



HAL
open science

L'antibiogramme par diffusion : de sa découverte à son automatisatisation - Mise en place d'une méthode automatisée au CHU de Rouen

François Leysour de Rohello

► To cite this version:

François Leysour de Rohello. L'antibiogramme par diffusion : de sa découverte à son automatisatisation - Mise en place d'une méthode automatisée au CHU de Rouen. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03212286

HAL Id: dumas-03212286

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03212286>

Submitted on 29 Apr 2021

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.

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2020

N°

MÉMOIRE POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément aux dispositions du décret 2003/76 du 23 janvier 2003, tenant lieu de
THÈSE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 25 septembre 2020

par

LEYSOUR DE ROHELLO François

Né le 20/11/1992 à COURCOURONNES

***L'antibiogramme par diffusion : de sa découverte
à son automatisation –
Mise en place d'une méthode automatisée au
CHU de Rouen***

Sous la direction de Madame le Docteur Sophie BOYER

Sous la codirection de Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON

Présidente du jury : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON

Membres du jury : Madame le Docteur Sophie BOYER

Monsieur le Professeur Olivier JOIN-LAMBERT

Madame le Professeur Nadine LEMAITRE

Monsieur le Docteur Jean-Claude NGUYEN

Madame le Professeur Martine Pestel-Caron, je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Merci pour la confiance et la bienveillance que vous avez eu à mon égard lors de mes différents stages dans votre service. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

Madame le Docteur Sophie Boyer, je vous remercie pour votre accompagnement, vos conseils avisés et votre disponibilité tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon respect le plus sincère.

Madame le Professeur Nadine Lemaitre, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Olivier Join-Lambert, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Jean-Claude Nguyen, vous avez très gentiment accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Madame Vaillant-Quicray, merci de me faire confiance et d'avoir accepté de me faire une place au sein de votre service pour les prochaines années.

Valéry Brunel, je te remercie d'avoir accepté de m'accueillir dans ton service dès novembre. J'ai hâte de débiter cette nouvelle aventure.

Monsieur le Professeur Loïc Favennec, merci pour votre accueil lors de mon premier semestre à Rouen. Merci également pour notre collaboration lors des deux années durant lesquelles j'ai eu la chance de représenter les internes.

L'internat, une période riche en rencontres...

Jennifer, première rencontre de cet internat... Une belle amitié est née autour de pots de selles à trier, regarder et transvaser.

Merci également à ton charmant mari, Clément, marseillais sur les bords mais tout de même attachant.

Je suis persuadé que nous avons encore de nombreuses et belles aventures à vivre ensemble !

Guillaume, je ne doute pas de tes capacités et reste convaincu que tu réussiras dans la vie.

Fiston, homme mystérieux que je ne connais finalement pas plus qu'au début de cet internat.

Pauline, sache que tu n'as jamais gagné et ne gagneras jamais.

Tanguy, j'ai aimé jouer ton psychologue tous les matins. Ces moments me manquent. Hâte de voir tes nouvelles créations !

Marion C, Marion D, Emilie, merci pour les bons moments passés ensemble.

Gaétan, Aurélien, Louis, Thomas, Tania, Maria, Anaïs, Léo (<3), Louis, Nicolas, Lucie, Marie, nous avons passé au moins un semestre ensemble, merci de m'avoir supporté (ou pas). Merci quand même à ceux qui n'ont pas eu cette chance !

Justine, merci pour ta collaboration et ton sérieux lors de ce travail.

Un grand merci à l'ensemble du personnel de l'Institut de Biologie Clinique du CHU de Rouen (biologistes, techniciens, secrétaires, ASH...). Une pensée particulière pour les techniciens et biologistes du service de bactériologie pour votre aide dans ce travail et

pour les bons moments que nous avons passé ensemble. Léa, merci pour ton aide précieuse. Maxime, j'espère un jour pouvoir essayer ton tracteur tondeuse. Lucie, je n'oublie pas que je te dois 10 euros, je te payerai un verre ou deux ou trois... Liliane, merci pour ta bonne humeur et de m'avoir supporté durant ces longs mois. Danièle, Patricia, Nathalie, apprendre les bases de la bactériologie à vos côtés a été une véritable chance ! Merci à Ludo, Anaïs, Elodie, Geneviève, Christine, Laurence, Delphine, Véronique, Laurent et à tous ceux que j'oublie !

Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire de biologie médicale du CHI d'Elbeuf – Louviers – Val de Reuil, je suis heureux de pouvoir continuer à travailler à vos côtés. Merci Géraldine, Amélie, Claire, Olivier pour votre bonne humeur quotidienne et votre gentillesse.

Un immense merci,

A mes deux frères, Erwan et Ronan, mes grands-parents et l'ensemble de ma famille pour tous les bons moments passés et à venir,

A mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé,

A toi Morgane qui partage ma vie depuis plus de dix ans. Tu as toujours été là pour moi, merci de me supporter chaque jour et plus particulièrement ces dernières semaines. Je t'aime.

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Loïc FAVENNEC**
Professeur Agnès LIARD
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|------------------------------------|-------|--|
| Mr Frédéric ANSELME | HCN | Cardiologie |
| Mme Gisèle APTER | Havre | Pédopsychiatrie |
| Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR | HCN | Chirurgie plastique |
| Mr Jean-Marc BASTE | HCN | Chirurgie Thoracique |
| Mr Fabrice BAUER | HCN | Cardiologie |
| Mme Soumeya BEKRI | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mr Ygal BENHAMOU | HCN | Médecine interne |
| Mr Jacques BENICHOU | HCN | Bio statistiques et informatique médicale |
| Mr Olivier BOYER | UFR | Immunologie |
| Mme Sophie CANDON | HCN | Immunologie |
| Mr François CARON | HCN | Maladies infectieuses et tropicales |
| Mr Philippe CHASSAGNE | HCN | Médecine interne (gériatrie) |
| Mr Vincent COMPERE | HCN | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale |
| Mr Jean-Nicolas CORNU | HCN | Urologie |
| Mr Antoine CUVELIER | HB | Pneumologie |
| Mr Jean-Nicolas DACHER | HCN | Radiologie et imagerie médicale |
| Mr Stéfan DARMONI | HCN | Informatique médicale et techniques de communication |
| Mr Pierre DECHELOTTE | HCN | Nutrition |
| Mr Stéphane DERREY | HCN | Neurochirurgie |
| Mr Frédéric DI FIORE | CHB | Cancérologie |

| | | |
|---------------------------------------|-------|--|
| Mr Fabien DOGUET | HCN | Chirurgie Cardio Vasculaire |
| Mr Jean DOUCET | SJ | Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie |
| Mr Bernard DUBRAY | CHB | Radiothérapie |
| Mr Frank DUJARDIN | HCN | Chirurgie orthopédique - Traumatologique |
| Mr Fabrice DUPARC | HCN | Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| Mr Eric DURAND | HCN | Cardiologie |
| Mr Bertrand DUREUIL | HCN | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale |
| Mme Hélène ELTCHANINOFF | HCN | Cardiologie |
| Mr Manuel ETIENNE | HCN | Maladies infectieuses et tropicales |
| Mr Thierry FREBOURG | UFR | Génétique |
| Mr Pierre FREGER (<i>surnombre</i>) | HCN | Anatomie - Neurochirurgie |
| Mr Jean François GEHANNO | HCN | Médecine et santé au travail |
| Mr Emmanuel GERARDIN | HCN | Imagerie médicale |
| Mme Priscille GERARDIN | HCN | Pédopsychiatrie |
| M. Guillaume GOURCEROL | HCN | Physiologie |
| Mr Dominique GUERROT | HCN | Néphrologie |
| Mr Olivier GUILLIN | HCN | Psychiatrie Adultes |
| Mr Claude HOUDAYER | HCN | Génétique |
| Mr Fabrice JARDIN | CHB | Hématologie |
| Mr Luc-Marie JOLY | HCN | Médecine d'urgence |
| Mr Pascal JOLY | HCN | Dermato – Vénérologie |
| Mme Bouchra LAMIA | Havre | Pneumologie |
| Mme Annie LAQUERRIERE | HCN | Anatomie et cytologie pathologiques |
| Mr Vincent LAUDENBACH | HCN | Anesthésie et réanimation chirurgicale |
| Mr Joël LECHEVALLIER | HCN | Chirurgie infantile |
| Mr Hervé LEFEBVRE | HB | Endocrinologie et maladies métaboliques |
| Mr Thierry LEQUERRE | HCN | Rhumatologie |
| Mme Anne-Marie LEROI | HCN | Physiologie |
| Mr Hervé LEVESQUE | HCN | Médecine interne |
| Mme Agnès LIARD-ZMUDA | HCN | Chirurgie Infantile |
| Mr Pierre Yves LITZLER | HCN | Chirurgie cardiaque |
| Mr Bertrand MACE | HCN | Histologie, embryologie, cytogénétique |
| M. David MALTETE | HCN | Neurologie |
| Mr Christophe MARGUET | HCN | Pédiatrie |
| Mme Isabelle MARIE | HCN | Médecine interne |
| Mr Jean-Paul MARIE | HCN | Oto-rhino-laryngologie |
| Mr Loïc MARPEAU | HCN | Gynécologie - Obstétrique |
| Mr Stéphane MARRET | HCN | Pédiatrie |

| | | |
|---|--------------|---|
| Mme Véronique MERLE | HCN | Epidémiologie |
| Mr Pierre MICHEL | HCN | Hépto-gastro-entérologie |
| M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>) | HCN | Réanimation Médicale |
| Mr Marc MURAINÉ | HCN | Ophthalmologie |
| Mr Christophe PEILLON | HCN | Chirurgie générale |
| Mr Christian PFISTER | HCN | Urologie |
| Mr Jean-Christophe PLANTIER | HCN | Bactériologie - Virologie |
| Mr Didier PLISSONNIER | HCN | Chirurgie vasculaire |
| Mr Gaëtan PREVOST | HCN | Endocrinologie |
| Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>) | HCN | Réanimation médicale - Médecine d'urgence |
| Mr Vincent RICHARD | UFR | Pharmacologie |
| Mme Nathalie RIVES | HCN | Biologie du développement et de la reproduction |
| Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>) | HCN | Gynécologie - Obstétrique |
| Mr Jean-Christophe SABOURIN | HCN | Anatomie – Pathologie |
| Mr Mathieu SALAUN | HCN | Pneumologie |
| Mr Guillaume SAVOYE | HCN | Hépto-gastrologie |
| Mme Céline SAVOYE-COLLET | HCN | Imagerie médicale |
| Mme Pascale SCHNEIDER | HCN | Pédiatrie |
| Mr Lilian SCHWARZ | HCN | Chirurgie Viscérale et Digestive |
| Mr Michel SCOTTE | HCN | Chirurgie digestive |
| Mme Fabienne TAMION | HCN | Thérapeutique |
| Mr Luc THIBERVILLE | HCN | Pneumologie |
| Mr Hervé TILLY (<i>surnombre</i>) | CHB | Hématologie et transfusion |
| M. Gilles TOURNEL | HCN | Médecine Légale |
| Mr Olivier TROST | HCN | Chirurgie Maxillo-Faciale |
| Mr Jean-Jacques TUECH | HCN | Chirurgie digestive |
| Mr Benoît VEBER | HCN | Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale |
| Mr Pierre VERA | CHB | Biophysique et traitement de l'image |
| Mr Eric VERIN | Les Herbiers | Médecine Physique et de Réadaptation |
| Mr Eric VERSPYCK | HCN | Gynécologie obstétrique |
| Mr Olivier VITTECOQ | HC | Rhumatologie |
| Mme Marie-Laure WELTER | HCN | Physiologie |

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|--|-----|-------------------------------------|
| Mme Najate ACHAMRAH | HCN | Nutrition |
| Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG | HCN | Bactériologie – Virologie |
| Mr Emmanuel BESNIER | HCN | Anesthésiologie - Réanimation |
| Mme Carole BRASSE LAGNEL | HCN | Biochimie |
| Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS | HCN | Chirurgie Vasculaire |
| Mr Gérard BUCHONNET | HCN | Hématologie |
| Mme Mireille CASTANET | HCN | Pédiatrie |
| Mme Nathalie CHASTAN | HCN | Neurophysiologie |
| Mr Moïse COEFFIER | HCN | Nutrition |
| Mr Serge JACQUOT | UFR | Immunologie |
| Mr Joël LADNER | HCN | Epidémiologie, économie de la santé |
| Mr Jean-Baptiste LATOUCHE | UFR | Biologie cellulaire |
| M. Florent MARGUET | HCN | Histologie |
| Mme Chloé MELCHIOR | HCN | Gastroentérologie |
| Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>) | HCN | Virologie |
| Mr Gaël NICOLAS | UFR | Génétique |
| Mme Muriel QUILLARD | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mme Laëtitia ROLLIN | HCN | Médecine du Travail |
| Mme Pascale SAUGIER-VEBER | HCN | Génétique |
| Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN | HCN | Anatomie |
| Mr David WALLON | HCN | Neurologie |
| Mr Julien WILS | HCN | Pharmacologie |

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

| | | |
|---------------------------------|-----|---------------|
| Mr Thierry WABLE | UFR | Communication |
| Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL | UFR | Anglais |

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

| | |
|---|----------------------|
| Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH) | Pharmacologie |
| Mr Thierry BESSON | Chimie Thérapeutique |
| Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite) | Pharmacologie |
| Mme Isabelle DUBUS | Biochimie |
| Mr Abdelhakim EL OMRI | Pharmacognosie |
| Mr François ESTOUR | Chimie Organique |
| Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH) | Parasitologie |
| Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite) | Toxicologie |
| Mr Michel GUERBET | Toxicologie |
| Mme Christelle MONTEIL | Toxicologie |
| Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH) | Microbiologie |
| Mr Rémi VARIN (PU-PH) | Pharmacie clinique |
| Mr Jean-Marie VAUGEOIS | Pharmacologie |
| Mr Philippe VERITE | Chimie analytique |

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

| | |
|--|--|
| Mme Cécile BARBOT | Chimie Générale et Minérale |
| Mr Frédéric BOUNOURE | Pharmacie Galénique |
| Mr Thomas CASTANHEIRO-MATIAS | Chimie Organique |
| Mr Abdeslam CHAGRAOUI | Physiologie |
| Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO) | Statistiques |
| Mme Elizabeth CHOSSON | Botanique |
| Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB | Législation pharmaceutique et économie de la santé |
| Mme Cécile CORBIERE | Biochimie |
| Mme Nathalie DOURMAP | Pharmacologie |
| Mme Isabelle DUBUC | Pharmacologie |
| Mme Dominique DUTERTE-BOUCHER | Pharmacologie |
| Mr Gilles GARGALA (MCU-PH) | Parasitologie |
| Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA | Chimie analytique |
| Mme Marie-Laure GROULT | Botanique |

| | |
|------------------------------|------------------------------|
| Mr Hervé HUE | Biophysique et mathématiques |
| Mme Hong LU | Biologie |
| Mme Marine MALLETER | Toxicologie |
| M. Jérémie MARTINET (MCU-PH) | Immunologie |
| Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT | Chimie analytique |
| Mr Mohamed SKIBA | Pharmacie galénique |
| Mme Malika SKIBA | Pharmacie galénique |
| Mme Christine THARASSE | Chimie thérapeutique |
| Mr Frédéric ZIEGLER | Biochimie |

PROFESSEURS ASSOCIES

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ | Pharmacie officinale |
| Mme Caroline BERTOUX | Pharmacie |

PAU-PH

M. Mikaël DAOUPHARS

PROFESSEUR CERTIFIE

| | |
|---------------------|---------|
| Mme Mathilde GUERIN | Anglais |
|---------------------|---------|

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

| | |
|------------------|-----------|
| Mme Alice MOISAN | Virologie |
| M. Henri GONDÉ | Pharmacie |

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

| | |
|-------------------|---------------|
| M. Abdel MOUHAJIR | Parasitologie |
| M. Maxime GRAND | Bactériologie |

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT

| | |
|-----------------|----------------|
| Mme Ramla SALHI | Pharmacognosie |
|-----------------|----------------|

| |
|--|
| LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES |
|--|

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Mme Cécile BARBOT | Chimie Générale et minérale |
| Mr Thierry BESSON | Chimie thérapeutique |
| Mr Abdeslam CHAGRAOUI | Physiologie |
| Mme Elisabeth CHOSSON | Botanique |
| Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB | Législation et économie de la santé |
| Mme Isabelle DUBUS | Biochimie |
| Mr Abdelhakim EL OMRI | Pharmacognosie |
| Mr François ESTOUR | Chimie organique |
| Mr Loïc FAVENNEC | Parasitologie |
| Mr Michel GUERBET | Toxicologie |
| Mme Martine PESTEL-CARON | Microbiologie |
| Mr Mohamed SKIBA | Pharmacie galénique |
| Mr Rémi VARIN | Pharmacie clinique |
| M. Jean-Marie VAUGEOIS | Pharmacologie |
| Mr Philippe VERITE | Chimie analytique |

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

| | |
|------------------------------|------------------------|
| Mr Paul MULDER (phar) | Sciences du Médicament |
| Mme Su RUAN (med) | Génie Informatique |

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|--|--|
| Mr Sahil ADRIOUCH (med) | Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905) |
| Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med) | Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079) |
| Mme Carine CLEREN (med) | Neurosciences (Néovasc) |
| M. Sylvain FRAINEAU (med) | Physiologie (Inserm U 1096) |
| Mme Pascaline GAILDRAT (med) | Génétique moléculaire humaine (UMR 1079) |
| Mr Nicolas GUEROUT (med) | Chirurgie Expérimentale |
| Mme Rachel LETELLIER (med) | Physiologie |
| Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med) | Physiologie (Unité Inserm 1076) |
| Mr Frédéric PASQUET | Sciences du langage, orthophonie |
| Mme Christine RONDANINO (med) | Physiologie de la reproduction |
| Mr Youssan Var TAN | Immunologie |
| Mme Isabelle TOURNIER (med) | Biochimie (UMR 1079) |

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen

| | |
|--|-----------|
| Introduction..... | 20 |
| 1. Chronologie et principes généraux de l'antibiogramme par diffusion | 20 |
| 1.1. Historique | 20 |
| 1.2. Automatisation en bactériologie | 23 |
| 1.3. Automatisation de l'antibiogramme par diffusion | 25 |
| 1.4. Principe de la méthode : définition d'un antibiogramme par diffusion | 26 |
| 2. Facteurs influençant le résultat : paramètres techniques critiques..... | 28 |
| 2.1. Maîtrise de l'inoculum | 29 |
| 2.2. Choix de la gélose | 32 |
| 2.3. Ensemencement..... | 34 |
| 2.4. Disques antibiotiques..... | 35 |
| 2.5. Maîtrise du temps technique | 37 |
| 2.6. Durée d'incubation..... | 37 |
| 2.7. Lecture de l'antibiogramme..... | 39 |
| 2.7.1. Lecture manuelle et recommandations | 39 |
| 2.7.2. Lecture automatisée | 40 |
| 3. Les bases de l'interprétation de l'antibiogramme..... | 42 |
| 3.1. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) 42 | |
| 3.2. Concentrations critiques | 43 |
| 3.2.1. Historique | 44 |
| 3.2.2. Approche microbiologique : concentrations critiques « épidémiologiques » ou cut-off épidémiologiques ou ECOFF | 44 |
| 3.2.3. Approche clinique : concentrations critiques cliniques ou « clinical breakpoints » | 46 |
| 3.2.4. Catégorisation en l'absence de concentrations critiques cliniques..... | 48 |
| 3.2.5. Imprécision du diamètre mesuré..... | 49 |
| 3.2.6. Incertitude de mesure : zone d'incertitude technique | 49 |
| 4. Maîtrise de la qualité selon la norme NF EN ISO 15189..... | 51 |
| 4.1. Processus d'accréditation | 51 |
| 4.2. Vérification/validation de méthodes | 52 |
| Objectifs | 54 |
| Matériels et méthodes | 56 |
| 1. Présentation des méthodes à valider | 56 |
| 2. Adaptation de la méthode de réalisation des antibiogrammes à partir de fioles d'hémoculture positives | 56 |
| 3. Essais à réaliser dans le cadre de la validation des performances de la méthode.. | 58 |
| 3.1. Fidélité..... | 58 |

| | | |
|----------------------|---|-----------|
| 3.2. | Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)..... | 58 |
| 3.3. | Exactitude..... | 59 |
| 3.4. | Robustesse..... | 59 |
| 3.4.1. | Essai de stabilité de l'inoculum | 59 |
| 3.4.2. | Durée de stabilité des cartouches antibiotiques | 60 |
| 3.5. | Comparaisons de méthodes | 60 |
| 3.5.1. | Comparaison de la méthode automatisée à la méthode manuelle à partir d'une culture pure | 61 |
| 3.5.2. | Antibiogrammes à partir de fioles d'hémoculture positives..... | 61 |
| 3.5.3. | Comparaison des méthodes de lecture..... | 62 |
| 3.6. | Analyse des risques..... | 62 |
| 4. | Analyse de l'activité des PreLUD® préalablement à la mise en place de la méthode automatisée..... | 63 |
| Résultats | | 64 |
| 1. | Adaptation de la méthode des antibiogrammes à partir de fioles d'hémoculture positives..... | 64 |
| 2. | Validation des performances de la méthode..... | 65 |
| 2.1. | Fidélité..... | 65 |
| 2.2. | Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)..... | 66 |
| 2.3. | Robustesse..... | 70 |
| 2.3.1. | Essai de stabilité de l'inoculum | 70 |
| 2.3.2. | Durée de stabilité des cartouches antibiotiques | 70 |
| 2.4. | Comparaisons de méthodes | 71 |
| 2.4.1. | Méthode automatisée – inoculum réalisé avec le dispositif Inoclic® | 71 |
| 2.4.2. | Méthode automatisée à partir d'une fiole d'hémoculture positive | 73 |
| 2.4.3. | Lecture automatisée par SIRscan® | 74 |
| 2.5. | Analyse des risques..... | 74 |
| 3. | Analyse de l'activité des PreLUD® préalablement à la mise en place de la méthode automatisée | 75 |
| Discussion | | 77 |
| Conclusion | | 86 |
| Bibliographie | | 87 |
| Annexes | | 91 |

