48	15	42	36	32	30	42
2	64	2	64	192	>256	13	24	17	24	18	29
3	1	1	2	3	16	14	36	36	40	36	40
4	0,5	0,25	0,25	0,19	0,75	22	36	34	36	36	50
7	2	0,25	2	4	4	14	38	38	40	38	40
8	1	4	2	0,5	0,75	21	34	42	36	38	44
9	2	8	8	4	16	16	32	34	33	36	38
10	4	8	16	4	12	23	34	33	33	30	38
11	64	16	64	>1024	>256	15	25	18	26	18	26
13	16	>256	>256	16	>256	6	20	24	23	23	28
14	1	1	1	1	1	23	50	46	48	48	50
16	2	16	32	2	12	15	28	30	32	32	32
18	2	2	8	2	6	19	35	32	36	33	36
21	4	1	1	16	0,75/24	6	>40	>40	>40	>40	>40
22	1	0,25	1	0,5	1	11	>40	>40	>40	>40	>40
23	16	64	64	32	>256	6	23	23	28	28	28
25	1	1	1	0,75	1	24	40	44	38	38	46
26	64	>256	>256	>1024	>256	6	6	6	6	6	6
27	4	2	4	4	12	22	28	31	30	30	38
29	32	32	32	96	>256	14	30	28	28	18	30
30	4	32	32	3	16	15	33	32	31	30	36

Souches	FF 24h CMI solide	FF liquide 24h	FF liquide 48h	CMI FFE test	CMI FF LF	FF Aix	FF LF	FF Oxoïd	FF I2A	FF BD	FF biorad
34	64	32	32	128	>256	16	32	24	28	20	30
35	2	1	2	1	8	20	46	>40	42	42	44
36	4	1	64	3	8	24	31	31	34	30	35
37	2	0,25	2	2	4	29	42	40	41	40	45
38	4	0,5	1	2	6	26	44	>40	46	46	44
39	2	2	2	3	12	18	40	42	38	40	40
40	2	2	4	1,5	6	30	48	46	44	44	46
41	128	>256	>256	>1024	>256	8	6	6	6	6	6
42	1	0,5	8	3	6	22	44	46	44	42	41
43	64	128	>256	>1024	>256	11	17	22	19	22	21
44	>256	0,25	0,25	>1024	>256	8	6	6	6	6	6
47	4	2	2	24	64	16	>40	>40	>40	>40	48
48	4	1	1	12	24	21	50	50	40	>40	48
51	4	2	2	32	64	28	36	44	36	36	50
52	4	8	8	4	16	30	40	36	38	38	39
54	4	16	16	6	24	21	31	31	36	28	33
55	4	32	32	4	24	19	30	30	30	29	34
56	4	1	2	24	64	24	44	40	46	40	47
57	2	2	16	3	16	13	36	33	37	36	36
58	4	8	16	4	16	27	32	30	32	28	34
59	16	64	64	16	>256	17	29	27	28	28	30
60	16	2	2	64	>256	21	44	40	44	36	43
61	1	0,25	0,25	2	4	30	>40	>40	54	66	54
62	128	64	64	>1024	>256	6	18	6	25	6	21
63	1	0,25	0,25	1	3	40	38	37	38	37	40
64	64	8	16	256	>256	17	17	10	19	9	19
66	4	2	32	4	8	25	30	30	30	29	35
67	4	2	2	4	6	25	30	31	30	30	34