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Avantages et inconvénients de la méthode d'antibiogramme par diffusion | 23 |
| Tableau 2 : D'après le CA-SFM, concentrations et diamètres critiques de l'amoxicilline – acide clavulanique pour les Enterobacterales..... | 47 |
| Tableau 3 : Essais à réaliser pour valider la méthode : antibiogramme automatisé par diffusion en milieu gélosé | 55 |
| Tableau 4 : Inoculum en nombre de gouttes/volume en fonction des méthodes..... | 58 |
| Tableau 5 : Résultats des essais de reproductibilité – <i>S. aureus</i> | 66 |
| Tableau 6 : Résultats des essais de reproductibilité – <i>P. aeruginosa</i> | 67 |
| Tableau 7 : Résultats des essais de reproductibilité – <i>E. coli</i> | 67 |
| Tableau 8 : Résultats des essais de reproductibilité – <i>S. pneumoniae</i> | 69 |
| Tableau 9 : Résultats des essais de reproductibilité – <i>E. faecalis</i> | 69 |
| Tableau 10 : Résultats des essais de stabilité | 70 |
| Tableau 11 : Concordance entre les deux méthodes de réalisation de l'antibiogramme – Entérobactéries | 71 |
| Tableau 12 : Concordance entre les deux méthodes de réalisation de l'antibiogramme – Staphylocoques..... | 72 |
| Tableau 13 : Concordance entre les deux méthodes de réalisation de l'antibiogramme – Entérocoques..... | 72 |
| Tableau 14 : Concordance entre les deux méthodes de réalisation de l'antibiogramme – Bacilles non fermentaires | 72 |
| Figure 1 : Schéma de la méthode Stokes..... | 22 |
| Figure 2 : D'après Eveillard <i>et al</i> , intérêt du travail 24h/24 dans l'instauration d'un traitement antibiotique..... | 25 |
| Figure 3 : Automate PreLUD® équipé du "module antibiotique" (a)..... | 26 |
| Figure 4 : Principe de l'antibiogramme par diffusion | 27 |
| Figure 5 : Droite de concordance CMI – diamètre | 28 |
| Figure 6 : D'après Ahman <i>et al</i> , essais de répétabilité pour la gentamicine et l'amoxicilline– acide clavulanique..... | 36 |
| Figure 7 : D'après Bijllaardt <i>et al</i> , taux des trois types d'erreurs de catégorisation en fonction du temps pour toutes les souches d'Enterobacteriaceae et pour 15 antibiotiques testés | 38 |
| Figure 8 : Recommandations de lecture lorsque la bordure du cercle d'inhibition est floue...39 | |
| Figure 9 : Recommandations de lecture pour la pénicilline chez <i>S. aureus</i> (34) | 40 |
| Figure 10 : Distribution des CMI à l'amikacine pour 28672 souches d' <i>Escherichia coli</i> | 45 |
| Figure 11 : Distribution des CMI de la ciprofloxacine pour 5905 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 45 |
| Figure 12 : D'après Alexandre <i>et al</i> (44), concentrations critiques pour la témocilline en fonction des différents pays européens | 47 |
| Figure 13 : D'après le CA-SFM (34), exemple de concentrations critiques PK/PD..... | 48 |
| Figure 14 : D'après Jehl <i>et al</i> (16), imprécision du diamètre mesuré | 49 |
| Figure 15 : Corrélation CMI/diamètre pour l'association piperacilline–tazobactam chez les Enterobacterales | 50 |
| Figure 16 : Cycle de vie d'une accréditation en biologie médicale d'après le SH REF 05 | 52 |
| Figure 17 : Critères de performance à évaluer selon SH-GTA-04..... | 53 |
| Figure 18 : Présentation des étapes de la méthode à valider | 56 |
| Figure 19 : Diagramme d'Ishikawa représentant les facteurs susceptibles d'influencer le résultat | 74 |
| Figure 20 : Occupation des ensemenceurs PreLUD® - CHU de Rouen | 75 |

Glossaire

| | |
|--------|--|
| AUC | Area Under Curve - aire sous la courbe |
| ATU | Area of Technical Uncertainty - ZIT |
| BGN | Bacille à Gram Négatif |
| BLSE | β -lactamase à Spectre Etendu |
| CA-SFM | Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie |
| CHU | Centre Hospitalier Universitaire |
| CIQ | Contrôle Interne de Qualité |
| CMB | Concentration Minimale Bactéricide |
| CMI | Concentration Minimale Inhibitrice |
| COFRAC | COmité FRançais d'ACcréditation |
| CV | Coefficient de Variation |
| ECOFF | Epidemiological Cut-OFF values – concentrations critiques épidémiologiques |
| EEQ | Evaluation Externe de Qualité |
| ET | Ecart-Type |
| EUCAST | EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| FDA | Food and Drug Administration |
| mE | Minor Error – erreur mineure |
| ME | Major Error – erreur majeure |
| MH | Mueller Hinton |
| MH-F | Mueller Hinton – Fastidious |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| RAST | Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing |
| SARM | <i>Staphylococcus Aureus</i> Résistant à la Méricilline |
| SIL | Système de gestion de l'Information du Laboratoire |
| VME | Very Major Error – erreur très majeure |
| ZIT | Zone d'Incertitude Technique |

L'objectif de l'antibiogramme est, quelle que soit la méthode utilisée, d'évaluer l'activité d'un antibiotique contre une bactérie isolée d'un prélèvement biologique. Avant même la découverte des antibiotiques, des épreuves de sensibilité étaient mises au point afin de déduire l'activité d'une substance vis-à-vis d'un microorganisme. La découverte de nombreux antibiotiques a accéléré la nécessité de pouvoir prédire leur activité vis-à-vis d'un pathogène afin de traiter une infection. Plusieurs décennies ont été nécessaires pour mettre en place des techniques fiables et reproductibles. Parmi ces techniques, la diffusion en milieu gélosé est l'une des plus vieilles méthodes de réalisation de l'antibiogramme dont la relative facilité de mise en œuvre et le faible coût, en font une méthode toujours très utilisée dans les laboratoires de biologie médicale. Méthode encore entièrement manuelle il y a quelques années, les avancées technologiques et les exigences imposées par l'accréditation des laboratoires ont entraîné l'apparition sur le marché d'automates permettant l'automatisation quasi complète de ce processus complexe.

C'est dans ce contexte que le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen a acquis deux automates permettant d'ensemencer les antibiogrammes puis de les lire. Afin d'assurer la fiabilité des résultats rendus à l'aide de ces nouvelles machines et d'obtenir leur accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, un dossier de vérification/validation de méthodes a été réalisé.

Introduction

1. Chronologie et principes généraux de l'antibiogramme par diffusion

1.1. Historique

Avant même l'ère des antibiotiques, plusieurs études ont montré qu'il existait, dans certaines conditions, une inhibition de la croissance bactérienne au sein de bouillons de culture. Ces premières observations datent de la fin du XIX^{ème} siècle et mettent en évidence pour la première fois le concept de l'antibiose. L'antibiose peut être définie comme une interaction biologique entre deux ou plusieurs organismes qui est délétère pour au moins l'un d'entre eux ou bien une association antagoniste entre un organisme et les substances métaboliques produites par un autre.

En 1874, William Roberts observe qu'un milieu liquide dans lequel est présent *Penicillium glaucum* ne peut pas être facilement contaminé par des bactéries (1). Deux ans plus tard, John Tyndall fait une observation similaire (2). Il remarque alors que le bouillon de culture favorise la croissance de bactéries ou de moisissures mais qu'il est difficile d'obtenir une culture des deux simultanément. Bien que ces observations aient été significatives, elles n'ont pas permis d'établir des méthodologies pratiques prédictives permettant une quelconque utilisation clinique.

Vingt ans plus tard, les travaux sur la pénicilline marquent le début d'une série d'événements qui a conduit au développement des tests *in vitro* que nous utilisons encore de nos jours. Rappelons que c'est en septembre 1928 qu'Alexander Fleming fait pour la première fois l'observation de l'effet inhibiteur de la pénicilline sur milieu solide (3). Il met alors en évidence une inhibition de la croissance des colonies de staphylocoques sur une gélose contaminée par un pénicillium.

Dès le début des années 1920, Alexander Fleming utilisait déjà une méthode de caractérisation de l'efficacité de solutions antimicrobiennes, en quelque sorte une méthode précurseur de celle que nous connaissons aujourd'hui (4). Il utilise une gélose dans laquelle une tranchée avait été préalablement creusée. Dans ce fossé, il introduit une solution à tester et en déduit alors son activité antimicrobienne en fonction de la zone d'inhibition formée autour de la tranchée après son incubation. Quelques années après, cette technique a été modifiée par Reddish qui creusait directement dans la gélose des puits dans lesquels il plaçait une solution antimicrobienne à tester

(5). En 1929, Fleming met au point une méthode de dilution en milieu liquide qui pose les bases de la méthode actuelle pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (3.1).

En 1940, plusieurs chercheurs ont proposé de nouvelles techniques pour évaluer l'activité d'antimicrobiens, en particulier Pope qui utilise pour la première fois du papier absorbant qu'il imprègne préalablement de solution antibactérienne pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un agent antimicrobien. L'année suivante, Abraham *et al* introduisent l'utilisation de cylindres placés sur la gélose et remplis de solution antimicrobienne (6). La solution antimicrobienne diffuse alors dans la gélose et des diamètres d'inhibition sont mesurés après une durée d'incubation appropriée. Ces cylindres ont été plusieurs fois renommés mais le terme « Oxford Cup » est le plus couramment retrouvé. D'autres méthodes en milieu liquide ont vu le jour les années suivantes, en particulier des méthodes utilisant le pH comme indicateur de sensibilité plutôt que la turbidité. Dans les années quarante, de nombreux progrès ont été réalisés et les disques imprégnés d'antibiotiques voient le jour d'abord avec la méthode de Mohs (7) qui sera améliorée plusieurs années après par la méthode de Stokes (8).

A la fin de la Seconde Guerre mondiale, la pénicilline est utilisée pour traiter de nombreuses maladies infectieuses. La méthode de dilution en tube, les méthodes de diffusion en gélose à l'aide de disques ainsi que plusieurs techniques de dilution en gélose sont des méthodes acceptées pour prédire avec plus ou moins de précision la sensibilité à la pénicilline à la fin de cette période. De nombreuses autres molécules antibiotiques ont été mises sur le marché à cette époque ce qui a accru le besoin de prédire l'activité d'une molécule vis-à-vis d'un pathogène donné afin d'administrer le traitement le plus adapté.

En 1947, Bondi *et al* introduisent le disque de 6,5 millimètres imprégné d'antibiotiques que nous utilisons encore aujourd'hui (9). En 1952, Gould et Bowie mettent au point une méthode de diffusion sur gélose qui permet de tester sur une même gélose plusieurs concentrations d'un même antibiotique. En 1955, Stokes introduit la méthode qui porte son nom et qui a été utilisée pendant plusieurs années en Europe (figure 1) (8). Cette méthode permettait, sur une même gélose, de tester un organisme contrôle de la même espèce ou d'une espèce similaire à l'organisme à tester. Cette méthode a pour avantage que la souche contrôle et la souche à tester sont traitées dans les mêmes conditions (milieu, temps d'incubation, atmosphère, température et contenu du

disque). L'organisme contrôle était inoculé sur une moitié de la boîte tandis que l'organisme à tester étaitensemencé sur l'autre moitié. A l'interface des deux zones, des disques étaient posés. La sensibilité de la souche testée est déduite du diamètre de la souche contrôle. La souche est considérée comme sensible si la zone d'inhibition est de taille égale ou supérieure à celle de la souche contrôle. Dans le cas contraire, la souche est considérée comme résistante à l'antibiotique testé.

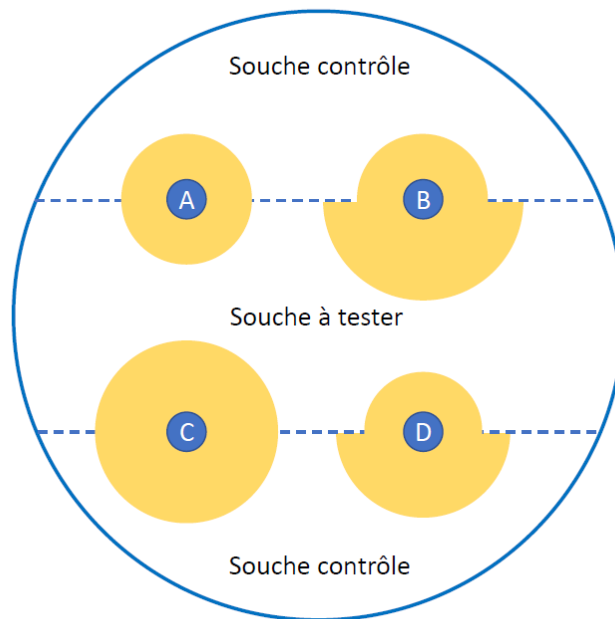


Figure 1 : Schéma de la méthode Stokes. La souche à tester peut être considérée comme sensible aux molécules A, B et C et résistante à la molécule D

La méthode actuelle (1.4) a été proposée quelques années plus tard sur la base du travail de deux microbiologistes et leurs équipes. Elle a reçu le nom de ces deux chercheurs : la méthode de Kirby-Bauer (10). D'autres méthodes sont développées dans les années soixante que ce soit en milieu solide (modification de la charge des disques, etc.) ou en milieu liquide.

En 1959, devant le nombre important de méthodes, la communauté scientifique et plusieurs organisations ont jugé nécessaire de normaliser les méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques. Ericsson et Steers ont commencé en 1959 et 1960 à comparer les différentes méthodes de réalisation des antibiogrammes puis en 1961 c'est au tour de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de s'intéresser à la normalisation des techniques pour la réalisation des antibiogrammes. De nombreux progrès de normalisation sont réalisés jusqu'en 1975, année au cours de laquelle le

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) a publié un document intitulé Antimicrobial Susceptibility Testing Standards permettant de standardiser les pratiques au sein des laboratoires (11).

En 1975, l'apparition des méthodes automatisées marque un tournant dans l'histoire de l'antibiogramme. C'est la compagnie Pfizer Diagnostics qui développe le premier système automatisé pour la réalisation de l'antibiogramme, baptisé « Autobac Disk Elution System ». Cet automate permettait de fournir des résultats d'antibiogrammes dans la journée. Le principal écueil de cette machine est qu'elle ne comportait pas de système d'identification. L'identification du germe était obtenue le lendemain par les techniques habituelles. Ce système a été suivi par d'autres systèmes automatisés en milieu liquide commercialisés par Abbott et MacDonnell Douglas Corporation, ancêtres des technologies utilisées aujourd'hui (Vitek2®, Phoenix®, etc.).

Dans les années quatre-vingt-dix, les laboratoires de microbiologie ont à leur disposition plusieurs techniques pour la réalisation des antibiogrammes : les méthodes automatisées et les méthodes manuelles notamment les méthodes de diffusion en gélose. Ces dernières ont su conserver leur utilité malgré les nombreuses critiques (main d'œuvre, durée, etc.) car ce sont des méthodes économiques et extrêmement flexibles par rapport à tous les autres systèmes automatisés (tableau 1).

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de la méthode d'antibiogramme par diffusion

| Avantages | Inconvénients |
|---|---|
| Détection de mécanismes associés (exemple : β -lactamase à spectre étendu (BLSE) + céphalosporinase AmpC) | Main d'œuvre qualifiée nécessaire |
| Contrôle visuel (pureté, résultat aberrant, etc.) | Variabilité inter-opérateurs |
| Faible coût des réactifs | Stockage des données difficile et absence d'exploitation informatisée des résultats sans lecteur automatisé |
| Flexibilité dans le choix des antibiotiques testés | Résultats qualitatifs |
| Absence de risque de panne | |
| Indépendance vis-à-vis des fournisseurs | |

1.2. Automatisation en bactériologie

La complexité des étapes de l'analyse bactériologique (examen macroscopique, microscopique, ensemencement, identification, étude de la sensibilité aux

antibiotiques, biologie moléculaire, etc.), la variété d'échantillons à traiter et le volume moins important de prélèvements en bactériologie par rapport aux secteurs de biochimie ou d'hématologie ont ralenti la commercialisation de systèmes intégrés en bactériologie. Mais la pression économique importante, l'augmentation du nombre d'analyses à réaliser et l'obligation de l'accréditation avec toutes les contraintes qui en découlent ont conduit de nombreux laboratoires de biologie médicale en France à se regrouper. Il s'en suit la mise en place d'importants plateaux techniques permettant le traitement de plusieurs milliers d'analyses par jour. Afin de répondre aux exigences de qualité et gagner en productivité, en particulier pour des tâches répétitives, le recours à des automates de plus en plus perfectionnés a été nécessaire. Il est certain que l'automatisation a de nombreux avantages :

- Augmentation de la productivité :
 - Automatisation de tâches répétitives : réception des prélèvements, ensemencement, incubation, lecture des cultures ;
 - Optimisation du temps de travail du personnel.
- Facilitation de l'accréditation :
 - Diminution de la variabilité inter-opérateurs ;
 - Diminution des erreurs (oubli d'ensemencement, erreur d'identité, etc.) ;
 - Traçabilité complète.
- Impact clinique :
 - Travail 24h/24 possible : diminution de la durée de rendu des résultats permettant une optimisation des thérapeutiques, une diminution de la durée d'hospitalisation et une diminution des coûts (12). D'après Eveillard *et al*, une activité 24h/24 permet de réduire de 24 à 48 heures le délai de rendu des résultats permettant ainsi la mise en place d'un traitement antibiotique précoce et adapté dans 22,7% des cas (n = 97) et une réduction du spectre d'une antibiothérapie déjà initiée dans 5,3% des cas (n = 23) (figure 2) (13).

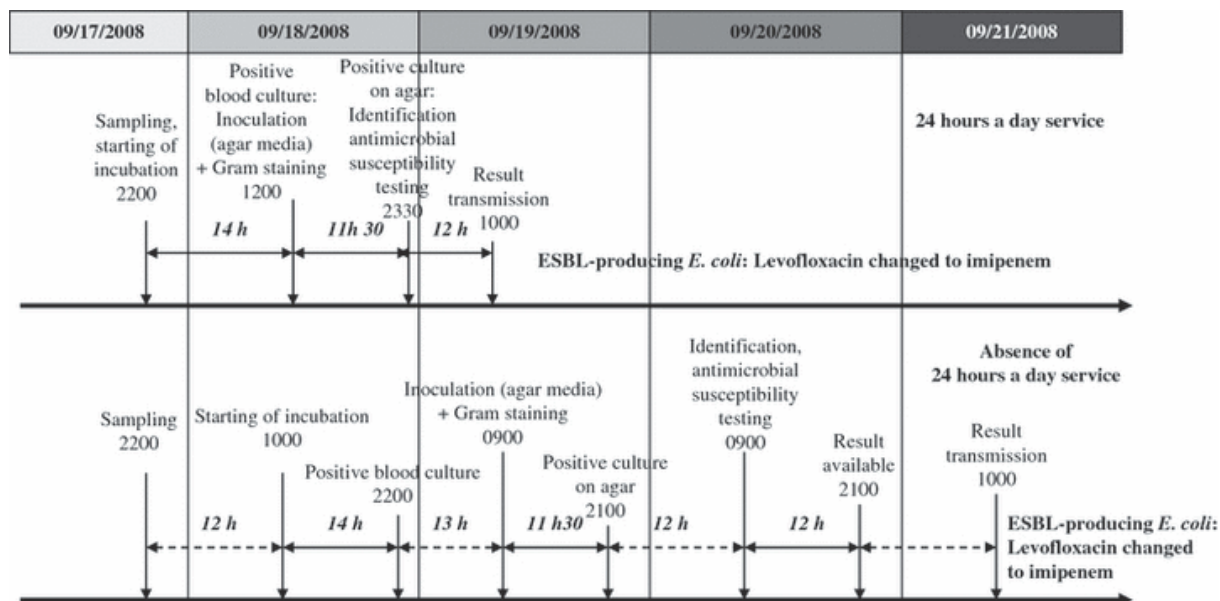


Figure 2 : D'après Eveillard et al, intérêt du travail 24h/24 dans l'instauration d'un traitement antibiotique

1.3. Automatisation de l'antibiogramme par diffusion

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'automatisation de l'antibiogramme remonte aux années 1980. Il s'agit alors de technologies permettant la réalisation d'un antibiogramme en milieu liquide. En ce qui concerne l'antibiogramme par diffusion, l'automatisation débute à la fin du XXème siècle avec l'apparition de systèmes de lecture automatisés. L'automatisation quasi-complète de la méthode d'antibiogramme en milieu gélosé par diffusion est récente. Plusieurs automates sont maintenant disponibles sur le marché, BD offre une solution d'automatisation complète avec ses automates de la gamme Kiestra®, BioMérieux distribue en France l'automate WASP® fabriqué par COPAN et enfin I2a commercialise le PreLUD® (figure 3), automate ensemencéur qui permet également la dépose des disques sur les géloses. Toutes ces solutions permettent un rendement important associé à une traçabilité complète du processus, avantage indiscutable dans l'ère de l'accréditation (14,15).

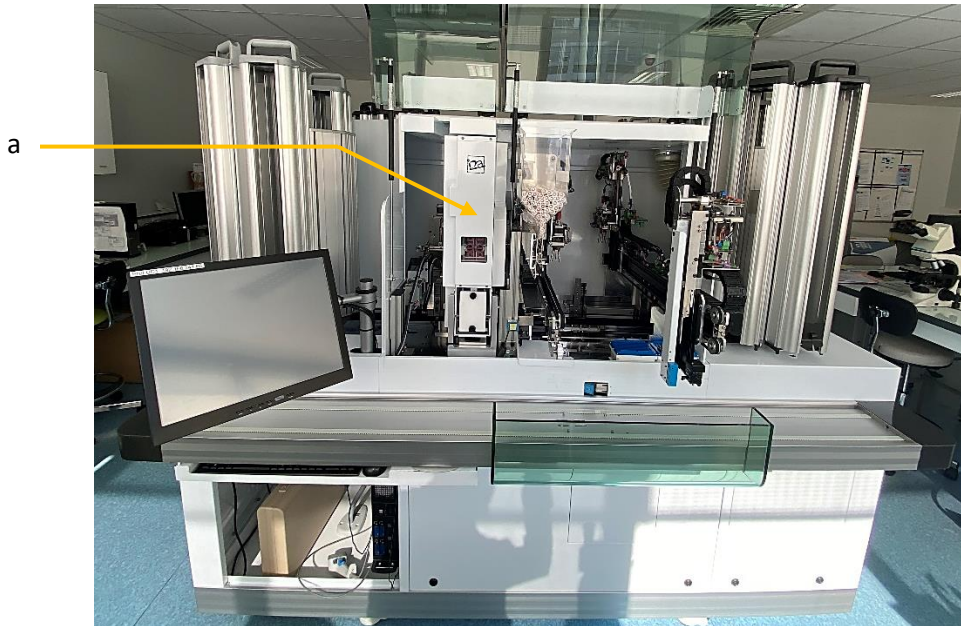


Figure 3 : Automate PreLUD® équipé du "module antibiotique" (a)

1.4. Principe de la méthode : définition d'un antibiogramme par diffusion

Comme nous l'avons mentionné, il existe différentes méthodes pour déterminer la sensibilité d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotiques. Toutes ces méthodes ont des avantages et des inconvénients différents, raison pour laquelle, au sein d'un même laboratoire, plusieurs méthodes cohabitent afin d'évaluer la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques.

Parmi les méthodes manuelles, l'antibiogramme par diffusion selon la méthode mise au point par Kirby-Bauer est la plus utilisée (10). Cette technique consiste à ensemercer à la surface d'une gélose une quantité calibrée de la souche à tester puis d'y déposer un disque imprégné d'antibiotique. L'antibiotique va diffuser du papier buvard vers la gélose afin de créer un gradient de concentration homogène et décroissant, du disque antibiotique vers la gélose (figure 4).

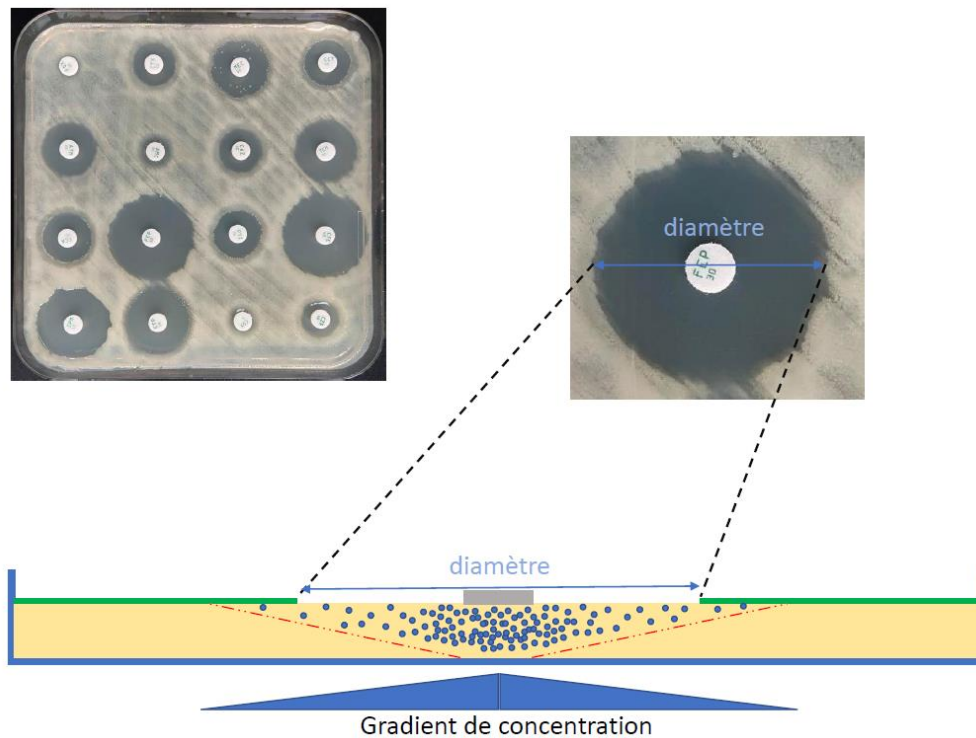


Figure 4 : Principe de l'antibiogramme par diffusion

La croissance bactérienne va se faire autour du disque imprégné d'antibiotique en créant un halo d'inhibition de la croissance bactérienne. La croissance bactérienne cesse à l'endroit où la concentration du gradient dans la gélose correspond à la CMI. Il est alors aisément possible de mesurer le diamètre de ce cercle d'inhibition. La relation entre la taille du diamètre d'inhibition et la CMI est inversement proportionnelle et permet alors de déduire la sensibilité de la souche bactérienne à l'antibiotique testé. Cette relation diamètre/CMI permet de tracer une droite appelée droite de concordance qui est propre à chaque couple bactérie/antibiotique (figure 5). Cette droite de concordance est obtenue par la mesure de la CMI et du diamètre d'inhibition sur plusieurs centaines de souches (16).

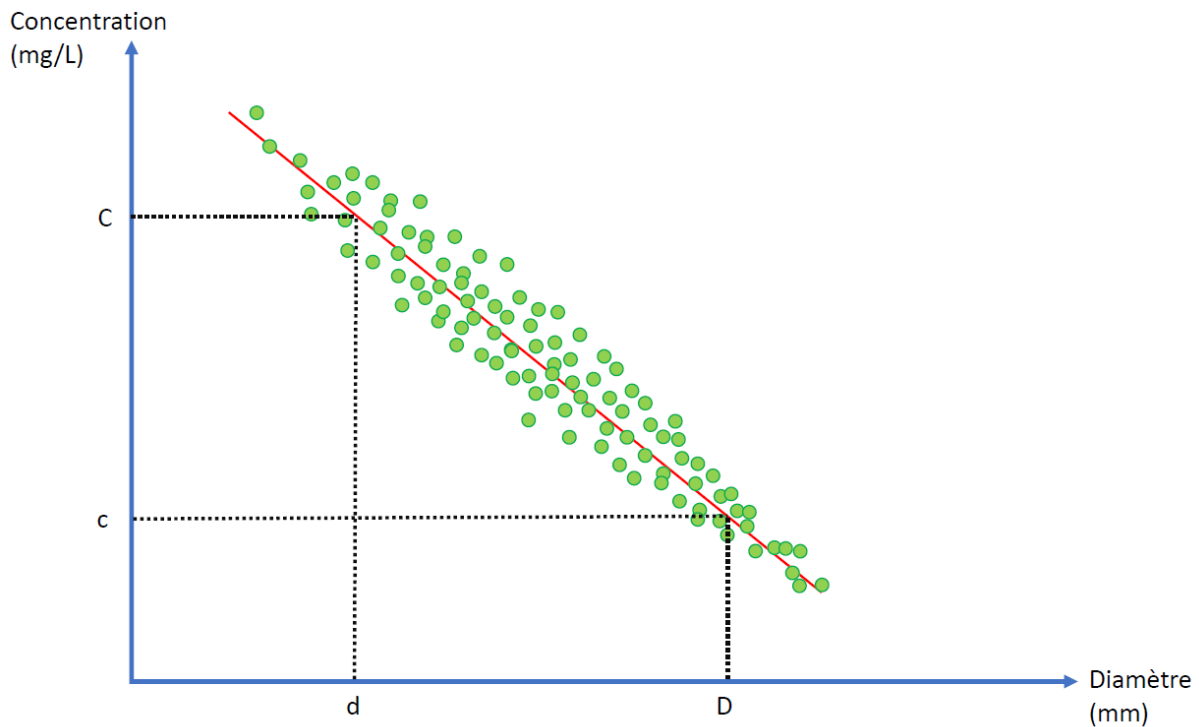


Figure 5 : Droite de concordance CMI – diamètre
C correspond à la concentration critique basse, *c* correspond à la concentration critique haute,
D et *d* sont les diamètres critiques correspondant respectivement à *c* et *C*

D'après la figure 5 :

- Si le diamètre mesuré est inférieur à *d* alors la souche pourra être considérée comme résistante (R) à l'antibiotique testé ;
- Si le diamètre mesuré est supérieur à *D* alors la souche pourra être considérée comme sensible (S) à l'antibiotique testé ;
- Si le diamètre mesuré est compris entre *d* et *D* alors la souche est sensible à l'antibiotique testé à condition d'utiliser une posologie plus importante (anciennement intermédiaire : I).

2. Facteurs influençant le résultat : paramètres techniques critiques

De prime abord, la réalisation d'un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé peut paraître relativement simple. Néanmoins, plusieurs étapes sont nécessaires pour la réalisation de l'antibiogramme et pour chaque phase, plusieurs paramètres techniques sont à maîtriser pour garantir un résultat conforme. La prise en charge du patient

découle directement du résultat de l'antibiogramme et les conséquences d'un résultat erroné sont potentiellement graves car elles peuvent conduire à l'instauration d'un traitement antibiotique non adapté voire inefficace.

Les différentes étapes du processus sont décrites ci-dessous (17) :

- Préparation d'un inoculum standardisé à partir d'une culture bactérienne :
 1. A partir de colonies bien isolées ;
 2. Création d'une suspension bactérienne (inoculum) ;
 3. Normalisation de la suspension bactérienne à l'aide des normes McFarland (2.1).

- Inoculation de la suspension bactérienne sur un milieu de croissance adapté, généralement le milieu Mueller-Hinton (MH) (2.2).

- Ensemencement (2.3).

- Application de disques imprégnés d'antibiotiques (2.4).

- Incubation des géloses dans une étuve adaptée (2.5 et 2.6).

- Mesure de la zone d'inhibition (2.7).

- Interprétation des résultats de l'antibiogramme (3).

2.1. Maîtrise de l'inoculum

La réalisation d'un test de sensibilité aux antibiotiques nécessite l'utilisation d'un inoculum standardisé afin de pouvoir garantir des résultats interprétables et reproductibles. Une des façons les plus simples pour réaliser un inoculum calibré est l'utilisation des standards McFarland. Ces standards permettent d'évaluer la turbidité d'une suspension de microorganismes. C'est en 1907 que McFarland a mis au point des solutions de turbidité reproductibles et stables en mélangeant de l'acide sulfurique et une solution aqueuse de chlorure de baryum permettant d'obtenir un précipité de sulfate de baryum. Cette méthode permet d'obtenir des solutions étalons avec une

certaine reproductibilité. Le standard McFarland le plus couramment utilisé pour la réalisation des inocula bactériens est le standard 0,5 correspondant à une suspension de *Escherichia coli* de $1 \text{ à } 2.10^8$ bactéries par millilitre (18).

Initialement, la réalisation de l'inoculum était une étape longue et fastidieuse qui nécessitait l'incubation d'une suspension bactérienne entre 2 et 8 heures afin d'obtenir une suspension finale de turbidité équivalente à 0,5 McFarland. Afin d'éviter ces heures d'incubation supplémentaires et réaliser le test sans interruption, une méthode de réalisation de l'inoculum dite « rapide » a été validée par D'Amato et Hochstein en 1982 (19). Cette méthode est celle qui est maintenant utilisée chaque jour dans des milliers de laboratoires à travers le monde. Sa mise en œuvre est relativement simple, une ou plusieurs colonies bactériennes en croissance sont prélevées sur la gélose et mises en suspension dans de l'eau stérile. La turbidité de la suspension est directement ajustée à 0,5 McFarland. Selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM), les bactéries anaérobies nécessitent quant à elles un inoculum plus important, fixé à 1 McFarland. D'une façon générale, un inoculum correct doit permettre d'obtenir, à condition d'un ensemencement correct et d'une durée d'incubation respectée, des colonies confluentes sur l'ensemble de la gélose.

La densité de l'inoculum est probablement la variable qui a l'effet le plus important sur le diamètre final obtenu. En effet, dans le cas d'inocula très denses, il est probable qu'aucune zone d'inhibition ne soit formée ou alors que son diamètre soit extrêmement réduit conduisant à une interprétation erronée du résultat. A l'inverse, un inoculum trop faible peut conduire à l'obtention de diamètres de trop grandes tailles. De plus, si l'inoculum est trop ou peu important, certaines images d'inductions ou de synergies pourraient ne pas être visibles. Dans ces deux situations, il est raisonnable de recommencer le test.

Dans un article publié en 2015, Hombach *et al* ont comparé deux méthodes de réalisation de l'inoculum, l'ajustement visuel de l'inoculum à l'aide d'étalon McFarland et l'utilisation d'un densitomètre (Densichek, bioMérieux) (20). Il a été montré qu'il n'existait pas de différence significative quant à la méthode de réalisation de l'inoculum pour une souche ATCC de *Staphylococcus aureus*. En revanche, pour une souche ATCC de *E. coli*, la méthode de réalisation de l'inoculum à l'œil nu montrait des performances meilleures que celles obtenues par le densitomètre (les numérations

moyennes en UFC \pm ET étaient de $(0,94 \pm 0,18) \times 10^8$ UFC/mL lorsque la densité était ajustée à l'œil nu et de $(0,62 \pm 0,20) \times 10^8$ UFC/mL avec l'instrument Densichek, soit une différence significative ($P < 0,001$). Néanmoins, l'étude ne permettait pas de montrer l'impact de ces résultats sur la taille des diamètres d'inhibition et donc sur la catégorisation de la souche vis-à-vis des antibiotiques testés.

L'obtention d'un inoculum calibré nécessite une certaine dextérité et est une étape pouvant être chronophage. Une méthode plus rapide pour la réalisation de l'inoculum est commercialisée par la société I2a. L'utilisation du dispositif Inoclic® permet la standardisation de l'inoculum à partir d'une seule colonie et offre la possibilité de s'affranchir de l'étape de vérification de la densité de l'inoculum par l'utilisation d'un densitomètre. Une colonie est piquée à l'aide d'un fil de platine et mise en suspension dans 0,7 mL d'eau physiologique pour la réalisation de l'inoculum. Cet inoculum est ensuite utilisé pour ensemer la gélose par écouvillonnage. La méthode est présentée dans l'annexe 1.

Ces dernières années, microbiologistes et cliniciens tentent par différents moyens de réduire le temps de rendu des résultats de l'antibiogramme. Outre le raccourcissement du temps d'incubation des antibiogrammes, une seconde façon de diminuer le délai de rendu des résultats de l'antibiogramme est de réaliser les antibiogrammes directement à partir des prélèvements révélés positifs à l'examen direct. L'utilisation d'un inoculum calibré nécessite l'utilisation d'une culture bactérienne obtenue généralement après 24 heures. Il est néanmoins possible de réaliser l'inoculum directement à partir du prélèvement. L'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) et le CA-SFM proposent aujourd'hui une méthode reconnue pour la réalisation de l'inoculum directement à partir des fioles d'hémoculture positives. Cette pratique a permis au CHU de Rouen de diminuer de 24 heures le délai de rendu des résultats de l'antibiogramme. Une étude réalisée au CHU de Rouen évaluant le service médical rendu de la réalisation des antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémoculture montre que pour 100 flacons positifs (hors bactériémie connue et contamination), une modification du traitement a eu lieu 24 heures plus tôt dans presque deux tiers des cas (21) :

- Pour 13 patients, l'antibiothérapie était initialement inefficace ;
- Pour 47 patients, une antibiothérapie à spectre plus étroit a pu être initiée plus précocement ;

- Pour 4 patients, une bactérie multirésistante a été mise en évidence permettant l'isolement du patient.

La réalisation d'antibiogrammes par diffusion directement à partir de prélèvements, autres que les hémocultures, n'est pas une méthode validée par le CA-SFM ou l'EUCAST. Néanmoins, même si l'inoculum n'est pas calibré, cela permet comme pour les hémocultures, l'utilisation d'une antibiothérapie adaptée et précoce. Dans une étude publiée par Coorevits *et al*, 123 antibiogrammes ont été réalisés directement à partir de prélèvements (aspiration trachéale, urine, abcès, liquide biliaire, etc.) (22). Ces antibiogrammes ont été comparés à ceux obtenus après la culture du prélèvement et la réalisation d'un inoculum calibré. La concordance entre les deux techniques était supérieure à 90%. La majorité (87%) des discordances s'explique par la mise en évidence des mutants résistants sur l'antibiogramme direct ou par la présence d'un germe supplémentaire non trouvé après la culture de l'échantillon.

2.2. Choix de la gélose

La gélose Mueller-Hinton est la gélose la plus utilisée pour la réalisation des antibiogrammes par diffusion. Cette gélose a été développée en 1941 par J. Howard Mueller et Jane Hinton. Ces deux chercheurs de la Harvard Medical School désiraient à l'origine mettre au point un milieu de culture stable sans sérum et qui permettrait la culture de deux pathogènes très exigeants, *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. Ce milieu de culture était initialement utilisé sous la forme d'un bouillon puis sera, par la suite, adapté afin de pouvoir être utilisé comme milieu solide (23). Ce milieu stable, facile à fabriquer et permettant la culture de la plupart des bactéries pathogènes s'est ensuite imposé comme le milieu de référence pour la réalisation des antibiogrammes. Pour les germes exigeants comme *Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae* par exemple, il est néanmoins nécessaire d'utiliser une gélose MH enrichie en facteurs de croissance (sang de cheval et 20 mg/L de β -NAD⁺), appelée MH-F (F pour fastidious).

Il n'est pas recommandé d'utiliser d'autres milieux que le milieu MH pour la réalisation des antibiogrammes par diffusion. En effet, l'utilisation d'un milieu différent peut conduire à une modification du diamètre d'inhibition et ainsi entraîner une modification

de la catégorisation S, I ou R de la souche testée (24). Les diamètres critiques donnés par le CA-SFM/EUCAST sont définis à partir de mesures réalisées uniquement sur milieu MH ce qui implique qu'en cas d'utilisation d'autres géloses, les valeurs de diamètres sont inconnues.

Plusieurs paramètres liés à la qualité de la fabrication de la gélose peuvent influencer sur le résultat. La profondeur de la gélose doit être de 4 millimètres \pm 0,5 mm. Des géloses trop peu profondes vont augmenter la diffusion de l'antibiotique dans la gélose, ce qui conduira à l'apparition de plus grandes zones d'inhibition. Par conséquent, une souche potentiellement résistante à un antibiotique pourra être rendue faussement sensible. A l'inverse, des géloses coulées sur une épaisseur supérieure à 4 mm donneront des résultats faussement résistants.

Le pH de la gélose est également un facteur non négligeable et doit être compris entre 7,2 et 7,4 à température ambiante. Une variation du pH va entraîner, pour certains antibiotiques, une modification importante de leur activité. Les antibiotiques concernés par ces variations de pH sont plus particulièrement les aminosides, les macrolides et les tétracyclines. En effet, pour les aminosides, des conditions alcalines vont accroître leur activité alors que dans des conditions trop acides, leur activité sera inhibée. Une acidité importante du milieu réduira également de façon significative l'activité des macrolides (25)(26)(27). Les variations de pH du milieu ne sont pas nécessairement liées à sa fabrication. Les conditions d'incubation de l'antibiogramme vont pouvoir influencer sur le pH. Par exemple, en présence de CO₂, atmosphère recommandée pour l'incubation de certaines espèces bactériennes, le pH du milieu sera impacté, modifiant ainsi les diamètres pour les antibiotiques sensibles au pH tels que les aminosides. Des zones plus petites seront retrouvées lors de l'incubation en présence de CO₂ du fait de l'acidification du milieu (28).

Une quantité excessive de thymidine ou de thymine peut inverser les effets inhibiteurs des sulfamides et du triméthoprime, ce qui rend les zones d'inhibition plus petites et moins distinctes, voire conduit à l'absence de zone d'inhibition. Enfin, une concentration inadaptée en calcium, en magnésium ou en zinc sera susceptible d'avoir un impact sur l'activité des aminosides, de la tétracycline, de la daptomycine (29) ou encore des carbapénèmes (30).

L'utilisation de plus en plus importante de géloses « industrielles » limite le risque d'employer des géloses dont la qualité ne serait pas adaptée à la réalisation

d'antibiogrammes. Il reste toutefois nécessaire de tester les géloses MH régulièrement avec des souches contrôles afin de s'assurer de la qualité du milieu et par conséquent des résultats obtenus.

2.3. Ensemencement

Différentes techniques, manuelles ou automatisées, sont utilisées pour l'ensemencement des antibiogrammes. La technique manuelle utilise un écouvillon qui, une fois imbibé de suspension bactérienne, est frotté à la surface de la gélose dans trois directions différentes afin de couvrir l'ensemble de la gélose. La qualité de l'ensemencement sera fonction de la régularité des stries et est donc une variable opérateur-dépendante. Concernant les techniques automatisées, certains automates, comme le PreLUD®, utilisent une technique d'écouvillonnage en spirale. L'écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne puis est apposé sur la gélose qui est alors mise en rotation permettant ainsi l'ensemencement total de la boîte. L'automate Kiestra® (BD) utilise quant à lui une bille magnétique se déplaçant à la surface de la gélose afin de permettre son ensemencement.

En 2015, Hombach *et al* se sont intéressés à la technique d'ensemencement et au matériel d'ensemencement (20). Deux méthodes manuelles et une méthode automatisée ont été testées. Pour les méthodes manuelles, c'est le type d'écouvillon qui est modifié où les écouvillons floqués étaient comparés aux écouvillons en coton recommandés par le CA-SFM/EUCAST. Pour la méthode automatisée, le comparateur était l'automate Kiestra® (bille magnétique) commercialisé par BD qui permettait l'ensemencement des antibiogrammes. Quelle que soit la méthode utilisée, tous les diamètres moyens des zones d'inhibition pour la souche contrôle *E. coli* ATCC 25922 (à l'exception des résultats pour le méropénème) se situaient dans les bornes attendues par l'EUCAST. Néanmoins, lorsque les mesures sont comparées individuellement aux valeurs attendues, 8,0% des mesures n'étaient pas comprises dans les bornes pour l'écouvillonnage manuel à l'aide d'écouvillons en coton. Le pourcentage de mesures en dehors des bornes fixées était de 6,7% lorsque l'écouvillonnage était réalisé à l'aide d'un écouvillon floqué et de 1,9% pour la méthode automatisée. L'écart-type (ET) moyen des mesures était plus faible (0,93 mm) pour la méthode automatisée que pour l'inoculation à l'aide d'écouvillons en coton (1,19 mm)

et d'écouvillons floqués (1,11 mm). Il apparaît donc que la méthode automatisée apporte des résultats plus reproductibles que la méthode manuelle.

2.4. Disques antibiotiques

Après l'ensemencement de la gélose, il est nécessaire d'y appliquer les disques antibiotiques. Ces disques, fabriqués à partir de papier absorbant imprégné d'agents antimicrobiens à des concentrations précises, ont un diamètre de 6,5 mm. La quantité d'antibiotique dans le disque est généralement fixée de façon arbitraire. Elle est choisie de façon à obtenir un diamètre d'inhibition de taille raisonnable (15 – 35 mm) dans des conditions standardisées (31).

Le nombre de disques par gélose, leurs positions et la distance entre ces derniers sont des paramètres sur lesquels une attention particulière doit être portée. En effet, la position permet de visualiser d'éventuelles synergies ou antagonismes entre les différentes molécules et une distance raisonnable entre les disques permet d'éviter une éventuelle erreur d'appréciation du diamètre mesuré du fait d'un chevauchement des zones d'inhibition.