Souches	FF 24h CMI solide	FF liquide 24h	FF liquide 48h	CMI FF E test	CMI FF LF	FF Aix	FF LF	FF Oxoid	FF 12A	FF BD	FF biorad
68	64	NA	NA	>1024	>256	19	14	6	10	6	15
70	32	NA	NA	>1024	>256						
71	>256	>256	>256	>1024	>256	6	6	6	6	6	6
72	1	0,25	1	6	8	20	26	28	29	29	30
73	1	1	2	6	12	29	25	26	28	27	27
75	32	NA	0,25	>1024	>256	18	20	12	15	14	22
76	0,5	0,25	0,25	0,75	2	40	40	40	40	40	40
77	4	2	2	24	NON FAIT	25	32	27	28	25	34
78	1	0,25	2	0,75	FAIT	32	33	31	32	31	35
79	1	1	1	0,38/6	NON FAIT	12	40	40	38	37	40
81	4	2	2	16	NON FAIT	34	29	25	28	24	34
82	64	32	64	>1024	NON FAIT	19	12	6	11	6	17
84	8	1	1	16	NON FAIT	37	32	30	31	29	33
85	8	1	2	48	NON FAIT	33	28	25	28	26	31
86	8	2	8	96	>1024	28	27	23	26	24	29
87	16	NA	NA	512	>1024	17	22	6	21	10	23
88	2	1	8	1,5	4	33	28	29	30	30	32
89	1	0,5	0,5	0,25	0,38	40	>40	>40	>40	>40	>40
90	8	2	2	24	32	32	28	25	27	23	32
A	4	8	8	4	16	21	33	28	24	28	24
B	2	2	2	2	4	26	30	30	29	31	34
D	16	64	64	16	>256	6	18	21	22	22	27
E	4	64	64	24	>256	19	25	25	26	20	29

Souches	FF 24h CMI solide	FF liquide 24h	FF liquide 48h	CMI FFE test	CMI FF LF	FF Aix	FF LF	FF Oxoid	FF I2A	FF BD	FF biorad
F	2	2	8	3	4 ou 24	20	23	25	25	27	29
G	2	0,5	1	2	8	21	30	29	30	30	33
I	2	1	1	2	4	20	32	30	34	32	36
J	4	8	8	8	24	6	24	29	24	25	29
K	16	8	16	16	>256	15	21	22	21	21	28
L	4	2	2	64	>256	16	27	22	24	22	31
O	1	0,25	1	1	2	38	28	32	32	30	35
P	2	0,5	0,5	8	16	10	33	30	30	28	32
Q	16	NA	NA	16	>256	17	23	27	23	26	28
R	1	8	2	2	6	24	34	34	33	32	35
S	4	NA	NA	6	12	25	27	27	25	27	31
T	0,5	1	1	2	32	34	29	29	29	25	31
U	64	64	64	>1024	>256	18	19	10	14	12	19
V	8	32	32	12	>256	12	23	25	23	25	27
X	2	NA	NA	8	24	34	28	24	28	25	34
W	0,25	0,25	0,25	0,75	2	36	32	32	40	32	40
Y	0,5	1	2	0,75	1,5	36	36	32	40	40	38
Z	0,5	0,25	1	0,25	1	40	32	31	30	29	35
XX	NON FAIT	0,25	0,25	0,094	NON FAIT	29	32	NF	32	32	35
XZ	NON FAIT	1	2	2	NON FAIT	6	31	28	30	29	33

Annexe 6 Résultats pour la lincomycine : CMI, diamètres et CMB

Souches	Linco Oxoid 48h	Linco Iioflchelm 48h	Linco Biorad 48h	Linco BD 48h	Linco I2A 48h	CMI linco solide 24h	CMI linco liquide 24h	linco liquide 48h	CMB linco
1	27	34	29	25	26	2	16	16	16
2	44	50	48	46	46	0,5	1	1	1
3	50	52	52	48	48	0,5	1	1	1
4	40	40	42	38	38	1	1	1	2
7	40	42	42	40	38	1	2	2	4
8	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
9	38	46	44	40	40	0,5	1	1	2
10	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
11	48	46	48	42	44	0,5	1	2	2
13	6	6	6	6	6	>256	>64	32	>64
14	25	31	25	25	20	2	16	16	16
16	36	40	40	pas de disque	35	0,5	1	2	2
18	36	38	36	36	33	1	2	2	4
21	>40	50	50	44	43	0,5	1	4	4
22	50	46	48	44	40	0,5	1	2	2
23	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
25	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
26	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
27	42	48	46	46	41	0,5	1	1	2
29	43	48	48	44	41	0,5	0,5	1	1
30	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
31	38	40	40	36	38	1	1	2	2