Concernant la charge d'antibiotique contenue dans le disque, la Food and Drug Administration (FDA), l'OMS et l'institut allemand de normalisation (Deutsches Institut für Normung) imposent des normes de fabrication aux fabricants de disques. Ces normes exigent uniquement que la quantité moyenne d'antimicrobien contenue dans les disques soit comprise dans une fourchette définie. La FDA oblige les manufacturiers à produire des disques dont la teneur en principe actif se situe entre 67% et 150% de la quantité déclarée.

À la suite de ce constat, l'EUCAST a publié un article concernant la qualité des disques antibiotiques en évaluant neuf fabricants en 2014 et en 2017. Plusieurs tests ont été réalisés, le premier visant à évaluer les fabricants de disques entre eux et le second permettant d'évaluer les variations entre les disques pour un même fabricant (gentamicine, amoxicilline–acide clavulanique, pipéracilline–tazobactam) après amélioration du processus de fabrication. Les résultats montrent qu'il existe une différence importante des diamètres d'inhibition mesurés en fonction des fabricants. Pour quatre des neufs manufacturiers, un nombre significatif de mesures se situait hors des limites acceptables définies par l'EUCAST (32). Notamment, pour un

fabricant, 33% (26/78) des mesures étaient en dehors des valeurs attendues avec pour certains diamètres des variations de plus de 10 mm par rapport à la cible.

Pour tous les fabricants, 20 disques consécutifs de gentamicine ont été testés, les variations de diamètre sont dans l'ensemble peu importantes et toujours inférieures à 3 mm. Néanmoins, pour deux fabricants, les tests de répétabilité sur les disques d'amoxicilline–acide clavulanique et de pipéracilline–tazobactam montrent des variations allant jusqu'à 9 mm (figure 6). La qualité des disques est donc extrêmement variable d'un fabricant à l'autre mais est également inconstante d'un disque à l'autre chez un même industriel. Toutefois, entre 2014 et 2017, les résultats se sont nettement améliorés pour l'ensemble des fabricants (annexe 2). Il n'en demeure pas moins que certains fabricants avaient encore des résultats en dehors des bornes définies par le CA-SFM, d'où l'importance de tester régulièrement les disques en laboratoire par le biais de contrôles internes de la qualité (CIQ).

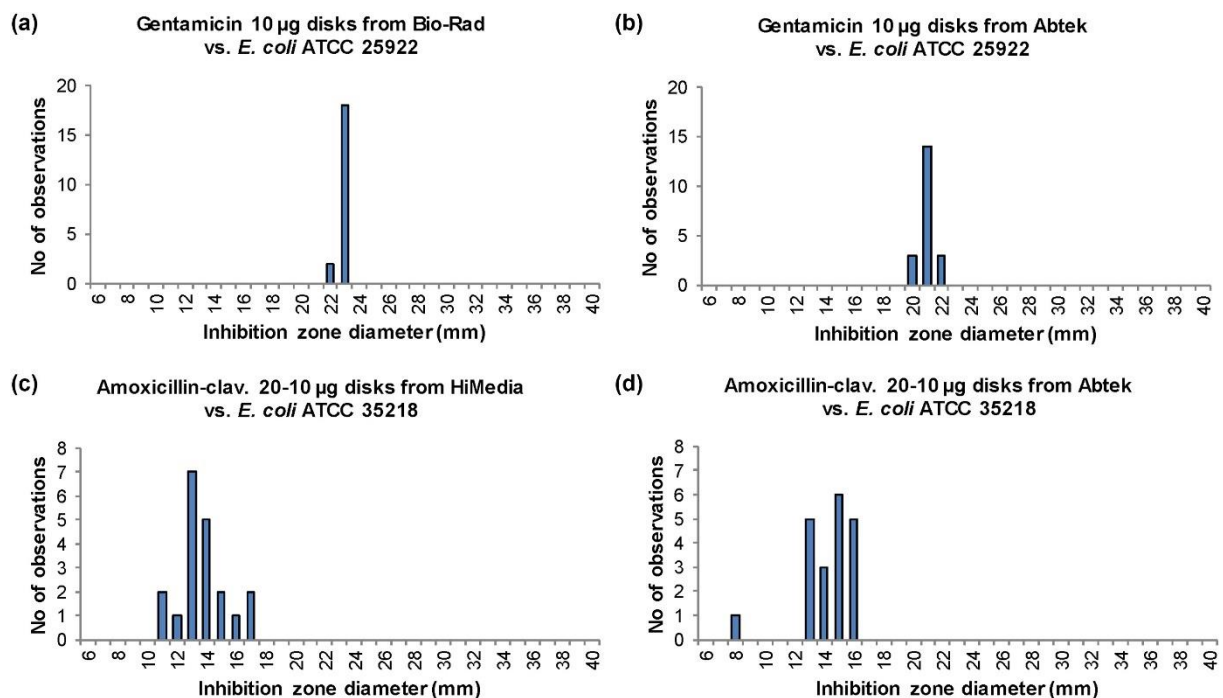


Figure 6 : D'après Ahman et al, essais de répétabilité pour la gentamicine et l'amoxicilline–acide clavulanique
 Dans les cas a et b, les résultats sont corrects contrairement aux cas c et d qui montrent des résultats inacceptables

2.5. Maîtrise du temps technique

Après l'ensemencement de la gélose, l'application des disques antibiotiques doit être réalisée dans un laps de temps relativement court. En effet, de nombreuses bactéries sont capables d'initier leur croissance à température ambiante et cet effet est d'autant plus important lorsque les géloses sont pré-incubées à 35°C. L'EUCAST a montré que lorsque les plaques inoculées sont laissées à température ambiante pendant deux heures avant l'application des disques, les diamètres des zones d'inhibition pour *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 29213 (9 et 11 antibiotiques testés respectivement, représentant les différentes classes) étaient de 1 à 3 mm plus petits que lorsque les disques étaient appliqués immédiatement (33).

Après application des disques, les géloses devront être placées dans l'étuve idéalement dans les 15 minutes, sans dépasser 30 minutes. Si le temps entre la dépose des disques et la mise à l'étuve excède la demi-heure, une diffusion trop importante des antibiotiques pourra conduire à l'obtention de zones d'inhibition anormalement grandes.

2.6. Durée d'incubation

La durée d'incubation généralement admise est de 20 +/- 4 heures pour la plupart des espèces et jusqu'à 48 heures pour certaines espèces selon les recommandations actuelles (34). Ce temps d'incubation est principalement basé sur les heures de travail en laboratoire plutôt que sur les caractéristiques de croissance et d'inhibition des bactéries.

Une étude réalisée par Bijllaardt *et al* s'intéresse à l'effet du temps d'incubation sur la catégorisation clinique de 88 souches d'entérobactéries possédant différents types de mécanismes de résistance (35). Toutes les heures, à partir de la première heure d'incubation, une photographie de la boîte a été prise et cela jusqu'à la dix-neuvième heure. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus à la vingtième heure. Des souches *E. coli* ATCC 25922 et *E. coli* ATCC 35218 ont été utilisées comme souches contrôles. Au total, 1320 combinaisons bactérie/antibiotique ont été testées. Dans 95,8% des cas, il existe une croissance bactérienne nette à partir de la sixième heure ou plus tôt (temps d'incubation moyen 5 h 47 min). Pour les 4,2% restant, il existait une croissance nette à partir de la septième heure (temps d'incubation moyen 6 h 43

min). Il existe dans 34,6% des cas une augmentation de la taille de la zone d'inhibition au fil des heures, par rapport à celle mesurée à la première heure. Dans 19,2% des cas, la taille de la zone d'inhibition a diminué par rapport à celle mesurée à la première heure et dans 46,1%, il n'y avait pas de modification de la taille du diamètre d'inhibition. L'effet de diminution de taille de la zone d'inhibition était plus fréquent quand la souche était résistante vis-à-vis de l'antibiotique testé. Après 7 heures d'incubation, le taux d'erreurs mineures (souche résistante ou sensible rendue intermédiaire) était de 3,4% (n = 45). Les taux d'erreurs majeures (souche sensible rendue résistante) et d'erreurs très majeures (souche résistante rendue sensible) étaient respectivement de 0,6% (n = 4) et 1,0% (n = 6) après 7 heures d'incubation et de 0,0% après 14 heures d'incubation (figure 7).

Cette étude démontre ainsi que dès 7 heures d'incubation, des résultats partiels peuvent être rendus.

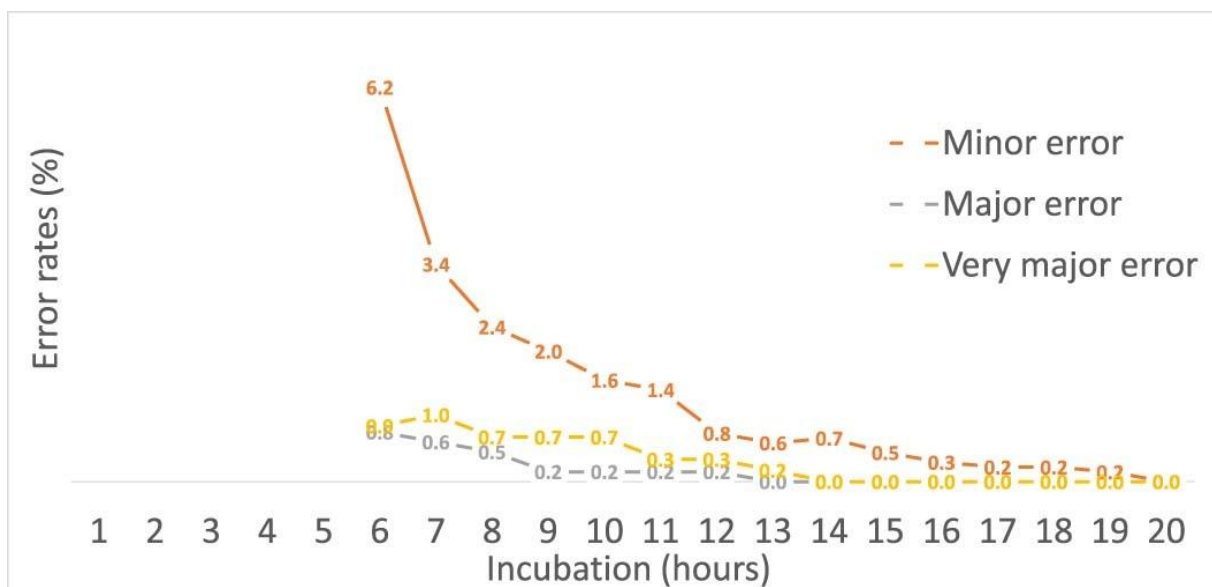


Figure 7 : D'après Bijllaardt et al, taux des trois types d'erreurs de catégorisation en fonction du temps pour toutes les souches d'Enterobacteriaceae et pour 15 antibiotiques testés (n = 1245)

Lors de ses études pour la standardisation de la méthode de l'antibiogramme par diffusion (33), l'EUCAST a étudié l'effet de la prolongation de l'incubation au-delà de vingt heures. Cela a entraîné la croissance de colonies dans les zones d'inhibition pour certains couples bactérie/antibiotique. Il n'est donc pas recommandé, sauf organismes (*Campylobacter sp.*, *Helicobacter pylori*, anaérobies, etc.) ou antibiotiques particuliers,

de prolonger l'incubation de l'antibiogramme au-delà de vingt-quatre heures, au risque de rendre un résultat erroné (fausse résistance).

2.7. Lecture de l'antibiogramme

2.7.1. Lecture manuelle et recommandations

La lecture de l'antibiogramme est une des étapes pour laquelle la standardisation des pratiques est la plus difficile. La variabilité inter-opérateurs associée à cette étape est importante, en particulier pour les lecteurs ayant peu ou pas d'expérience. La lecture à l'œil nu nécessite une standardisation des pratiques basée sur des recommandations nationales ou internationales afin de garantir des résultats reproductibles. C'est pourquoi l'EUCAST publie et met régulièrement en ligne des recommandations de lecture (36).

D'une façon générale, la lecture du diamètre d'inhibition est réalisée au niveau de la zone de complète inhibition de la culture. Il est nécessaire de placer la boîte à 30 cm de l'œil, de ne pas utiliser de loupe grossissante et de ne pas tenir les boîtes face à une lampe. Les diamètres des zones d'inhibition doivent être mesurés au millimètre le plus proche à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse.

Cette variabilité est notamment la conséquence d'une grande diversité des types de bordures de la zone d'inhibition. Elles sont tantôt nettes tantôt floues ou présentant parfois des micro-colonies rendant la lecture difficile. Les caractéristiques de la zone d'inhibition sont déterminées par la relation entre l'antibiotique et la bactérie avec ses éventuels mécanismes de résistance. Certains antibiotiques sont connus pour être à l'origine de bords flous qui peuvent mesurer de 1 à 5 mm. C'est en particulier le cas des sulfamides mais également des fluoroquinolones. Il est alors nécessaire d'estimer à l'œil nu (sans loupe) où se trouve le bord de la zone (figure 8).

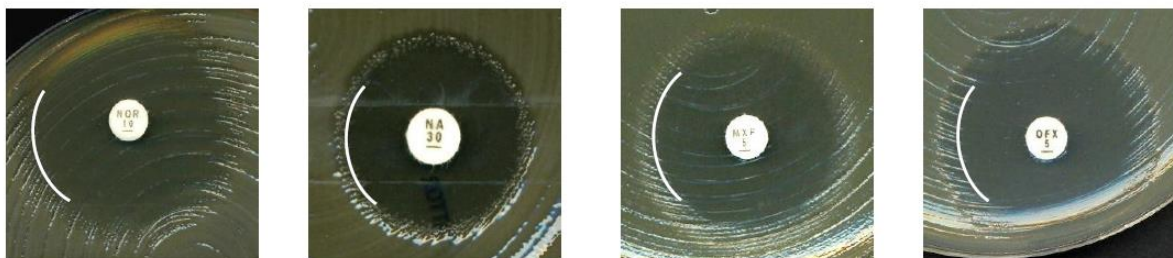
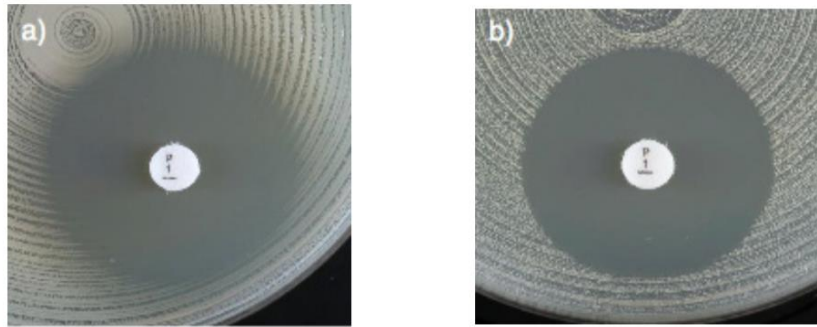


Figure 8 : Recommandations de lecture lorsque la bordure du cercle d'inhibition est floue (34)

Dans certaines situations, par exemple dans le cas de *S. aureus*, il est nécessaire d'étudier la bordure de la zone d'inhibition de façon précise. Cela permet de détecter une souche éventuellement productrice de pénicillinase. Si le diamètre est supérieur au diamètre critique soit 26 mm mais que la bordure de la zone d'inhibition est nette, la souche doit être considérée comme résistante. A l'inverse, si la bordure est floue, la souche peut être considérée comme sensible (figure 9).



- a) Diamètre \geq 26 mm avec une bordure floue. Souche sensible.
b) Diamètre \geq 26 mm avec une bordure nette. Souche résistante.

Figure 9 : Recommandations de lecture pour la pénicilline chez *S. aureus* (34)

Certaines espèces de *Proteus* vont produire un voile sur la gélose pouvant même recouvrir le disque d'antibiotique. Ainsi, il est nécessaire de ne pas prendre en compte ce phénomène pour mesurer les zones d'inhibition. La lecture d'antibiogrammes pour des espèces produisant une hémolyse sur gélose MH-F, en particulier les streptocoques, nécessite de ne pas prendre en compte cette hémolyse mais de se concentrer sur l'inhibition de croissance.

De nombreuses autres situations sont à prendre en compte dans le cadre de la lecture des antibiogrammes, il est donc important de se référer autant que possible aux recommandations des sociétés savantes.

2.7.2. Lecture automatisée

Depuis plusieurs années, différents systèmes ont été développés afin d'automatiser la lecture des antibiogrammes par diffusion sur milieu gélosé. L'objectif de ces systèmes est de permettre de standardiser la lecture des antibiogrammes par diffusion (lumière, positionnement de la boîte, fond d'image et même durée d'incubation pour le SIRscan®) diminuant ainsi la variabilité inter-opérateurs. Enfin, cela permet de garantir

une meilleure traçabilité des résultats grâce au stockage des images. Ces automates sont dotés d'un système de lecture de boîte (caméra ou scanner) permettant de lire les diamètres d'inhibition. Les boîtes sont mises dans le système par l'opérateur ou bien sont transférées de façon automatique dans l'enceinte de lecture depuis une étuve intelligente (SIRscan 2000 Automatic® par exemple). Une fois que la boîte a été lue, l'image est analysée par un logiciel d'analyse d'images permettant à l'opérateur d'obtenir sur un écran la photographie de la boîte ainsi que la mesure des diamètres. Si nécessaire, les zones d'inhibition peuvent être ajustées manuellement. Le logiciel expert intervient par la suite afin de permettre la catégorisation S, I ou R et le déclenchement d'aides à la validation biologique (rappels de règles CA-SFM/EUCAST, alertes pour les germes multirésistants, etc.). Les résultats sont ensuite automatiquement transmis vers le système de gestion de l'information du laboratoire (SIL) réduisant ainsi le risque d'erreurs de saisie.

L'ensemble des études menées ayant pour objectif d'évaluer ces lecteurs automatisés montre qu'il existe une corrélation élevée avec la méthode manuelle de mesure (lecture à l'aide d'un pied à coulisse). Les coefficients de corrélation sont compris entre 0,91 et 0,96 et seulement quelques erreurs de catégorisation de la sensibilité sont mises en évidence (37–40). Toutefois, les lecteurs ont parfois leurs limites. A ce titre, pour certains antibiotiques, notamment le cotrimoxazole ou l'ertapénème pour lesquels des micro-colonies sont souvent observées, ils ont des difficultés à détecter une faible croissance bactérienne au niveau de la bordure de la zone d'inhibition. Ces difficultés de lecture sont également rencontrées pour certaines bactéries (*Pseudomonas aeruginosa* par exemple) qui vont teinter la gélose du fait de la sécrétion de pigments colorés ou lorsque les colonies ne sont pas confluentes (41).

Ainsi, malgré les progrès technologiques importants réalisés ces dernières années, une analyse des images par un microbiologiste expérimenté s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter une éventuelle erreur de lecture. Il est également possible de procéder à une lecture manuelle en cas de doute sur la mesure d'un diamètre permettant ainsi de minimiser le risque de rendre un résultat erroné.

En 2016, Hombach *et al* ont réalisé une étude visant à définir l'impact des différentes variables techniques inhérentes à l'antibiogramme par diffusion (lecture du diamètre de la zone, disques d'antibiotiques, écouvillons, préparation de l'inoculum et inoculation des géloses) (42). Il a été montré que les variations techniques les plus

importantes proviennent principalement de la préparation de l'inoculum et de la façon dont la gélose estensemencée (stries). Les variations observées étaient conséquentes avec des variations sur la mesure des diamètres allant jusqu'à 24,8% pour la préparation de l'inoculum et 24,3% pour l'ensemencement.

Outre le fait que le laboratoire ne peut maîtriser certains facteurs tels que la précision de la charge du disque ou la composition de la gélose, il peut mettre en place des actions afin de diminuer les variations inter-opérateurs. L'automatisation pourra donc dans une certaine mesure diminuer ces variations et permettre une meilleure reproductibilité de l'antibiogramme par diffusion.

3. Les bases de l'interprétation de l'antibiogramme

3.1. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

Le but des tests de sensibilité est d'obtenir directement (E-test, dilutions en milieu liquide, etc.) ou indirectement (antibiogramme par diffusion sur gélose) une estimation de la CMI. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un antibiotique qui inhibe toute croissance visible d'une bactérie après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique. La CMI ne doit pas être confondue avec la CMB qui permet d'apprécier l'effet bactéricide d'un antibiotique. On définit la CMB comme la plus faible concentration d'antibiotique permettant d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries après 18 heures de culture à 37°C. Du fait de la complexité de mise en œuvre de la mesure de la CMB, cette valeur ne peut être estimée en routine au laboratoire de bactériologie. Seule la CMI est exploitée quotidiennement et la mesure de la CMI est la méthode de référence pour tester la sensibilité d'un pathogène à un antimicrobien.

La valeur de CMI en mg/L doit être comparée à une concentration critique (terme anglo-saxon : clinical breakpoint). Cette concentration critique permet, quand elle existe, de catégoriser une souche sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique testé. Il existe donc, au maximum, trois cas de figure (43) :

- La CMI est inférieure à la concentration critique basse : la souche est **sensible** (S). Il existe une forte probabilité de succès thérapeutique en utilisant la posologie et la voie d'administration recommandées.
- La CMI est supérieure à la concentration critique haute : la souche est **résistante** (R). Il existe alors une forte probabilité d'échec du traitement quelles que soient la posologie et la voie d'administration.
- La CMI se situe entre la concentration critique basse et la concentration critique haute : la souche est considérée comme **sensible à forte posologie**. La probabilité de succès thérapeutique est importante uniquement si le traitement est administré par voie systémique et à forte posologie ou alors lorsque l'antibiotique se concentre au niveau du site de l'infection. Cette catégorie remplace l'ancienne catégorie, intermédiaire (I), utilisée de 2002 à 2019. Cette catégorie intermédiaire était utilisée lorsque :
 - L'efficacité thérapeutique était incertaine ;
 - Le médicament était concentré dans un ou plusieurs compartiments particuliers ;
 - Une forte posologie pouvait être utilisée ;
 - Une incertitude de mesure était présente.

Cette modification de définition va avoir pour conséquence une modification de certaines concentrations critiques.

3.2. Concentrations critiques

Les concentrations critiques peuvent être assez simplement définies comme des concentrations qui séparent une population de microorganismes. Il existe en réalité deux types de concentrations critiques, les concentrations critiques « épidémiologiques » et les concentrations critiques « cliniques ». Les pratiques pour la fixation de ces concentrations critiques sont différentes selon les pays, c'est pour cela qu'il existe des différences de concentrations critiques selon les référentiels utilisés et selon les études. Néanmoins, en Europe, la philosophie pour l'instauration de ces concentrations est similaire quel que soit le pays et l'EUCAST veille à harmoniser les concentrations pour l'ensemble des pays européens.

3.2.1. Historique

Les concentrations critiques étaient initialement fixées en se référant aux diagrammes de distribution des CMI des bactéries par rapport aux résultats des antibiogrammes obtenus. Ces diagrammes permettaient de diviser la population en deux, une population plus sensible à l'antibiotique testé et une seconde pour laquelle la sensibilité était moindre. La concentration critique était fixée de façon à séparer ces deux populations. Cette méthodologie se rapproche de l'approche microbiologique pour la fixation des concentrations critiques qui est détaillée ci-dessous.

3.2.2. Approche microbiologique : concentrations critiques « épidémiologiques » ou cut-off épidémiologiques ou ECOFF

Le cut-off épidémiologique (ECOFF) permet de séparer, pour une espèce donnée et un antibiotique donné, les souches qui ne possèdent pas de mécanismes de résistance exprimés naturellement (souches sauvages) de celles qui possèdent des mécanismes acquis de résistance. Il s'agit donc, au sein d'une espèce, de la CMI la plus élevée d'organismes dépourvus de mécanisme de résistance exprimée naturellement. Il est néanmoins nécessaire d'apporter une nuance à ce concept, les souches sans mécanisme de résistance pour un antibiotique donné ne seront pas nécessairement sensibles à cet antibiotique et les souches présentant un mécanisme de résistance pour un antibiotique donné ne seront pas systématiquement catégorisées comme résistantes.

Afin d'établir ces concentrations critiques épidémiologiques, il est nécessaire de mesurer les CMI pour un antibiotique donné sur plusieurs milliers voire plusieurs dizaines de milliers de souches sauvages. Cette mission est celle de l'EUCAST qui recueille, à partir de différentes sources (études nationales, internationales, programmes de surveillance, industrie pharmaceutique, laboratoires individuels, etc.), les informations qui permettront de fixer cette concentration critique. Ce grand nombre de mesures permet de mettre en évidence d'éventuels changements dans les populations bactériennes ou d'identifier l'émergence de résistances. L'ensemble des données sont disponibles sur le site de l'EUCAST sous forme de tableaux ou de diagrammes en bâtons (figures 10 et 11). La répartition des CMI des souches sauvages est représentée en bleu sur ces diagrammes.

Une telle approche ne tient pas compte d'éventuelles considérations cliniques.

Amikacin / Escherichia coli
International MIC Distribution - Reference Database 2020-02-27

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

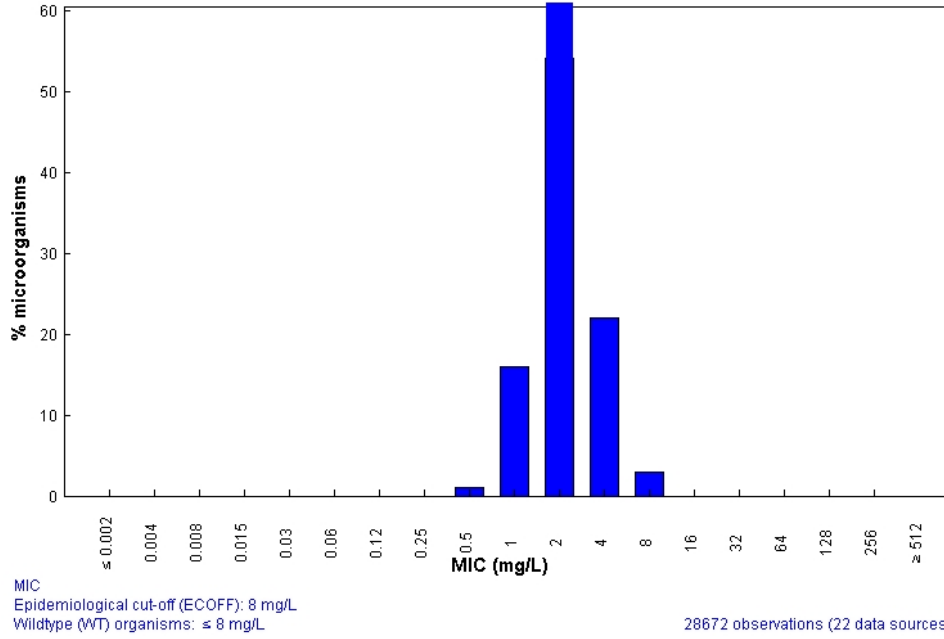


Figure 10 : Distribution des CMI à l'amikacine pour 28672 souches d'Escherichia coli
 Cut off épidémiologique : 8 mg/L.

Ciprofloxacin / Klebsiella pneumoniae
International MIC Distribution - Reference Database 2020-02-27

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

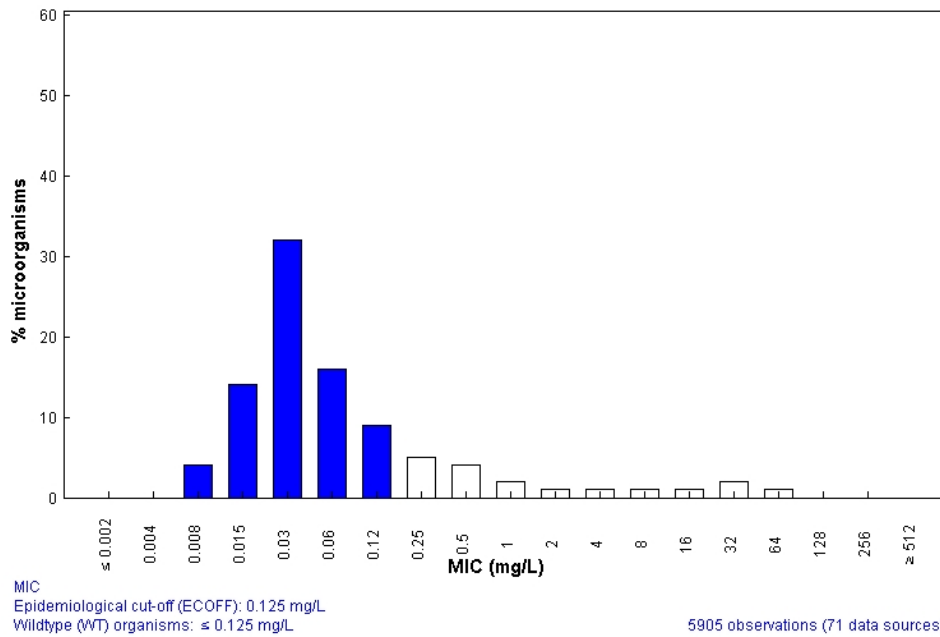


Figure 11 : Distribution des CMI de la ciprofloxacine pour 5905 souches de Klebsiella pneumoniae
 Cut off épidémiologique : 0,12 mg/L.

3.2.3. Approche clinique : concentrations critiques cliniques ou « clinical breakpoints »

Ces concentrations critiques cliniques vont permettre de statuer sur l'activité d'un antibiotique vis-à-vis d'un pathogène, permettant de catégoriser la souche testée comme sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R). Ces concentrations critiques sont comparées aux CMI obtenues *in vitro*.

Il est nécessaire de prendre en compte différentes données et de trouver un équilibre entre ces différentes notions afin de définir une concentration critique clinique (16) :

- La distribution des CMI des germes (concentrations critiques épidémiologiques) : la concentration critique clinique ne sera jamais inférieure à la concentration clinique épidémiologique. D'ailleurs, plus la concentration critique clinique est éloignée de la concentration critique épidémiologique, plus les souches sensibles seront aisément identifiées par rapport aux souches résistantes.
- Les indications de l'antibiotique.
- La posologie et les propriétés pharmacodynamiques/pharmacocinétiques (PK/PD) de l'antimicrobien : les études *in vitro* ou chez l'animal permettent de définir les paramètres permettant d'obtenir une efficacité sur la souche pour une posologie donnée. Les paramètres les plus étudiés sont :
 - Le temps pendant lequel les concentrations sériques sont supérieures à la CMI ($t > CMI$) ;
 - L'aire sous la courbe (AUC) ;
 - Le pic sérique ou la concentration résiduelle sérique.

En fonction des antibiotiques, les paramètres à prendre en compte sont différents. Les concentrations critiques sont donc modifiées en fonction des différents schémas thérapeutiques utilisés, parfois différents d'un pays à l'autre, pouvant expliquer les différences de concentrations critiques entre les pays.

- La toxicité de l'antimicrobien, en particulier si celui-ci a une toxicité concentration dépendante.
- Les études cliniques, en s'intéressant à la fois aux résultats cliniques (succès/échec) mais aussi aux résultats microbiologiques. Une analyse des CMI des pathogènes mis en cause dans les études sera si possible réalisée.

Bien que peu nombreuses, ces études permettent de confirmer ou d'affiner les concentrations critiques préétablies sur la base d'autres critères.

Même si pour la plupart des antibiotiques, il n'existe qu'une seule concentration critique quel que soit le site de l'infection, les concentrations critiques peuvent également être modifiées en fonction du site de l'infection à traiter. En effet, la diffusion dans le liquide céphalo-rachidien ou dans les urines est très souvent différente de la pénétration dans d'autres tissus. Par conséquent, il est intéressant de pouvoir établir des concentrations critiques en fonction du site à traiter. Par exemple, pour l'amoxicilline – acide clavulanique dans le traitement des infections urinaires basses, la concentration dans les urines de l'antibiotique permet d'augmenter les concentrations critiques et par conséquent le diamètre critique (tableau 2).

Tableau 2 : D'après le CA-SFM, concentrations et diamètres critiques de l'amoxicilline – acide clavulanique pour les Enterobacterales

| | Concentrations critiques (mg/L) | | Diamètres critiques (mm) | |
|--|------------------------------------|-----|-----------------------------|-----|
| | S ≤ | R > | S ≥ | R < |
| Amoxicilline - acide clavulanique | 8 | 8 | 14 | 14 |
| Amoxicilline - acide clavulanique (cystite) | 32 | 32 | 16 | 16 |

Aucune formule ne permet d'établir ces concentrations critiques, elles sont donc fixées par consensus entre les membres d'un comité national ou international. C'est la raison pour laquelle, il existe des concentrations critiques différentes en fonction des pays pour certains antibiotiques (figure 12).

| Country | MIC (mg/L) | |
|-----------------------------|------------|-----|
| | S | R |
| Belgium [15] | ≤16 | ≥32 |
| UK, systemic infection [60] | ≤8 | >8 |
| UK, uncomplicated UTI [60] | ≤32 | >32 |
| France [61] | ≤8 | >8 |

S sensible strain, *R* resistant strain, *UTI* urinary tract infection

Figure 12 : D'après Alexandre et al (44), concentrations critiques pour la témocilline en fonction des différents pays européens

3.2.4. Catégorisation en l'absence de concentrations critiques cliniques

Lorsqu'il s'agit d'antibiotiques anciens qui ont été remplacés par des antibiotiques de même classe avec un avantage certain (spectre plus important, toxicité diminuée, etc.) ou lorsqu'il s'agit de pathogènes rarement identifiés, bien souvent, il n'existe pas de concentration critique. Différentes stratégies peuvent alors être envisagées :

- L'utilisation des concentrations critiques PK/PD qui sont disponibles dans les recommandations émises par le CA-SFM/EUCAST (figure 13). Si la CMI mesurée est inférieure ou égale à la concentration critique PK/PD, l'antimicrobien pourra être utilisé avec prudence. Dans le cas contraire, son utilisation devra être fortement déconseillée. Ces concentrations critiques PK/PD ne prennent pas en compte l'espèce bactérienne et d'éventuels mécanismes de résistance naturels ou acquis.

| Aminoglycosides | Concentrations critiques (mg/L) | | Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles la CMI mesurée est supérieure à la concentration critique basse et inférieure ou égale à la concentration critique haute. La probabilité de succès thérapeutique est forte uniquement dans le cas d'un traitement par voie systémique avec une posologie forte, telles celles qui sont présentées dans l'annexe 6, ou lorsque l'antibiotique se concentre au site de l'infection. Pour une information complète des prescripteurs, cette catégorie intermédiaire peut devenir « sensible à forte posologie ». Consulter également l'annexe 5 Si la mesure des CMI pose des difficultés, il est encore possible de se référer aux diamètres critiques non reliés à une espèce proposée dans le CASFM 2013 (inoculum et charge de disques CASFM 2013). Cependant dans les infections sévères la mesure de la CMI est recommandée. |
|-----------------|---------------------------------|-----|---|
| | S ≤ | R > | |
| Amikacine | 8 | 16 | |
| Gentamicine | 2 | 4 | |
| Netilmicine | 2 | 4 | |
| Tobramycine | 2 | 4 | |

Figure 13 : D'après le CA-SFM (34), exemple de concentrations critiques PK/PD

- Lorsque les concentrations critiques PK/PD ne sont pas disponibles, il est alors nécessaire de se reporter aux concentrations critiques épidémiologiques (ECOFF). La CMI mesurée doit être comparée à la distribution des CMI de l'espèce concernée. Lorsque la CMI est inférieure à la concentration critique épidémiologique, l'antibiotique pourra être utilisé avec prudence. Il est également possible de comparer la valeur obtenue par rapport à d'autres espèces proches. Lorsque la CMI obtenue n'appartient pas à la distribution des valeurs de CMI du phénotype sauvage, il existe alors un ou plusieurs mécanismes de résistance et il convient de ne pas utiliser cet antibiotique.

3.2.5. Imprécision du diamètre mesuré

Compte tenu de l'ensemble des points évoqués ci-dessus, il est important de noter que la mesure du diamètre obtenue est sujette à une importante variabilité technique. Si une multitude de mesures est réalisée pour un couple bactérie/antibiotique, les valeurs de diamètres obtenus vont généralement se répartir à plus ou moins 2 mm autour d'une valeur moyenne. Si ces données sont traduites en histogramme de répartition de ces n diamètres mesurés, l'amplitude à la base sera donc de 4 mm. Cela implique que plus le diamètre mesuré est proche du diamètre critique, plus le risque qu'une erreur de catégorisation survienne est important (figure 14).

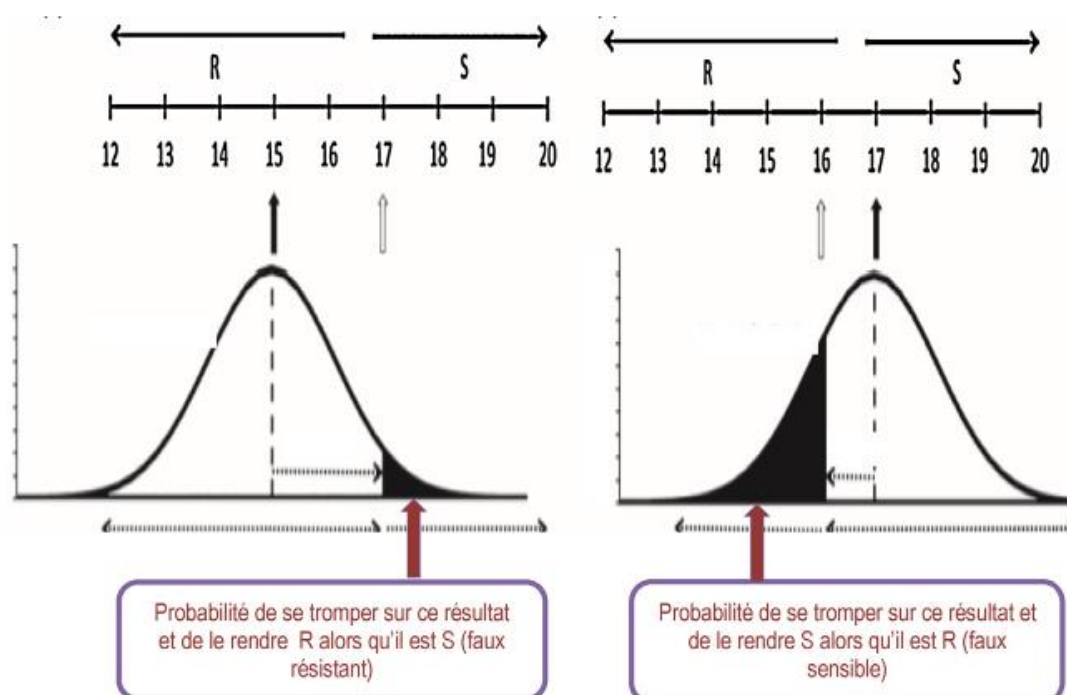


Figure 14 : D'après Jehl et al (16), imprécision du diamètre mesuré - Sur la figure de gauche, la valeur du diamètre obtenu est de 15 mm. Le diamètre critique est de 17 mm, il existe une probabilité, certes faible, de catégoriser la souche comme sensible alors qu'elle est en réalité résistante. A droite, le diamètre mesuré est de 17 mm et le diamètre critique de 16 mm. La probabilité, en noir, de rendre un résultat erroné est plus importante que précédemment.

3.2.6. Incertitude de mesure : zone d'incertitude technique

C'est en 2019 que l'EUCAST a introduit la notion d'incertitude de mesure pour l'antibiogramme sous le nom de « Area of Technical Uncertainty » (ATU) ou zone d'incertitude technique (ZIT). Son introduction fait suite à la modification de la définition de la catégorisation intermédiaire qui incluait initialement l'incertitude technique et qui

ne l'inclut plus dans la nouvelle définition « sensible à forte posologie ». L'EUCAST a donc identifié les situations où une incertitude importante sur la mesure est présente et créé ces ZIT. Cet avertissement s'adresse uniquement aux laboratoires pour qu'ils puissent mettre en œuvre une stratégie visant à vérifier le résultat de son antibiogramme et/ou signaler si besoin au clinicien qu'il existe une incertitude sur le résultat.

Il existe quelques situations pour lesquelles la catégorisation S, I ou R est peu fiable et nécessite de tenir compte de l'incertitude technique. Ces ZIT correspondent à une ou plusieurs valeurs de CMI ou à un intervalle de diamètre (45). Les trois principales situations dans lesquelles le laboratoire peut être confronté à une incertitude sur le résultat sont :

- La valeur de la concentration critique coupe la distribution de la population sauvage.

C'est le cas du couple Enterobacterales/pipéracilline – tazobactam. La distribution des CMI pour les souches sauvages de la plupart des Enterobacterales se termine à 8 mg/L. Les concentrations critiques pour l'association pipéracilline – tazobactam sont de 8 et 16 mg/L. Or, la reproductibilité des mesures (CMI et diamètre) est faible dans la zone critique de 16 mg/L (figure 15).

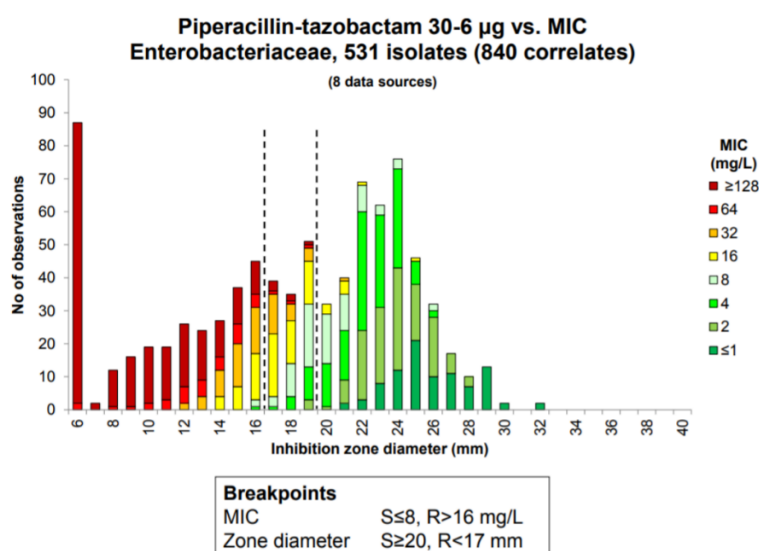


Figure 15 : Corrélation CMI/diamètre pour l'association piperacilline–tazobactam chez les Enterobacterales

Pour des diamètres mesurés entre 17 et 19 mm, les valeurs des CMI correspondantes varient de 2 à plus de 128 mg/L

- La valeur de la concentration critique clive une population résistante ou alors les populations sauvage et résistante sont contiguës voire superposées.
- Il existe des problèmes de lecture évidents et inévitables.

Le principe de base de ces zones d'incertitude technique est le même quelles que soient les méthodes utilisées, cependant ces ZIT peuvent être retrouvées pour une méthode et pas pour une autre. Il est alors nécessaire que le laboratoire définisse une conduite à tenir adéquate lorsque le résultat obtenu se situe dans cette zone d'incertitude technique. Il ne sera pas nécessaire de répéter le test si une erreur technique est suspectée. Si besoin, des tests complémentaires pourront être réalisés comme la recherche d'un mécanisme de résistance (détection des gènes de résistance par exemple). Par ailleurs, la mesure de la CMI pourra être intéressante dans le cadre des infections sévères ou lorsqu'il n'y a pas d'autres alternatives thérapeutiques mais cette mesure sera également soumise à une incertitude de mesure. Enfin, rétrograder le résultat de S vers I ou de I vers R peut être une solution afin de minimiser le risque d'échec chez le patient mais c'est également une perte de chance pour ce dernier, en particulier s'il n'existe pas d'autre alternative thérapeutique.

Ces nombreuses avancées se sont faites conjointement à la mise en place de l'accréditation au sein des laboratoires de biologie médicale et *de facto* des laboratoires de bactériologie.

4. Maîtrise de la qualité selon la norme NF EN ISO 15189

4.1. Processus d'accréditation

Il est obligatoire pour tous les laboratoires de biologie médicale de participer au processus d'accréditation sur l'ensemble de son activité selon la norme européenne ISO 15189 (46). L'accréditation est délivrée par le COmité FRançais d'ACcréditation (COFRAC), initialement pour une durée de quatre ans puis par périodes de cinq ans au maximum. Pendant le premier cycle d'accréditation, des évaluations sur site réalisées annuellement permettent la surveillance de l'accréditation. Ensuite, pour les cycles suivants, ces visites sont espacées de 18 mois (figure 16).