Souches	Linco Oxoid 48h	Linco liofilchelm 48h	Linco Biorad 48h	Linco BD 48h	Linco I2A 48h	CMI linco solide 24h	CMI linco liquide 24h	linco liquide 48h	CMB linco
34	43	54	50	43	42	0,5	0,5	1	8
35	23	28	27	24	24	4	16	16	16
36	24	26	26	24	22	>256	>64	64	>64
37	19	24	22	20	16	8	32	64	64
38	16	23	22	17	12	16	64	64	>64
39	34	40	39	34	33	1	4	4	16
40	15	23	21	16	13	16	16	64	32
41	6	6	6	6	6	64	>64	64	>64
42	21	28	24	22	17	8	16	16	32
43	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
44	43	47	46	44	44	0,5	erreur	erreur	erreur
47	44	50	48	44	45	0,5	1	4	4
48	21	30	26	21	20	4	32	32	>64
51	9	19	14	11	9	16	>64	64	>64
52	19	25	24	20	17	4	8	16	64
54	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
55	6	6	6	6	6	256	>64	64	>64
56	14	25	23	18	16	16	>64	64	>64
57	37	44	42	34	35	1	1	1	4
58	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
59	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
60	40	48	45	40	42	0,5	1	1	4
61	19	22	25	18	13	8	16	16	64
62	39	40	40	40	40	4	16	16	64
63	22	34	30	24	22	8	16	16	64
64	40	40	40	40	40	0,25	1	2	4

Souches	Linco Oxoid 48h	Linco biofilhelm 48h	Linco Biorad 48h	Linco BD 48h	Linco 12A 48h	CMII linco solide 24h	CMII linco liquide 24h	linco liquide 48h	CMIB linco
66	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
67	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
68	40	40	40	40	40	0,25	erreur	erreur	erreur
71	35	40	40	40	40	0,5	1	2	4
72	16	24	23	20	17	8	32	32	64
73	16	22	21	18	17	8	32	64	64
75	35	40	40	40	40	0,5	erreur	erreur	0,5
76	14	24	19	18	17	16	>64	64	>64
77	26	30	26	24	24	2	8	16	16
78	23	23	26	22	22	64	>64	64	>64
79	26	30	30	27	27	1	2	2	16
81	36	40	40	38	40	0,5	0,5	1	2
82	40	40	40	40	40	0,25	0,5	1	1
84	35	40	38	35	40	4	16	16	16
85	21	30	27	24	27	2	16	16	16
86	20	30	27	21	20	2	16	16	16
87	40	40	40	40	40	0,25	erreur	erreur	erreur
88	20	28	25	21	21	4	8	16	16
89	28	32	32	25	24	4	2	4	16
90	23	29	28	23	21	2	8	8	16
A	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
B	35	36	38	35	34	0,5	0,5	0,5	1
D	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
E	40	40	40	40	40	0,25	erreur	erreur	erreur
F	32	32	32	31	30	0,5	0,12	0,12	0,5
G	23	28	26	23	21	4	1	2	2

Souches	Linco Oxoid 48h	Linco liofilchelm 48h	Linco Biorad 48h	Linco BD 48h	Linco I2A 48h	CMI linco solide 24h	CMI linco liquide 24h	linco liquide 48h	CMB linco
I	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
J	34	39	36	34	34	0,5	1	2	4
K	6	6	6	6	6	>256	erreur	erreur	erreur
L	28	32	28	27	25	1	8	16	16
O	31	34	34	32	32	0,5	1	1	2
P	40	40	40	40	40	0,5	1	1	2
Q	6	6	6	6	6	>256	erreur	erreur	erreur
R	35	36	35	33	32	0,5	1	2	8
S	6	6	6	6	6	>256	erreur	0,5	erreur
T	35	>40	36	35	34	0,5	0,5	1	1
U	40	>40	45	43	40	0,5	1	2	8
V	6	6	6	6	6	>256	>64	64	>64
W	34	40	40	34	34	0,5	erreur	erreur	0,5
X	40	40	38	34	36	0,5	erreur	erreur	erreur
XX	6	6	6	6	6		>64	64	>64
XXZ	24	30	28	24	23		16	16	16
Y	32	36	32	31	32	1	0,5	0,5	4
Z	35	32	35	32	33	0,5	2	2	2