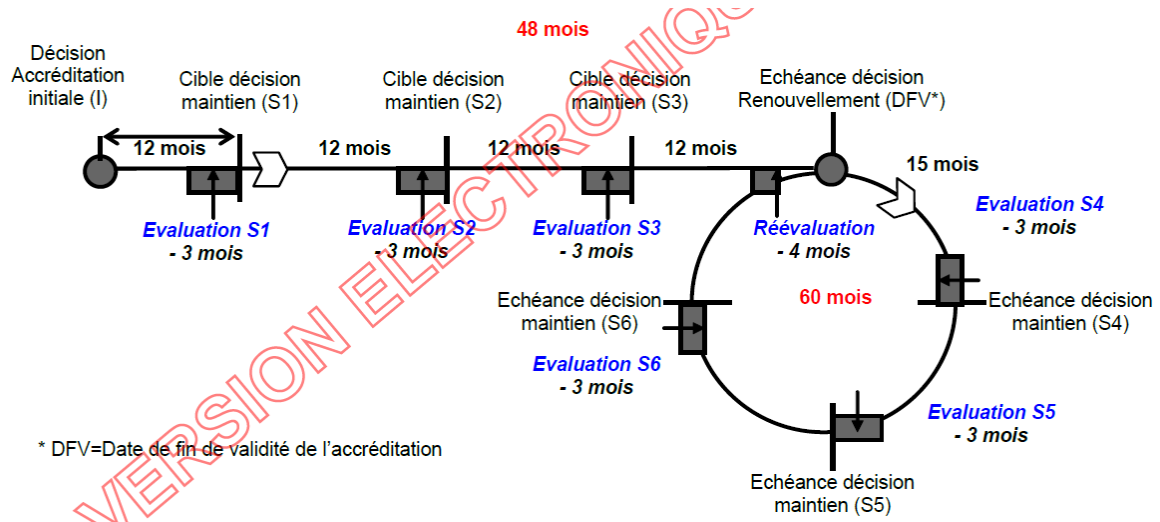


Figure 16 : Cycle de vie d'une accréditation en biologie médicale d'après le SH REF 05(47)

4.2. Vérification/validation de méthodes

La vérification ou la validation de méthodes a pour but de prouver, dans les conditions opératoires du laboratoire, que la méthode donne des résultats fiables pour les patients. Pour ce faire, il est nécessaire d'apporter des preuves de la performance de la méthode. Cette étape de vérification/validation de méthodes est réalisée avant la mise en place d'une nouvelle méthode. Différentes étapes sont nécessaires pour vérifier ou valider une méthode :

- L'étude bibliographique : elle permet de réunir les informations essentielles (analyte, matrice, principe de mesure, type d'échantillons, prétraitement, méthode, intervalles de référence, etc.) et de définir les critères attendus de performance et les limites d'acceptabilité.
Pour l'antibiogramme par diffusion, les principales recommandations sont émises par le CA-SFM/EUCAST et sont mises à jour régulièrement.
- L'évaluation des performances de la méthode : les différents essais sont à réaliser selon le type de portée choisi (A ou B) mais également en fonction du caractère qualitatif ou quantitatif de la méthode. Les différents essais à vérifier sont résumés dans la figure 17. Si le laboratoire choisi de ne pas effectuer un essai, il devra argumenter ce choix.

Figure 17 : Critères de performance à évaluer selon SH-GTA-04
 Pour l'antibiogramme par diffusion, les essais à réaliser sont encadrés en rouge

| CRITERES A EVALUER | Vérification (portée A) | | Validation (portée B) | |
|---|--|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| | Méthode quantitative | Méthode qualitative | Méthode quantitative | Méthode qualitative |
| Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) | Essai | Essai | Essai | Essai |
| Justesse/exactitude (approche) | Essai | Essai | Essai | Essai |
| Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation | Essai | Maîtrise des facteurs de variabilité | Essai | Maîtrise des facteurs de variabilité |
| Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir ⁹ , EBMD) et analyse des discordances ¹⁰ | Essai | Essai | Essai | Essai |
| Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité) | Bibliographie | / | Essai | / |
| Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...) | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Contamination entre échantillons (s'il y a lieu) | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Robustesse | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués) | Bibliographie | Bibliographie | Essai | Essai |
| Intervalle de référence (valeurs usuelles) | Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art) | Bibliographie | Essai | Essai |
| Limite de détection | / | Bibliographie | / | Essai |
| Spécificité/sensibilité analytique | / | Bibliographie | / | Essai |
| Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude¹¹ de la méthode ou du système analytique. | | | | |

Pour l'antibiogramme par diffusion, le comité qualité de la Société Française de Microbiologie (QUAMIC) (48) publie dans ses recommandations les différents essais à réaliser, les performances attendues ainsi que les justifications nécessaires quand les essais n'ont pas lieu d'être.

- L'étude de la maîtrise des risques : l'analyse des risques a pour but d'identifier les étapes critiques pour mettre en place les moyens de maîtriser ces risques. En ce qui concerne l'antibiogramme par diffusion, plusieurs paramètres sont à maîtriser car sources de variabilité.

Ces différentes sources de variabilité peuvent être classées en cinq catégories selon la méthode des « 5M » : matière, matériel, méthode, main d'œuvre et

milieu. Elles peuvent également être résumées sur un diagramme de causes et effets d'Ishikawa.

En se référant au document SH Form 43 (49) émis par le COFRAC, l'ensemble des informations, les résultats des essais et les moyens de maîtrise des risques sont collectés au sein d'un même document. Enfin, si les résultats de l'évaluation sont en accord avec les limites d'acceptabilité initialement fixées, le biologiste médical autorisera la méthode. Après cette vérification ou validation initiale, un suivi des performances dans le temps est obligatoire par le passage de CIQ et l'étude à moyen et long terme des résultats de ces derniers. L'adhésion à un programme d'Évaluations Externes de Qualité (EEQ), l'exploitation des résultats d'EEQ et la révision des incertitudes de mesure permettront également de suivre les performances de la méthode.

Objectifs

L'objectif de ce travail est de mettre en place une méthode automatisée pour la réalisation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé. L'automatisation sera permise grâce à deux automates utilisés successivement, l'ensemencement PreLUD® et le lecteur SIRScan 2000 Automatic®, développés par la société I2a.

Cette automatisation permettra de réaliser les antibiogrammes à partir de cultures bactériennes ou à partir de flacons d'hémoculture positifs. La méthode manuelle de réalisation des antibiogrammes par diffusion est une méthode accréditée depuis 2014 au laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen. La réalisation d'antibiogrammes directement à partir des fioles d'hémoculture est une méthode également validée par le laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen depuis plusieurs années (21) et maintenant validée par le CA-SFM et l'EUCAST. Cette méthode permet d'obtenir des résultats d'antibiogrammes le lendemain de leur réalisation avant même l'identification du germe. Le choix des antibiotiques testés est uniquement conditionné par le résultat de la coloration de Gram effectuée à partir de la fiole d'hémoculture (bacilles à Gram négatif (BGN), cocci à Gram positif évoquant un staphylocoque ou un streptocoque/entérocoque). Cela permet ainsi d'adapter un éventuel traitement antibiotique avec environ 24 heures d'avance sur la méthode conventionnelle qui nécessitait la mise en culture de la bactérie à partir de la fiole d'hémoculture à J0, son

identification à J1 puis l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques à J2. Il est nécessaire d'adapter cette méthode afin de l'automatiser en particulier en utilisant des consommables compatibles avec l'automate PreLUD®.

Afin que ces méthodes puissent être validées, un dossier de validation de méthode a été établi. Les différents essais effectués sont résumés dans le tableau 3. Ces essais sont complémentaires afin de permettre la validation d'une seule méthode automatisée pour la réalisation des antibiogrammes par diffusion.

Tableau 3 : Essais à réaliser pour valider la méthode : antibiogramme automatisé par diffusion en milieu gélosé

| Antibiogramme automatisé par diffusion en milieu gélosé | |
|--|--|
| Référentiels: CA SFM EUCAST 2019 QUAMIC 2019 | Modalités de vérification : |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude |
| | <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique |
| | <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes |
| | <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences |
| | <input type="checkbox"/> 11. Contamination |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs |
| | <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence |

Matériels et méthodes

1. Présentation des méthodes à valider

L'automatisation du processus de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé au CHU de Rouen implique, comme nous l'avons introduit précédemment, la réalisation d'un seul dossier de validation de méthode avec l'utilisation de deux types d'échantillons pour la réalisation de l'inoculum (figure 18) préparés manuellement :

- A partir de colonies isolées en utilisant le dispositif Inoclic® ;
- A partir de fioles d'hémoculture positives.

Les autres étapes de réalisation de l'antibiogramme sont automatisées que ce soit l'ensemencement, le dépôt des disques et la lecture des boîtes après incubation.

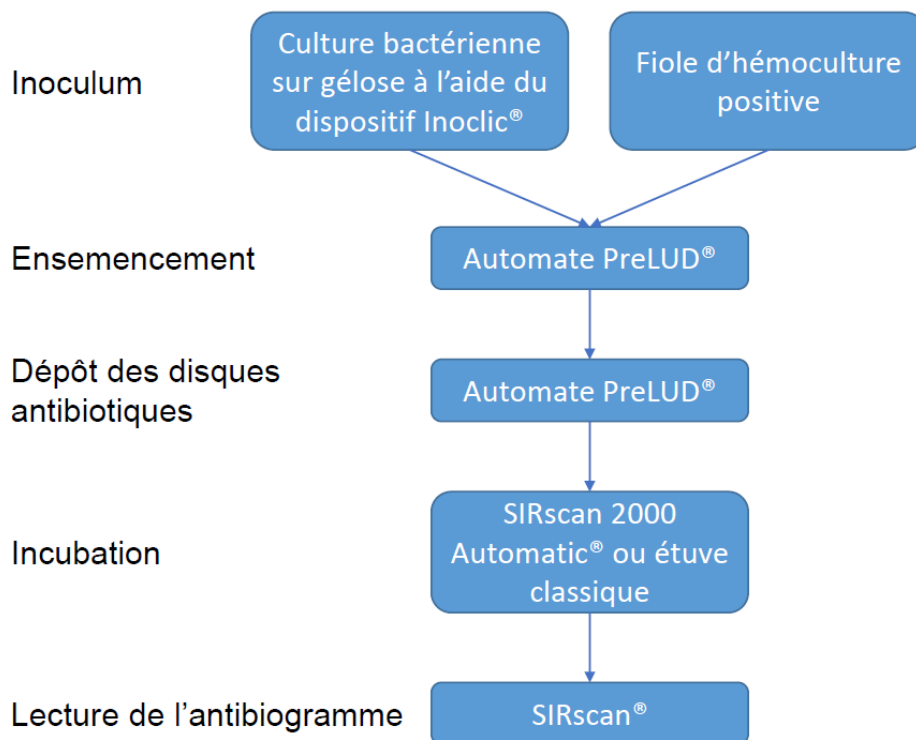


Figure 18 : Présentation des étapes de la méthode à valider

2. Adaptation de la méthode de réalisation des antibiogrammes à partir de fioles d'hémoculture positives

Au CHU de Rouen, la méthode pour la réalisation d'antibiogrammes directement à partir des fioles d'hémoculture consiste à verser 5 ou 15 gouttes d'hémoculture selon

l'espèce bactérienne dans une ampoule de 2 mL d'eau physiologique (Biomérieux NaCl 0,9% ref 20070 - ampoule 2 mL). La suspension est ensuite écouvillonnée selon la méthode recommandée sur une gélose MH ou MH-F en fonction du résultat de l'examen direct.

L'automate PreLUD® prenant uniquement en charge des consommables spécifiques, les ampoules précédemment utilisées par le laboratoire ne sont pas utilisables, il a donc fallu adapter la méthode afin d'automatiser ce processus. Pour cela nous avons utilisé les tubes Inoclic® contenant 0,7 mL d'eau physiologique et réévalué le rapport nombre optimal de gouttes/volume d'eau physiologique pour l'obtention d'un inoculum permettant la réalisation d'antibiogrammes directement à partir de fioles d'hémoculture.

Afin d'adapter cette méthode sur l'automate PreLUD®, nous avons travaillé à l'aide de souches de référence *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. pneumoniae* ATCC 49619 et *S. aureus* ATCC 29213. Des fioles d'hémoculture ont étéensemencées avec ces souches en utilisant un inoculum calibré. Les fiolesensemencées sont ensuite incubées dans l'automate d'incubation des hémocultures BD BACTEC™ FX. Une fois les fioles détectées positives, nous avons déterminé le rapport optimal nombre de gouttes/volume d'eau physiologique pour la réalisation des antibiogrammes. Pour les bacilles à Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) et le *S. aureus* ATCC 29213, nous avons donc réalisé trois antibiogrammes, un selon la méthode déjà validée au laboratoire et deux antibiogrammes en utilisant deux dilutions différentes (tableau 4) :

- 2 gouttes de suspension bactérienne dans 0,7 mL ;
- 3 gouttes de suspension bactérienne dans 0,7 mL.

Pour les souches ATCC *S. pneumoniae* et *E. faecalis*, nous avons également réalisé trois antibiogrammes, un selon la méthode du laboratoire et deux en réalisant les dilutions suivantes (tableau 4) :

- 6 gouttes de suspension bactérienne dans 0,7 mL ;
- 7 gouttes de suspension bactérienne dans 0,7 mL.

Tableau 4 : Inoculum en nombre de gouttes/volume en fonction des méthodes

| Bactérie | Méthode du laboratoire Ampoule de 2 mL | Méthode à adapter Inoclic® – tube 0,7 mL | Gélose | Incubation |
|--|---|---|---------------|---|
| <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> | 5 gouttes d'hémoculture | 2 et 3 gouttes d'hémoculture | MH | 20 ± 4 heures 35 ± 2°C |
| <i>S. aureus</i> | | | | |
| <i>S. pneumoniae</i> <i>E. faecalis</i> | 15 gouttes d'hémoculture | 6 et 7 gouttes d'hémoculture | MH ou MH-F | 20 ± 4 heures 35 ± 2°C + 5% CO ₂ |

Après incubation, les diamètres d'inhibition des souches autour des différents disques d'antibiotiques ont été mesurés et comparés aux valeurs de référence attendues par le CA-SFM pour chaque souche contrôle.

Parallèlement à chaque antibiogramme, une gélose supplémentaire a été réalisée afin de déterminer la densité des inocula produits à l'aide d'un abaque.

3. Essais à réaliser dans le cadre de la validation des performances de la méthode

3.1. Fidélité

Afin de tester les performances de l'automate PreLUD® et d'évaluer la répétabilité, dix antibiogrammes ont été réalisés par l'automate à partir d'une même suspension, réalisée à partir de fioles d'hémoculture positives pour 5 souches *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 et *S. pneumoniae* ATCC 49619. Après 20 ± 4 heures d'incubation, les diamètres ont été relevés à l'aide d'un pied à coulisse. Des coefficients de variation de répétabilité ont été calculés pour chaque couple bactérie/antibiotique. Les performances attendues étaient les suivantes :

- Pas plus d'un test sur 20 en dehors des bornes fixées par le CA-SFM ;
- Coefficient de variation (CV) < 10%.

3.2. Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

Pour l'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) nous avons décidé de faire varier le paramètre « opérateur » pour la réalisation manuelle de

l'inoculum (une des étapes les plus à risque de variabilité). A partir des mêmes souches de référence, différents techniciens ont réalisé un antibiogramme avec un inoculum en méthode Inoclic®. Après 20 heures d'incubation, les diamètres ont été relevés à l'aide d'un pied à coulisse. Des coefficients de variation de reproductibilité ont été calculés pour chaque couple bactérie/antibiotique. Les performances attendues étaient les suivantes :

- Pas plus d'un test sur 20 en dehors des bornes fixées par le CA-SFM ;
- CV < 10%.

3.3. Exactitude

Le laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen est adhérent à différents programmes d'EEQ, notamment auprès du Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique (CTCB) et d'AGLAE. Il est prévu que les antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé soient réalisés selon la méthode manuelle et la méthode automatisée afin d'évaluer l'exactitude de cette dernière. Jusqu'alors, le laboratoire a toujours obtenu la note A pour l'ensemble des programmes d'EEQ pour lesquels un antibiogramme par diffusion était à réaliser.

3.4. Robustesse

La robustesse d'une méthode est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. Pour ces tests nous avons évalué la stabilité de l'inoculum au cours du temps et celles des disques pour les cartouches stockées sur l'automate.

3.4.1. Essai de stabilité de l'inoculum

Selon le CA-SFM, la suspension bactérienne doit idéalement être employée dans les 15 minutes qui suivent sa préparation et au plus tard dans les 60 minutes. Afin que l'automate PreLUD® puisse être utilisé de façon optimale et faire face à d'éventuels imprévus (pannes), il est nécessaire que nous puissions nous assurer de la stabilité de l'inoculum sur une période plus longue que 60 minutes.

Nous avons donc réalisé une suspension bactérienne à partir des souches de référence *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619 et *S. aureus* ATCC 29213 et dénombré celle-ci en UFC/mL à $t = 0, 60$ et 120 min.

Pour le dénombrement, la suspension de densité $0,5\text{McF}$ a été diluée au $1/1000^{\text{ème}}$ afin d'obtenir une suspension (D1). Cette suspension D1 a été diluée au $1/100^{\text{ème}}$ (suspension D2) puis diluée au $1/10^{\text{ème}}$ afin d'obtenir une suspension d'environ 10^2 UFC/mL (suspension D3). Cent microlitres des suspensions D2 et D3 ont ensuite été ensemencés au râteau. Après 24 heures d'incubation, les colonies ont été comptées et la valeur exacte de la densité bactérienne de chaque suspension a pu être calculée. Ces étapes ont été répétées à $t = 60$ min et 120 min.

A $t = 0$ min et 120 min, un antibiogramme par diffusion a été réalisé. Les diamètres obtenus à ces différents temps ont été comparés aux diamètres de référence donnés par le CA-SFM.

3.4.2. Durée de stabilité des cartouches antibiotiques

La stabilité des réactifs utilisés et en particulier des cartouches contenant les disques imprégnés d'antibiotiques a été étudiée tout au long de la phase de validation de méthode. Les cartouches ont été insérées dans la roue de stockage présente dans l'automate (voir figure 3). Ces cartouches sont restées à bord à température ambiante tout au long des essais de validation de méthodes et ont été changées lorsqu'elles étaient vides ou périmées. Une éventuelle altération des réactifs à bord sera visible sur les résultats obtenus lors des tests. La durée totale des tests a été de 20 jours.

3.5. Comparaisons de méthodes

La comparaison de méthodes a pour but de montrer l'équivalence des différentes méthodes de réalisation d'un antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé.

3.5.1. Comparaison de la méthode automatisée à la méthode manuelle à partir d'une culture pure

Nous avons comparé les méthodes suivantes :

- La méthode dite automatisée : inoculum réalisé à l'aide du dispositif Inoclic®, ensemencement en spirale par l'automate PreLUD®, dépôt des disques et lecture automatisée par le SIRscan® après incubation ;
- La méthode manuelle déjà vérifiée et accréditée depuis 2014 au laboratoire : inoculum calibré à 0,5 McF réalisé à l'aide d'un néphélomètre, écouvillonnage manuel, dépôt des disques par distributeur manuel et lecture manuelle à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle.

Au total, notre étude a porté sur 95 souches bactériennes. Nous avons comparé les antibiogrammes obtenus par les 2 méthodes :

- 30 souches d'entérobactéries avec différents mécanismes de résistance dont 8 sécrétrices d'une BLSE.
- 19 souches de staphylocoques :
 - 7 souches de *S. aureus* dont 3 résistants à la méticilline (SARM) ;
 - 12 souches de staphylocoques à coagulase négative dont 4 résistantes à la méticilline.
- 18 souches de *Pseudomonas* et de bacilles à Gram négatif non fermentants : 8 sauvages et 10 présentant divers mécanismes de résistance.
- 15 souches d'entérocoques.
- 9 souches de streptocoques dont 3 souches de *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée aux β – lactamines.
- 1 souche de *Pasteurella multocida*.

3.5.2. Antibiogrammes à partir de fioles d'hémoculture positives

Nous avons réalisé quotidiennement des antibiogrammes à partir des flacons d'hémoculture positifs selon la méthode précédemment utilisée au laboratoire et la méthode utilisant le tube Inoclic® de 0,7 mL nouvellement adaptée sur l'automate PreLUD®. Nous avons comparé la façon de réaliser l'inoculum uniquement. Les suspensions obtenues sont ensuite ensemencées manuellement, les antibiogrammes sont pastillés, incubés et lus manuellement.

Les souches cliniques étudiées étaient : 11 entérobactéries, 3 *P. aeruginosa*, 19 *Staphylococcus* dont 4 *S. aureus*, 3 *Enterococcus* et 4 *Streptococcus*.

3.5.3. Comparaison des méthodes de lecture

Enfin, afin d'évaluer la lecture des antibiogrammes sur l'automate SIRscan®, nous avons également réalisé une comparaison des méthodes de lecture. Nous avons donc comparé la lecture automatisée par l'automate SIRscan® (caméra) à la lecture manuelle (pied à coulisse) des antibiogrammes ensemencés par l'automate PreLUD®. Cette comparaison a été réalisée dans le même temps que la comparaison de la méthode automatisée et la méthode manuelle.

Pour l'ensemble de ces comparaisons de méthodes, les résultats sont exprimés en pourcentage de concordance S, I ou R pour chaque couple bactérie/antibiotique.

En cas de discordances, celles-ci sont catégorisées selon la méthode proposée par le QUAMIC 2019 (48) et comptabilisées :

- Discordance mineure (dm) ou Minor Error (mE) : souche résistante (R) ou sensible (S) rendue à tort intermédiaire (I) ou inversement.
- Discordance majeure (DM) ou Major Error (ME) : souche rendue résistante (R) alors qu'elle est en réalité sensible (S). Ce type de discordance n'expose pas le patient à un échec thérapeutique mais l'empêche de bénéficier d'un traitement par la molécule rendue à tort résistante.
- Discordance très majeure ou Very Major Error (VME) : souche catégorisée comme sensible (S) alors qu'elle est en réalité résistante (R). Ce type de discordance expose le patient à un échec thérapeutique.

La valeur attendue concernant la concordance totale est supérieure à 95%. Outre la concordance totale, le taux de VME devra être inférieur à 1%, le taux de ME inférieur à 5% et le taux de mE inférieur à 10%.

3.6. Analyse des risques

Une analyse des risques a été réalisée selon une approche par processus : pré-analytique, analytique et post-analytique. Pour chaque processus, les différents dangers, leurs causes, les éléments à maîtriser et les moyens de maîtrise sont

identifiés. En fonction de la fréquence, la gravité et la détectabilité de chaque point critique, un score de criticité est établi. Une étude bibliographique, ainsi qu'une analyse des risques selon la méthode des 5M ont été réalisées et présentées sous la forme d'un diagramme d'Ishikawa.