Annexe 7 Diamètres lus à 24h et 48h pour la lincomycine

Souches	Oxoid 24h	BD 24h	Biorad 24h	iofilchelm 24h	I2A 24h	Oxoid 48h	iofilchelm 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h
1	32	36	38	46	36	27	34	29	25	26
2	44	46	48	50	46	44	50	48	46	46
3	50	48	52	52	48	50	52	52	48	48
4	40	38	42	40	38	40	40	42	38	38
7	40	40	42	42	38	40	42	42	40	38
8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
9	38	40	44	46	40	38	46	44	40	40
10	32	30	33	33	28	6	6	6	6	6
11	48	42	48	46	44	48	46	48	42	44
13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
14	32	39	36	36	27	25	31	25	25	20
16	36	pas de disque	40	40	35	36	40	40	pas de disque	35
18	36	36	36	38	33	36	38	36	36	33
21	>40	44	50	50	43	>40	50	50	44	43
22	50	44	48	46	40	50	46	48	44	40
23	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
25	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Souches	Oxoid 24h	BD 24h	Biorad 24h	liofilchelm 24h	I2A 24h	Oxoid 48h	liofilchelm 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h
26	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
27	42	46	46	48	41	42	48	46	46	41
29	43	44	48	48	41	43	48	48	44	41
30	31	30	30	32	26	6	6	6	6	6
31	38	36	40	40	38	38	40	40	36	38
34	43	43	50	54	42	43	54	50	43	42
35	24	27	29	31	26	23	28	27	24	24
36	28	28	30	31	25	24	26	26	24	22
37	23	22	25	26	19	19	24	22	20	16
38	25	20	23	25	16	16	23	22	17	12
39	34	34	39	40	33	34	40	39	34	33
40	22	18	23	24	16	15	23	21	16	13
41	24	25	26	27	25	6	6	6	6	6
42	24	25	28	30	22	21	28	24	22	17
43	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
44	43	44	46	47	44	43	47	46	44	44
47	44	44	48	50	45	44	50	48	44	45
48	34	32	40	40	33	21	30	26	21	20
51	15	18	23	26	17	9	19	14	11	9

Souches	Oxid 24h	BD 24h	Biorad 24h	iofilchelm 24h	I2A 24h	Oxid 48h	iofilchelm 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h
52	23	23	28	28	21	19	25	24	20	17
54	30	27	29	31	28	6	6	6	6	6
55	27	36	30	30	25	6	6	6	6	6
56	14	18	23	25	16	14	25	23	18	16
57	37	34	42	44	35	37	44	42	34	35
58	24	24	27	28	27	6	6	6	6	6
59	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
60	40	40	45	48	42	40	48	45	40	42
61	26	25	30	30	21	19	22	25	18	13
62	39	40	40	40	40	39	40	40	40	40
63	27	28	32	32	29	22	34	30	24	22
64	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
66	27	27	30	30	28	6	6	6	6	6
67	28	28	31	33	28	6	6	6	6	6
68	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
70										
71	35	40	40	40	40	35	40	40	40	40
72	18	20	22	25	18	16	24	23	20	17
73	17	19	20	24	21	16	22	21	18	17

Souches	Oxoid 24h	BD 24h	Biorad 24h	liofilchelm 24h	I2A 24h	Oxoid 48h	liofilchelm 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h
75	35	40	40	40	40	35	40	40	40	40
76	14	18	19	24	17	14	24	19	18	17
77	26	27	31	27	26	26	30	26	24	24
78	20	24	24	26	23	23	23	26	22	22
79	26	26	29	30	28	26	30	30	27	27
81	36	38	40	40	40	36	40	40	38	40
82	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
84	35	35	38	40	40	35	40	38	35	40
85	28	29	32	33	28	21	30	27	24	27
86	25	27	32	35	28	20	30	27	21	20
87	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
88	21	21	26	29	23	20	28	25	21	21
89	26	25	28	30	25	28	32	32	25	24
90	29	29	34	35	29	23	29	28	23	21
A	30	28	33	33	26	6	6	6	6	6
B	35	35	38	36	34	35	36	38	35	34
D	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
E	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
F	34	32	35	35	36	32	32	32	31	30