4. Analyse de l'activité des PreLUD® préalablement à la mise en place de la méthode automatisée

Une fois la méthode automatisée mise au point et validée, il sera nécessaire de réorganiser le travail sur les deux automates PreLUD® du laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen et d'optimiser le taux d'occupation de ces derniers. Seul un des deux automates est équipé de façon à réaliser les antibiogrammes par diffusion.

Nous avons donc réalisé une étude de flux via une extraction complète de l'activité des automates sur 7 jours ouvrables. Les heures de mise en route et d'arrêt des automates ainsi que toutes les périodes d'inactivité de plus de 10 minutes ont été relevées. Sur la même période, nous avons compté le nombre et le type d'antibiogrammes par diffusion réalisés. L'ensemble de ces données ont été analysées afin d'envisager une réorganisation des tâches sur chaque ensementeur et optimiser leur rendement. Une réflexion concernant d'éventuels postes techniques à réaffecter a également été menée.

Résultats

1. Adaptation de la méthode des antibiogrammes à partir de fioles d'hémoculture positives

L'adaptation de la réalisation de l'inoculum à partir d'une fiole d'hémoculture positive était un prérequis indispensable afin de réaliser la validation de méthode. L'objectif était d'évaluer quelle était la dilution la plus appropriée pour réaliser les antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémoculture en adaptant la méthode déjà utilisée au laboratoire.

Pour *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853, les résultats montrent que la dilution de 2 gouttes dans 0,7 mL d'eau physiologique en tube Inoclic® est celle qui donne les meilleurs résultats. Les résultats obtenus avec cette dilution sont à la fois plus proches des cibles définies par le CA-SFM et également des résultats obtenus par la dilution précédemment utilisée au laboratoire, à savoir 5 gouttes dans 2 mL d'eau physiologique.

Pour *S. aureus* 29213, la dilution précédemment utilisée au laboratoire était la même que pour les BGN (5 gouttes / 2 mL). Les résultats obtenus avec la dilution de 2 gouttes dans 0,7 mL d'eau était dans ce cas également plus proches des cibles définies par le CA-SFM et des résultats obtenus par la dilution de 5 gouttes / 2 mL.

Que ce soit pour les BGN ou les staphylocoques, la dilution de 3 gouttes dans 0,7 mL conduisait à l'obtention d'inocula trop chargés de l'ordre de 10^9 UFC/mL. En effet, en utilisant une dilution plus importante, le tapis bactérien se montre plus fin et plus homogène. La détection des synergies observées, notamment pour les souches productrices de BLSE sera alors plus aisée.

Pour les souches de *S. pneumoniae* ATCC 49619 et *E. faecalis* ATCC 29212, les dilutions testées étaient de 6 ou 7 gouttes dans 0,7 mL d'eau physiologique. Les différences de résultats en termes de diamètre sont minimales entre les trois dilutions testées (6 gouttes / 0,7 mL, 7 gouttes / 0,7 mL, 15 gouttes / 2 mL). Dans plus de 85% des cas, la différence entre les trois techniques était nulle ou de +/- 1 mm. Pour quatre couples bactérie/antibiotique, la différence était de 2 mm. L'étude de la densité de l'inoculum bactérien a montré, notamment pour *E. faecalis* ATCC 29212, que la dilution de 7 gouttes dans 0,7 mL conduisait à un inoculum trop important ayant pour

conséquence des diamètres légèrement inférieurs par rapport aux dilutions 6 gouttes / 0,7 ml et 15 gouttes / 2 mL)

Les dilutions retenues pour les tubes Inoclic® de 0,7 mL sont donc :

- Bacilles à Gram négatif : 2 gouttes ;
- Cocci à Gram positif évoquant un staphylocoque : 2 gouttes ;
- Cocci à Gram positif en diplocoques ou chaînettes : 6 gouttes.

La comparaison de méthodes sera donc réalisée pour ce type d'inoculum selon ce principe.

2. Validation des performances de la méthode

2.1. Fidélité

L'essai de répétabilité a été réalisé à partir de fioles d'hémoculture préalablement ensemencées avec des souches contrôles. Concernant la souche *E. coli* ATCC 25922, les résultats obtenus sont, pour la majorité des molécules testées, conformes aux attentes du CA-SFM. L'écart-type moyen est de 1,0 mm et le coefficient de variation moyen est de 4,0%. Les diamètres du triméthoprim et céfuroxime sont néanmoins à surveiller, les bornes supérieures obtenues étant respectivement au-dessus des attentes du CA-SFM de 1,6 mm et 0,7 mm.

Pour la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853, le résultat de la ceftazidime est à surveiller, la borne supérieure des diamètres obtenus se situe au-dessus des attentes du CA-SFM (+0,4 mm). Cet écart minime nécessitera une surveillance particulière. Tous les autres résultats sont conformes et tous les diamètres étaient compris dans les bornes attendues par le CA-SFM. L'ensemble des résultats permettent d'obtenir un écart-type moyen de 0,9 mm et un coefficient de variation moyen de 3,4%.

Pour la souche de *S. aureus* ATCC 29213, la moyenne et l'écart-type de tous les essais de répétabilité permettent d'obtenir des résultats conformes. L'écart-type moyen de tous les antibiotiques est de 0,5 mm atteignant ainsi un coefficient de variation moyen proche de 2,5%.

Pour les souches de *E. faecalis* ATCC 29212 et de *S. pneumoniae* ATCC 49619, les résultats sont conformes pour l'ensemble des molécules testées. Les moyennes de diamètre sont toutes comprises dans les bornes admises par le CA-SFM et les CV de répétabilité sont tous inférieurs à 5%.

Les résultats de l'épreuve de répétabilité résumés dans l'annexe 3 sont satisfaisants et répondent aux performances attendues.

2.2. Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

La fidélité intermédiaire a été évaluée en faisant varier le paramètre « opérateur ». Les différents opérateurs ont réalisé une suspension bactérienne puis un antibiogramme à partir de colonies des souches contrôles. Concernant les CV de reproductibilité obtenus, nous avons retenu 10% comme limite acceptable, cela correspond à un écart-type maximum de 1 mm pour un diamètre moyen de 10 mm. Les diamètres cibles et les diamètres limites sont ceux donnés par le CA-SFM (34). Les résultats sont catégorisés comme « conformes », « acceptables » ou « non conformes » en fonction des bornes obtenues (moyenne \pm 1 écart-type).

Tableau 5 : Résultats des essais de reproductibilité – *S. aureus*

| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | Diamètre cible CA- SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 10 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m \pm 1ET) | Diamètres limites CA- SFM (mm) | Conclusion |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------|--------|-------------------------|--------------------------------------|------------|
| Nom de l'ATB | | | | | | | |
| Pénicilline G | 15 | 15,1 | 0,9 | 6,25% | 14,2 - 16,0 | 12-18 | conforme |
| Cefoxitine | 27 | 26,0 | 0,6 | 2,43% | 25,4 - 26,6 | 24-30 | conforme |
| Kanamycine | | 21,2 | 1,0 | 4,62% | 20,2 - 22,2 | | |
| Tobramycine | 23 | 23,9 | 0,9 | 3,66% | 23,0 - 24,8 | 20-26 | conforme |
| Gentamicine | 22 | 22,4 | 0,8 | 3,70% | 21,6 - 23,2 | 19-25 | conforme |
| Erythromycine | 26 | 26,5 | 0,9 | 3,48% | 25,6 - 27,4 | 23-29 | conforme |
| Clindamycine | 26 | 26,7 | 1,1 | 4,12% | 25,6 - 27,8 | 23-29 | conforme |
| Quinu-Daflo | 24 | 24,9 | 0,8 | 3,34% | 24,1 - 25,7 | 21-27 | conforme |
| Norfloxacine | 21 | 21,5 | 0,8 | 3,75% | 20,7 - 22,3 | 18-24 | conforme |
| Lévofloxacine | 26 | 25,7 | 0,9 | 3,50% | 24,8 - 26,6 | 23-29 | conforme |
| Rifampicine | 33 | 32,4 | 0,9 | 2,83% | 31,5 - 33,3 | 30-36 | conforme |
| Acide fusidique | 29 | 29,9 | 0,9 | 3,07% | 29,0 - 30,8 | 26-32 | conforme |
| Cotrimoxazole | 29 | 27,6 | 0,9 | 3,32% | 26,7 - 28,5 | 26-32 | conforme |
| Furanes | 20 | 19,8 | 0,6 | 3,03% | 19,2 - 20,4 | 17-23 | conforme |
| Triméthoprime | 25 | 25,7 | 1,1 | 4,28% | 24,6 - 26,8 | 22-28 | conforme |

Pour la souche *S. aureus* ATCC 25923 (tableau 5), les résultats sont conformes pour toutes les molécules avec des moyennes de diamètre comprises dans les bornes du CA-SFM avec des écarts-types proches de 1 mm et des CV < 7%.

Tableau 6 : Résultats des essais de reproductibilité – *P. aeruginosa*

| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Diamètre cible CA-SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 10 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA- SFM (mm) | Conclusion |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------|--------|---------------------|--------------------------------------|------------|
| Nom de l'ATB | | | | | | | |
| Ticarcilline | | 22,5 | 0,7 | 3,0% | | | |
| Ticar + Ac clav | 24 | 23,7 | 0,5 | 1,9% | 23,2 - 24,2 | 20-28 | conforme |
| Pipéracilline | | 26,1 | 0,5 | 2,1% | | | |
| Pipé + Tazobactam | 26 | 24,9 | 0,5 | 2,2% | 24,4 - 25,4 | 23-29 | conforme |
| Ceftazidime | 24 | 23,5 | 0,7 | 2,9% | 22,8 - 24,2 | 21-27 | conforme |
| Céfépime | 27 | 27,6 | 0,5 | 1,8% | 27,1 - 28,1 | 24-30 | conforme |
| Aztréonam | 26 | 27,7 | 0,8 | 2,8% | 26,9 - 28,5 | 23-29 | conforme |
| Imipénème | 24 | 23,9 | 0,7 | 3,1% | 23,2 - 24,6 | 20-28 | conforme |
| Méropénème | 30 | 30,0 | 0,7 | 2,2% | 29,3 - 30,7 | 27-33 | conforme |
| Tobramycine | 23 | 25,6 | 0,5 | 1,9% | 25,1 - 26,1 | 20-26 | acceptable |
| Amikacine | 22 | 24,9 | 0,5 | 2,0% | 24,4 - 25,4 | 18-26 | conforme |
| Gentamicine | 20 | 20,5 | 0,5 | 2,4% | 20,0 - 21,0 | 17-23 | conforme |
| Lévofloxacine | 22-23 | 22,2 | 0,6 | 2,7% | 21,6 - 22,8 | 19-26 | conforme |
| Ciprofloxacine | 29 | 29,5 | 0,9 | 3,1% | 28,6 - 30,4 | 25-33 | conforme |

Pour la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (tableau 6), les résultats sont conformes pour toutes les molécules avec des moyennes de diamètre comprises dans les bornes du CA-SFM avec des écarts-types inférieurs à 1 mm et des CV < 4%. Une molécule demande une surveillance en raison d'un intervalle de valeurs (m +/- 1ET) obtenu non compris dans les limites définies par le CA-SFM pour cette souche : la tobramycine.

Tableau 7 : Résultats des essais de reproductibilité – *E. coli*

| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | Diamètre cible CA-SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 10 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA- SFM (mm) | Conclusion |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------|--------|---------------------|--------------------------------------|------------|
| Nom de l'ATB | | | | | | | |
| Ampicilline | 18-19 | 17,9 | 0,5 | 3,0% | 17,4 - 18,4 | 15-22 | conforme |
| Amox + Ac clav | 21 | 21,5 | 0,5 | 2,3% | 21,0 - 22,0 | 18-24 | conforme |
| Ticarcilline | 27 | 26,3 | 0,6 | 2,4% | 25,7 - 26,9 | 24-30 | conforme |
| Ticar + Ac clav | 27 | 26,9 | 0,5 | 2,0% | 26,4 - 27,4 | 24-30 | conforme |
| Pipéracilline | 24 | 24,7 | 0,9 | 3,6% | 23,8 - 25,6 | 21-27 | conforme |
| Pipé + tazobactam | 24 | 23,9 | 0,8 | 3,5% | 23,1 - 24,7 | 21-27 | conforme |
| Cefalexine | 18 | 17,4 | 0,7 | 3,8% | 16,7 - 18,1 | 15-21 | conforme |
| Cefoxitine | 26 | 25,1 | 0,5 | 2,1% | 24,6 - 25,6 | 23-29 | conforme |

| | | | | | | | |
|----------------|-------|------|-----|------|-------------|-------|------------|
| Cefotaxime | 28 | 29,4 | 0,5 | 1,7% | 28,9 - 29,9 | 25-31 | conforme |
| Ceftazidime | 26 | 27,9 | 0,5 | 1,9% | 27,4 - 28,4 | 23-29 | conforme |
| Céfépime | 34 | 34,5 | 0,8 | 2,3% | 33,7 - 35,3 | 31-37 | conforme |
| Aztréonam | 32 | 34,4 | 0,7 | 1,9% | 33,7 - 35,1 | 28-36 | conforme |
| Imipénème | 29 | 30,6 | 0,7 | 2,2% | 29,9 - 31,3 | 26-32 | conforme |
| Méropénème | 31 | 32,7 | 0,9 | 2,8% | 31,6 - 33,6 | 28-34 | conforme |
| Ertapénème | 32-33 | 34,1 | 0,9 | 2,8% | 33,2 - 35,0 | 29-36 | conforme |
| Gentamicine | 23 | 22,7 | 0,5 | 2,0% | 22,2 - 23,2 | 19-26 | conforme |
| Tobramycine | 22 | 22,4 | 0,7 | 3,0% | 21,7 - 23,1 | 18-26 | conforme |
| Nétilmicine | 21 | 22,5 | 0,5 | 2,2% | 22,0 - 23,0 | 18-24 | conforme |
| Amikacine | 22-23 | 23,2 | 0,6 | 2,6% | 22,6 - 23,8 | 19-26 | conforme |
| Ac nalidixique | 25 | 26,2 | 0,7 | 2,9% | 25,5 - 26,9 | 22-28 | conforme |
| Norfloxacin | 32 | 32,7 | 0,9 | 2,8% | 31,8 - 33,6 | 28-35 | conforme |
| Ofloxacin | 31 | 31 | 0,6 | 2,0% | 30,4 - 31,6 | 29-33 | conforme |
| Ciprofloxacine | 33 | 34,4 | 1,3 | 3,7% | 33,1 - 35,7 | 29-37 | conforme |
| Fosfomycine | 25-26 | 27,1 | 0,7 | 2,6% | 26,4 - 27,8 | 22-30 | conforme |
| Furanes | 20 | 22,2 | 0,4 | 1,8% | 21,8 - 22,6 | 17-23 | conforme |
| Triméthoprime | 24-25 | 27,7 | 0,6 | 2,3% | 27,1 - 28,3 | 21-28 | acceptable |
| Cotrimoxazole | 26 | 27,3 | 1,2 | 4,3% | 26,1 - 28,5 | 23-29 | Conforme |
| Céfixime | 23 | 26,3 | 0,6 | 2,4% | 25,7 - 26,9 | 20-26 | acceptable |
| Céfuroxime | 23 | 23,6 | 0,5 | 2,1% | 23,1 - 24,1 | 20-26 | conforme |
| Mécillinam | 27 | 30,7 | 0,9 | 2,9% | 29,8 - 31,6 | 24-30 | acceptable |

Pour la souche *E. coli* ATCC 25922 (tableau 7), les résultats sont conformes pour 27 molécules avec des moyennes de diamètre comprises dans les bornes du CA-SFM avec des écarts-types de 1 à 2 mm et des CV < 5%. Pour trois molécules, le triméthoprime, le céfixime et le mécillinam, les intervalles de valeurs ($m \pm 1ET$) obtenus ne sont pas compris dans les limites définies par le CA-SFM. Néanmoins, ces résultats restent acceptables, une surveillance particulière des CIQ hebdomadaires pour ces molécules sera réalisée.

Tableau 8 : Résultats des essais de reproductibilité – *S. pneumoniae*

| <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 | Diamètre cible CA-SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 10 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA- SFM (mm) | Conclusion |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------|--------|---------------------|--------------------------------------|------------|
| Nom de l'ATB | | | | | | | |
| Pénicilline G | 19 | 20,0 | 0,8 | 3,9% | 19,2 - 20,8 | 16-22 | conforme |
| Oxacilline | 11 | 10,0 | 0,4 | 4,5% | 9,6 - 10,4 | 8-14 | conforme |
| Ampicilline | 28 | 27,7 | 0,6 | 2,3% | 27,1 - 28,3 | 25-31 | conforme |
| Imipénème | 38 | 38,2 | 0,8 | 2,1% | 37,4 - 39,0 | 34-42 | conforme |
| Erythromycine | 29 | 28,7 | 0,9 | 3,1% | 27,8 - 29,6 | 26-32 | conforme |
| Clindamycine | 25 | 24,8 | 0,7 | 3,0% | 24,1 - 25,5 | 22-28 | conforme |
| Pristinamycine | | 27,5 | 1,0 | 3,7% | 26,5 - 28,5 | | |
| Rifampicine | 29 | 28,2 | 0,9 | 3,1% | 27,3 - 29,1 | 26-32 | conforme |
| Norfloxacine | 21 | 21,0 | 0,8 | 3,7% | 20,2 - 21,8 | 18-24 | conforme |
| Lévofloxacine | 24 | 23,9 | 0,7 | 2,9% | 23,2 - 24,6 | 21-27 | conforme |
| Vancomycine | 20 | 20,2 | 0,7 | 3,7% | 19,5 - 20,9 | 17-23 | conforme |
| Teicoplanine | 21 | 21,9 | 0,7 | 3,4% | 21,2 - 22,6 | 18-24 | conforme |
| Cotrimoxazole | 23 | 23,0 | 0,6 | 2,7% | 22,4 - 23,6 | 20-26 | conforme |
| Tétracycline | 31 | 31,5 | 0,5 | 1,6% | 31,0 - 32,0 | 28-34 | conforme |

Pour la souche *S. pneumoniae* ATCC 49619 (tableau 8), les résultats sont conformes pour la totalité des molécules avec des moyennes de diamètre comprises dans les bornes du CA-SFM, des écarts-types proches de 1 mm et des CV < 5%.

Tableau 9 : Résultats des essais de reproductibilité – *E. faecalis*

| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | Diamètre cible CA-SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 10 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA- SFM (mm) | Conclusion |
|----------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------|--------|---------------------|--------------------------------------|------------|
| Nom de l'ATB | | | | | | | |
| Ampicilline | 18 | 17,5 | 0,5 | 2,9% | 17,0 - 18,0 | 15-21 | conforme |
| Imipénème | 27 | 26,9 | 0,8 | 3,1% | 26,1 - 27,7 | 24-30 | conforme |
| Erythromycine | | 22,2 | 0,6 | 2,7% | | | |
| Pristinamycine | | 20,3 | 0,5 | 2,3% | | | |
| Rifampicine | | 20,3 | 0,5 | 2,3% | | | |
| Norfloxacine | 19 | 20,5 | 0,7 | 3,3% | 19,8 - 21,2 | 16-22 | conforme |
| Lévofloxacine | 22 | 22,9 | 0,5 | 2,4% | 22,4 - 23,4 | 19-25 | conforme |
| Vancomycine | 13 | 16,6 | 0,5 | 3,0% | 16,1 - 17,1 | 10-16 | acceptable |
| Teicoplanine | 18 | 21,6 | 0,5 | 2,3% | 21,1 - 22,1 | 15-21 | acceptable |
| Cotrimoxazole | 30 | 30,4 | 0,5 | 1,6% | 30,0 - 31,0 | 26-34 | conforme |
| Tétracycline | | 11,9 | 0,6 | 4,8% | | | |

Pour la souche *E. faecalis* ATCC 29212 (tableau 9), les résultats sont conformes pour l'ampicilline, l'imipénème, la norfloxacine, la lévofloxacine et le cotrimoxazole. Pour ces molécules, les moyennes de diamètre sont comprises dans les bornes du CA-SFM avec des écarts-types proches de 1 mm et des CV < 5%. Concernant la vancomycine et la teicoplanine, les résultats sont acceptables mais « à surveiller » car les moyennes des diamètres sont légèrement supérieures aux bornes données par le CA-SFM.

2.3. Robustesse

2.3.1. Essai de stabilité de l'inoculum

Les essais de stabilité de l'inoculum sont destinés à permettre l'utilisation de la suspension bactérienne dans des délais plus longs que ceux préconisés par le CA-SFM (60 minutes).

Tableau 10 : Résultats des essais de stabilité

| | Dénombrement colonies H0 | | Dénombrement colonies H+1 | | Dénombrement colonies H+2 | |
|----------------------|--------------------------|----|---------------------------|----|---------------------------|----|
| | D2 | D3 | D2 | D3 | D2 | D3 |
| <i>E. coli</i> | 20 | 4 | 21 | 6 | 22 | 3 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 39 | 6 | 37 | 5 | 34 | 4 |
| <i>E. faecalis</i> | 14 | 1 | 17 | 1 | 20 | 1 |
| <i>S. pneumoniae</i> | 8 | 1 | 5 | 2 | 6 | 1 |
| <i>S. aureus</i> | 75 | 3 | 66 | 6 | 43 | 7 |

Les résultats (tableau 10) montrent qu'il n'existe pas de variation importante de la densité des inocula dans les 2 heures suivant leur réalisation. Les antibiogrammes effectués après la réalisation de la suspension et 2 heures après la réalisation de l'inoculum montrent une densité bactérienne satisfaisante à t = 0 min et 120 min. Les mesures de diamètre réalisées à t = 0 min et 120 min ne montrent que des variations mineures (< 2 mm) pour l'ensemble des couples bactérie/antibiotique testés. Aux deux temps, la densité de l'inoculum montre un tapis bactérien de qualité similaire.

2.3.2. Durée de stabilité des cartouches antibiotiques

La stabilité des cartouches antibiotiques a été évaluée lors des essais réalisés dans le cadre de la validation de méthode et plus particulièrement lors de la comparaison de méthodes. Lors de la comparaison de méthodes, les cartouches sont restées à bord

de l'automate pendant 20 jours consécutifs. Les résultats obtenus lors de la comparaison de méthodes sont satisfaisants et nous n'avons pas montré d'augmentation du nombre d'erreurs de catégorisation dans le temps. En attente de données plus précises du fournisseur sur la stabilité des cartouches antibiotiques dans le distributeur, les cartouches pourront être laissées 20 jours à bord de l'automate.