Souches	Oxid 24h	BD 24h	Biorad 24h	iofilchelm 24h	I2A 24h	Oxid 48h	iofilchelm 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h
G	24	24	27	28	23	23	28	26	23	21
I	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
J	34	34	36	39	34	34	39	36	34	34
K	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
L	32	30	32	35	30	28	32	28	27	25
O	32	32	32	38	34	31	34	34	32	32
P	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Q	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
R	35	33	35	36	32	35	36	35	33	32
S	27	25	28	28	27	6	6	6	6	6
T	35	35	36	>40	34	35	>40	36	35	34
U	40	43	45	>40	40	40	>40	45	43	40
V	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
W	40	34	38	40	36	34	40	40	34	34
X	34	34	40	40	34	40	40	38	34	36
Y	30	30	34	34	33	32	36	32	31	32
Z	32	33	35	35	35	35	32	35	32	33
XX	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
XZ	28	30	30	32	28	24	30	28	24	23

Annexe 8 : Résultats lincomycine avec résultats précédents à Aix

Souches	Induction	E15 Aix	L15 Aix	DA 2 Aix	PT15 Aix	SYN1 5 Aix	Oxoid 48h	LF 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h	CMI solide 24h	CMI liquide 24h	CMB
1		34	27		23		27	34	29	25	26	2	16	16
2		6	38		34		44	50	48	46	46	0,5	1	1
3		35	40		35		50	52	52	48	48	0,5	1	1
4		28	32		30		40	40	42	38	38	1	1	2
7		31	34		30		40	42	42	40	38	1	2	4
8		6	6		23		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
9		26	29		31		38	46	44	40	40	0,5	1	2
10		6	8		30		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
11		6	30		35		48	46	48	42	44	0,5	1	2
13		6	6		33		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
14		32	22		23		25	31	25	25	20	2	16	16
16		28	30		26		36	40	40	pas de disque	35	0,5	1	2
18		35	38		33		36	38	36	36	33	1	2	4
21		6	6		46		>40	50	50	44	43	0,5	1	4

Source	Induction	E15 Aix	L15 Aix	DA 2 Aix	PT15 Aix	SYN1 5 Aix	Oxoid 48h	LF 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h	CMI solide 24h	CMI liquide 24h	CMB
22	OUI	7	11		42		50	46	48	44	40	0,5	1	2
23		6	11		32		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
25		6	6		19		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
26		6	6		19		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
27	OUI	17	36	30	36		42	48	46	46	41	0,5	1	2
29		6	34		33		43	48	48	44	41	0,5	0,5	1
30		6	10		33		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
31		31	32		32		38	40	40	36	38	1	1	2
34		23	37		33		43	54	50	43	42	0,5	0,5	8
35		34	21		31		23	28	27	24	24	4	16	16
36	NON	6	21		35		24	26	26	24	22	>256	>64	>64
37		31	17		27		19	24	22	20	16	8	32	64
38		31	20		33		16	23	22	17	12	16	64	>64
39		31	24		31		34	40	39	34	33	1	4	16
40		32	19		33		15	23	21	16	13	16	16	32
41		6	28		37		6	6	6	6	6	64	>64	>64
42	NON	11	21		32		21	28	24	22	17	8	16	32
43		6	6		35		6	6	6	6	6	>256	>64	>64

Souches	Induction	E15 Aix	L15 Aix	DA 2 Aix	PT15 Aix	SYN1 5 Aix	Oxoid 48h	LF 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h	CMI solide 24h	CMI liquide 24h	CMB
44		25	40		43		43	47	46	44	44	0,5	erreur	erreur
47	NON	6	32		38		44	50	48	44	45	0,5	1	4
48	NON	11	21		32		21	30	26	21	20	4	32	>64
51	NON	13	15		29		9	19	14	11	9	16	>64	>64
52		31	21		36		19	25	24	20	17	4	8	64
54		6	20		32		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
55		10	15		35		6	6	6	6	6	256	>64	>64
56	NON	14	17		26		14	25	23	18	16	16	>64	>64
57		29	33		34		37	44	42	34	35	1	1	4
58		6	17		29		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
59		7	11		32		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
60		31	36		37		40	48	45	40	42	0,5	1	4
61	OUI	6	17		35		19	22	25	18	13	8	16	64
62	OUI	10	20		34		39	40	40	40	40	4	16	64
63	NON	6	20		40		22	34	30	24	22	8	16	64
64	NON	9	24		33		40	40	40	40	40	0,25	1	4
66		6	16		35		6	6	6	6	6	>256	>64	>64

Source	Induction	E15 Aix	L15 Aix	DA 2 Aix	PT15 Aix	SYN1 5 Aix	Oxoid 48h	LF 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h	CMI solide 24h	CMI liquide 24h	CMB
67		6	16		34		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
68		34	37		38		40	40	40	40	40	0,25	erreur	erreur
														r
70		35	32	32	36	28								
71		7	33	38	34	30	35	40	40	40	40	0,5	1	4
72		25	18	20	18	19	16	24	23	20	17	8	32	64
73		28	18	23	23	18	16	22	21	18	17	8	32	64
75	OUI	6	27	32	34	32	35	40	40	40	40	0,5	erreur	0,5
76	NON	13	18	32	37	30	14	24	19	18	17	16	>64	>64
77		30	20	23	20	21	26	30	26	24	24	2	8	16
78		6	21	20	30	26	23	23	26	22	22	64	>64	>64
79	OUI	10	40	40		31	26	30	30	27	27	1	2	16
81		11	29	31	33	29	36	40	40	38	40	0,5	0,5	2
82		32	34	32	34	26	40	40	40	40	40	0,25	0,5	1
84		11	16	17	28	21	35	40	38	35	40	4	16	16
85		6	17	20	20	21	21	30	27	24	27	2	16	16
86		11	20	17	20	22	20	30	27	21	20	2	16	16

Souches	Induction	E15 Aix	L15 Aix	DA 2 Aix	PT15 Aix	SYN1 5 Aix	Oxoid 48h	LF 48h	Biorad 48h	BD 48h	I2A 48h	CMI solide 24h	CMI liquide 24h	CMB
87		30	20	19	25	21	40	40	40	40	40	0,25	erreur	erreur
88		30	18	20	27	20	20	28	25	21	21	4	8	16
89	NON	20	16	23	28	22	28	32	32	25	24	4	2	16
90		16	22	24	20	18	23	29	28	23	21	2	8	16
A	NON	7	22		34		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
B		37	40		35		35	36	38	35	34	0,5	0,5	1
D		6	10		33		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
E	OUI	9	35		34		40	40	40	40	40	0,25	erreur	erreur
F	OUI	10	28		30		32	32	32	31	30	0,5	0,12	0,5
G	OUI	6	22		31		23	28	26	23	21	4	1	2
I		6	8		36		6	6	6	6	6	>256	>64	>64
J		38	40		34		34	39	36	34	34	0,5	1	4
K		6	6		34		6	6	6	6	6	>256	erreur	erreur
L		31	24	26	23	29	28	32	28	27	25	1	8	16
O		36	37	35	37	30	31	34	34	32	32	0,5	1	2

Souches	Induction	E15 Aix	L15 Aix	DA 2 Aix	PT15 Aix	SYN1 5 Aix	Oxoid 48h	LF 48h	Biorrad 48h	BD 48h	I2A 48h	CMI solide 24h	CMI liquide 24h	CMB
P	OUI	6	31	30	31	25	40	40	40	40	40	0,5	1	2
Q		6	6	6	32	26	6	6	6	6	6	>256	erreur	erreu
R		26	22	22	24	22	35	36	35	33	32	0,5	1	8
S		6	14	17	25	22	6	6	6	6	6	>256	erreur	erreu
T		30	27	26	29	21	35	>40	36	35	34	0,5	0,5	1
U	OUI	6	28	30	37	27	40	>40	45	43	40	0,5	1	8
V		6	6	6	30	27	6	6	6	6	6	>256	>64	>64
W	oui	7	38		40		34	40	40	34	34	0,5	erreur	0,5
X		32	28	28	38	25	40	40	38	34	36	0,5	erreur	erreu
Y		36	33		30		32	36	32	31	32	1	0,5	4
Z		34	36		33		35	32	35	32	33	0,5	2	2
XX		6	6		23		6	6	6	6	6		>64	>64
XZ		32	26		25		24	30	28	24	23		16	16

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