2.4. Comparaisons de méthodes

2.4.1. Méthode automatisée – inoculum réalisé avec le dispositif Inoclic®

Nous avons donc comparé la méthode entièrement automatisée à la méthode manuelle pour 92 souches cliniques. Ce sont au total 1473 couples bactérie/antibiotique qui ont été étudiés pour chaque méthode.

Pour les entérobactéries, les résultats sont résumés dans le tableau 11 et l'ensemble des données dans l'annexe 4 :

Tableau 11 : Concordance entre les deux méthodes de réalisation de l'antibiogramme – Entérobactéries

| Concordances/Discordances pour chaque couple bactérie/antibiotique | Nombre de couples | % | Objectif | Conformité |
|--|-------------------|-------|----------|------------|
| Concordance totale | 794/809 | 98,2% | > 95% | Conforme |
| Erreurs mineures | 12 | 1,5% | < 10% | Conforme |
| Erreurs majeures | 1 | 0,1% | < 5% | Conforme |
| Erreurs très majeures | 2 | 0,2% | < 1% | Conforme |

Les résultats concernant les entérobactéries montrent une concordance égale à 100% entre les deux méthodes pour la catégorisation de 23 molécules sur 30. Pour l'ensemble des molécules, la concordance est $\geq 90\%$. Les erreurs observées concernaient le céfépime (3 mE), l'aztréonam (3 mE), l'ertapénème (2 mE), l'ampicilline (2 VME), la cefoxitine (1 mE), la ceftazidime (1 mE), la fosfomycine (1 ME) la pipéracilline (1 mE), et la tazocilline (1 mE). Notons également que l'ensemble des phénotypes de résistance ont été détectés, en particulier les 8 souches productrices de BLSE.

Pour les staphylocoques les résultats sont les suivants (tableau 12) :

Tableau 12 : Concordance entre les deux méthodes de réalisation de l'antibiogramme – Staphylocoques

| Concordances/Discordances pour chaque couple bactérie/antibiotique | Nombre de couples | % | Objectif | Conformité |
|--|-------------------|------|----------|------------|
| Concordance totale | 239/239 | 100% | > 95% | Conforme |
| Nombre erreurs mineures | 0 | 0% | < 10% | Conforme |
| Nombre erreurs majeures | 0 | 0% | < 5% | Conforme |
| Nombre erreurs très majeures | 0 | 0% | < 1% | Conforme |

Pour les staphylocoques et les 239 couples bactérie/antibiotique testés, la concordance est parfaite (100%). Nous n'avons pas relevé de discordance pour les 19 souches testées y compris pour les trois souches de SARM. L'image d'antagonisme entre l'érythromycine et la clindamycine était présente quelle que soit la technique utilisée.

Pour les entérocoques et les streptocoques nous observons (tableau 13) :

Tableau 13 : Concordance entre les deux méthodes de réalisation de l'antibiogramme – Entérocoques

| Concordances/Discordances pour chaque couple bactérie/antibiotique | Nombre de couples | % | Objectif | Conformité |
|--|-------------------|------|----------|------------|
| Concordance totale | 173/173 | 100% | > 95% | Conforme |
| Nombre erreurs mineures | 0 | 0% | < 10% | Conforme |
| Nombre erreurs majeures | 0 | 0% | < 5% | Conforme |
| Nombre erreurs très majeures | 0 | 0% | < 1% | Conforme |

Nous avons comparé 15 souches d'entérocoques et 9 souches de streptocoques. Les résultats montrent une excellente concordance entre les deux méthodes puisque nous retrouvons 100% de concordance entre les deux méthodes pour les 17 molécules testées.

Pour les BGN non fermentaires les résultats obtenus montrent (tableau 14) :

Tableau 14 : Concordance entre les deux méthodes de réalisation de l'antibiogramme – Bacilles non fermentaires

| Concordances/Discordances pour chaque couple bactérie/antibiotique | Nombre de couples | % | Objectif | Conformité |
|--|-------------------|-------|----------|------------|
| Concordance totale | 247/252 | 98,0% | > 95% | Conforme |
| Nombre erreurs mineures | 2 | 0,8% | < 10% | Conforme |
| Nombre erreurs majeures | 2 | 0,8% | < 5% | Conforme |
| Nombre erreurs très majeures | 1 | 0,4% | < 1% | Conforme |

Pour les BGN non fermentaires, la concordance est très bonne. Nous relevons 98% de concordance entre les deux techniques. Néanmoins, nous notons une erreur très majeure qui concerne la ceftazidime. Il s'agit d'une souche de *P. aeruginosa* présentant un phénotype de résistance de type céphalosporinase associé à une imperméabilité. Concernant les autres erreurs, nous avons relevé une erreur majeure concernant la gentamicine et deux erreurs mineures qui concernaient le méropénème et l'amikacine. Pour ces trois erreurs, la différence des diamètres relevés était inférieure ou égale à 2 mm.

Au total, quelle que soit la méthode de réalisation de l'inoculum, d'écouvillonnage, de distribution de disques ou de lecture, les résultats sont satisfaisants et concordants entre la méthode totalement automatisée et la méthode manuelle.

2.4.2. Méthode automatisée à partir d'une fiole d'hémoculture positive

Nous avons comparé les résultats des antibiogrammes obtenus directement à partir des flacons d'hémoculture positifs selon la méthode en tube Inoclic® (tube de 0,7 mL d'eau physiologique) et selon la méthode utilisée et déjà validée par le laboratoire (ampoule de 2 mL d'eau physiologique).

Au total, ce sont 40 antibiogrammes qui ont été étudiés soit 700 couples bactérie/antibiotique.

Si l'ensemble du souchier est étudié, les résultats montrent plus de 99,3% de concordance entre les deux méthodes.

Pour les bacilles à Gram négatif (*Enterobacteriaceae* et *P. aeruginosa*), 31 molécules ont été testées. Nous observons une concordance supérieure à 98%. Néanmoins, 3 erreurs mineures (0,9%) et 1 erreur majeure (0,3%) ont été relevées pour les 3 molécules suivantes : témocilline (1 ME), pipéracilline–tazobactam (2 mE) et céfoxitine (1 mE). Par ailleurs, une souche de *K. pneumoniae* était productrice de BLSE et ce phénotype a été détecté quelle que soit la méthode utilisée.

Pour les staphylocoques, les résultats montrent une concordance supérieure à 99% pour les seize antibiotiques testés. Une erreur mineure a été observée pour le triméthoprime. Parmi les souches de *S. aureus*, une était résistante à la méticilline et ce phénotype a été détecté par les deux méthodes.

Enfin, pour les streptocoques et entérocoques, nous notons 100% de concordance entre les deux méthodes.

2.4.3. Lecture automatisée par SIRscan®

La comparaison des méthodes de lecture des diamètres a été réalisée sur 1473 couples bactérie/antibiotique. Ces mesures ont été réalisées sur les deux types de milieu utilisés au laboratoire, des géloses MH et MH-F mais également avec des souches muqueuses ou pigmentant la gélose. Nous avons constaté une totale concordance entre la méthode manuelle (pied à coulisse) et la méthode automatisée avec caméra (SIRscan®).

2.5. Analyse des risques

Les risques associés à la méthode 1 et 2 ont été analysés selon la méthode d'Ishikawa, également appelée méthode des « 5M » (matière, matériel, méthode, main d'œuvre et milieu). Les risques et les moyens de maîtrise sont présentés dans un diagramme (figure 19) ci-après.

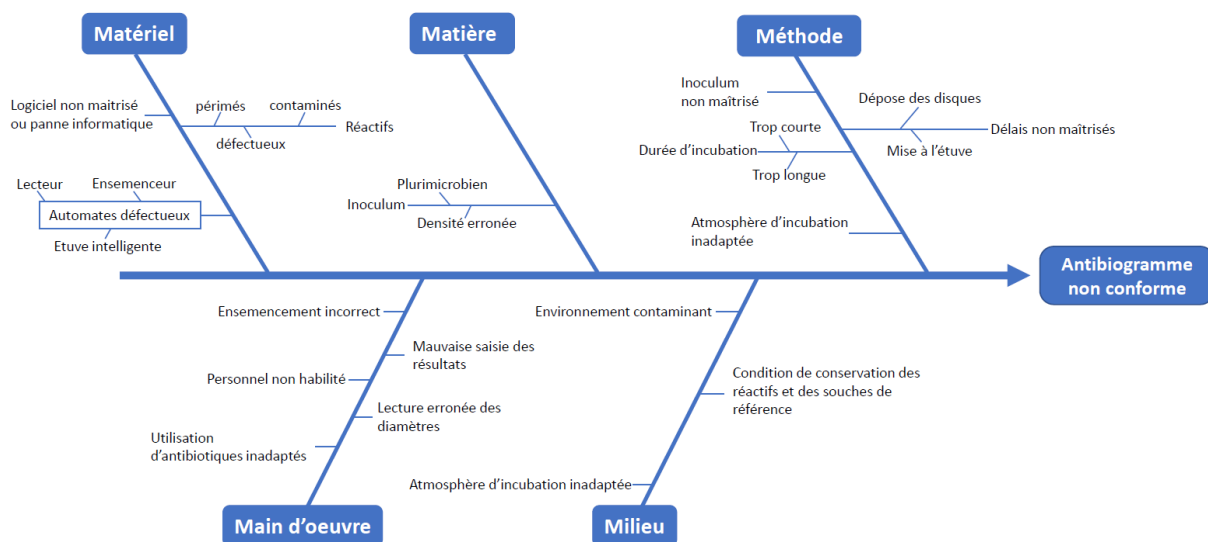


Figure 19 : Diagramme d'Ishikawa représentant les facteurs susceptibles d'influencer le résultat

Les principaux risques concernent la réalisation manuelle de l'inoculum, des milieux ou disques défectueux, une dérive de l'automate ou du lecteur de boîtes ou encore des conditions d'incubation inadaptées. La réalisation hebdomadaire d'antibiogrammes à l'aide de souches contrôle et le suivi des diamètres obtenus

permet de détecter d'éventuelles dérives ou anomalies affectant le matériel ou les automates.

3. Analyse de l'activité des PreLUD® préalablement à la mise en place de la méthode automatisée

L'analyse de l'activité des PreLUD® sur la période étudiée montre que le PreLUD® Urines/Antibiogrammes est, en moyenne, opérationnel 6 heures et 40 minutes par jour avec un démarrage autour de 9h30 et une fin de série vers 16h00. Le PreLUD® Ecouvillons est opérationnel sur une période relativement plus importante d'environ 7 heures par jour avec des heures d'ouverture et de fermeture relativement comparables à celles de l'autre automate. Durant la période d'ouverture des automates, le PreLUD® Urines/Antibiogrammes totalise 4 heures et 12 minutes d'inactivité et le PreLUD® Ecouvillons totalise 3 heures 46 minutes d'inactivité soit en moyenne 63% et 54% d'inactivité. La figure 20 montre l'occupation des PreLUD® par tranche horaire (période d'activité). Les périodes de repas et l'après-midi sont les moins occupées. L'activité sur ces tranches horaires pourrait être absorbée par un seul automate permettant ainsi d'éviter d'éventuelles interruptions du PreLUD® Urines/Antibiogrammes uniquement dédié à la réalisation des antibiogrammes.

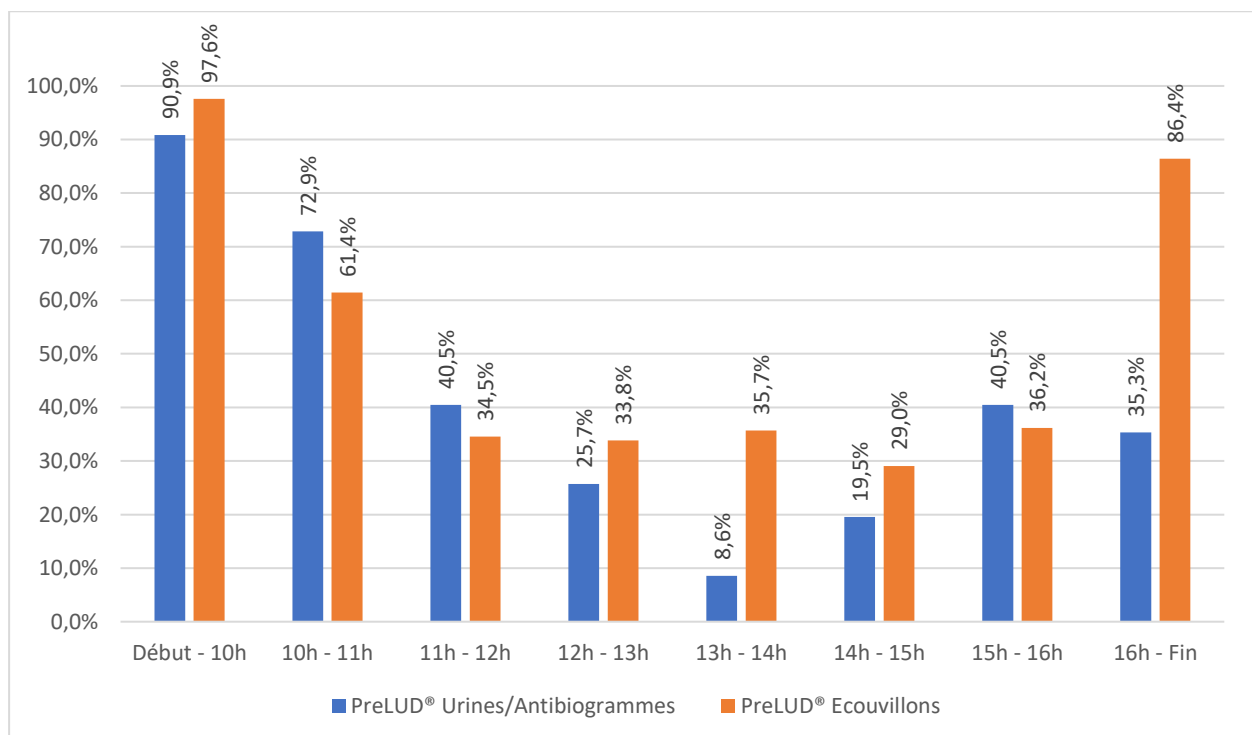


Figure 20 : Occupation des ensemenceurs PreLUD® - CHU de Rouen

Sur la semaine étudiée, 327 antibiogrammes auraient pu être traités par l'automate. Tous les germes nécessitent une gélose MH par antibiogramme à l'exception des entérobactéries. Deux géloses sont nécessaires pour les entérobactéries et jusqu'à trois lorsqu'une gélose MH contenant de la cloxacilline est utilisée. Au total, cela représente, pour la semaine étudiée, 456 boîtes carrées (16 disques) et 23 boîtes rondes (7 disques). En moyenne, 68 boîtes sontensemencées par jour. En considérant que l'automate ensemence une boîte ronde en 2 minutes et une boîte carrée en 3 minutes, cela représente un temps total d'activité d'environ 3 heures et 30 minutes par jour.

Discussion

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé est une technique utilisée au laboratoire du CHU de Rouen depuis plus de 25 ans. Cette technique initialement manuelle a été automatisée au cours de la dernière décennie grâce à la commercialisation de différents automates. Parmi les automates disponibles sur le marché, le laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen a fait le choix d'acquérir l'automate PreLUD®, développé et commercialisé par la société I2a. Cet automate permet de réaliser l'étape d'ensemencement et de dépôt des disques des antibiogrammes par diffusion. Il a été associé à une étuve intelligente couplée à un lecteur automatisé permettant ainsi de simplifier l'étape de lecture et d'interprétation de l'antibiogramme.

Dans le cadre de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale, la mise en place de nouveaux automates nécessite que les méthodes utilisées sur ces machines soient validées. Ce travail avait donc pour objectif de valider une méthode automatisée de réalisation des antibiogrammes par diffusion. Seule la réalisation de l'inoculum reste une étape manuelle, l'ensemencement, la dépose des disques, l'incubation et la lecture de l'antibiogramme ont été totalement automatisés. L'inoculum pourra être réalisé selon deux méthodes, une première méthode à partir d'une culture pure et une seconde méthode à partir d'une fiole d'hémoculture positive.

Afin de simplifier l'étape de réalisation de l'inoculum, le laboratoire a choisi d'utiliser le dispositif Inoclic® dont les tubes sont pris en charge par l'automate PreLUD®.

Il était également nécessaire que l'automate puisse réaliser des antibiogrammes directement à partir de fioles d'hémoculture positives, le laboratoire utilisant déjà cette méthode permettant d'optimiser les délais de rendu des résultats. L'automatisation pourrait permettre à terme de réaliser des antibiogrammes à partir d'hémocultures 24 heures sur 24 et en particulier en soirée et la nuit. Actuellement, ces antibiogrammes ne sont réalisés que de midi à 16 heures du fait d'un effectif réduit en fin d'après-midi et lors de la période de permanence des soins.

La validation de méthode a été réalisée de façon à pouvoir attester des performances de la méthode automatisée quelle que soit la façon de réaliser l'inoculum.

L'essai de répétabilité réalisé à partir de fioles d'hémoculture positives a montré des résultats très satisfaisants. Les coefficients de variation des diamètres d'inhibition

mesurés allaient de 0 à 8,3% avec une moyenne proche de 3% correspondant à des écarts-types généralement inférieurs au millimètre. Concernant les coefficients de variation, nous nous attendions à trouver, pour la méthode automatisée, des valeurs inférieures à celles obtenues lors des essais de répétabilité réalisés initialement pour la méthode manuelle (21). En effet, l'automatisation de l'ensemencement permet de standardiser les pratiques. L'ensemencement par le PreLUD® est réalisé en spirale par un écouvillon, avec application d'une pression constante sur la gélose contrairement à l'ensemencement manuel en 3 passages pour lequel les variations intra et inter-opérateurs sont plus importantes. Les coefficients de variation pour les essais de répétabilité sont très faibles pour la méthode automatisée et la méthode manuelle. Il n'existe donc qu'une faible variabilité liée à l'écouvillonnage par l'automate tout comme pour la méthode manuelle. Ceci plaiderait pour une variabilité liée à l'inoculum et que nous avons évaluée lors des tests de reproductibilité.

Les essais de reproductibilité nous ont permis d'évaluer la variabilité inter-opérateurs, en particulier lors de la réalisation de l'inoculum à l'aide du dispositif Inoclic®. Les résultats obtenus sont également très satisfaisants. Les coefficients de variation observés sont faibles et toujours inférieurs à 7%. Néanmoins, nous observons pour les glycopeptides, une discordance avec les diamètres cibles donnés par le CA-SFM. En effet, nous obtenons pour la vancomycine et la teicoplanine, des diamètres moyens respectivement de 16,6 mm et 21,6 mm et des intervalles (moyenne \pm écart-type) de [16,1–17,1] et de [21,1–22,1]. Pour ces deux molécules, les résultats des CQI réalisés sur la même période avec la technique manuelle montraient également des valeurs de diamètre à la limite ou supérieures aux bornes fixées par le CA-SFM. Nous supposons que les disques utilisés pour cet essai de reproductibilité étaient trop chargés en antibiotique. En effet, les CQI hebdomadaires réalisés par la suite montrent que les diamètres obtenus pour les glycopeptides ont retrouvé des valeurs proches de la cible. Par ailleurs, lors de notre essai de répétabilité, réalisé environ un mois après l'essai de reproductibilité, nous n'avons pas mis en évidence ces discordances. Dans tous les cas, le risque de rendre une fausse sensibilité pour les glycopeptides est très faible car la résistance acquise est généralement de haut niveau (Van A ou B) (50). Pour les espèces ayant une résistance naturelle aux glycopeptides (Van C), généralement de bas niveau comme *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* ou *Enterococcus flavescens*, l'interprétation biologique aurait permis de pondérer une

éventuelle fausse sensibilité. Enfin, nous n'avons pas reçu *a posteriori* d'alerte de reacto-vigilance portant sur la qualité des disques de glycopeptides utilisés.

La reproductibilité de la méthode est donc vérifiée par cet essai. Ces deux premiers essais sont complémentaires. L'essai de répétabilité nous a permis de valider les performances de l'automate et plus particulièrement la phase d'ensemencement. Les essais de reproductibilité quant à eux, nous ont permis d'évaluer la variabilité inter-opérateurs lors de la réalisation de l'inoculum à l'aide du dispositif Inoclic®. Ce dispositif assure une très bonne standardisation de l'inoculum (facteur majeur de variabilité pour cette méthode) tout en simplifiant et en réduisant le temps technique nécessaire à sa réalisation.

Les différentes comparaisons de méthodes, réalisées à l'aide de souches issues de prélèvements de patients, montrent également des résultats très satisfaisants.

Pour la comparaison de la méthode automatisée à la méthode manuelle, le taux de concordance est de 98,6% (1453/1473) en considérant l'ensemble des couples bactérie/antibiotique. Pour les staphylocoques, les entérocoques et les streptocoques, la concordance est parfaite entre les deux méthodes (100%). Pour les BGN (entérobactéries et *Pseudomonas*), nous obtenons des résultats nettement supérieurs aux objectifs fixés.

Nous avons toutefois mis en évidence des discordances pour certaines molécules.

- Pour les entérobactéries :

Nous relevons deux erreurs très majeures pour l'ampicilline, les souches concernées sont une souche de *Citrobacter koseri* et une souche de *Citrobacter freundii*. Les diamètres conduisent à catégoriser « sensible » ces deux souches alors que les antibiogrammes réalisés en parallèle selon la méthode manuelle ne retrouvent pas de diamètre autour de la pastille d'ampicilline. Toutefois, ces erreurs très majeures n'auraient pas eu de conséquence pour le patient car ces souches étant naturellement résistantes à l'ampicilline, la validation biologique aurait permis de corriger ces interprétations erronées. A la suite de ces deux erreurs très majeures, la cartouche antibiotique d'ampicilline a été changée et nous n'avons pas remis en évidence de nouvelles erreurs pour cette molécule quel que soit le germe.

Nous avons également relevé 12 erreurs mineures. Parmi ces dernières, trois concernaient le céfépime. Sur la boîte d'antibiogramme ensemencée manuellement,

le disque de céfépime est placé à côté de deux disques contenant des inhibiteurs de β -lactamases. L'expression d'une BLSE va créer sur la gélose des images de synergies entre ce disque et les disques d'inhibiteur qui vont avoir pour conséquence une déformation du diamètre autour du disque de céfépime. Deux des trois erreurs mineures relatives au céfépime concernent des souches BLSE et peuvent être expliquées par une lecture manuelle du diamètre biaisée rendant les souches sensibles alors qu'elles sont catégorisées intermédiaires avec la méthode automatisée par caméra.

Enfin, les autres erreurs (1 erreur majeure concernant la fosfomycine et 10 erreurs mineures) sont très probablement dues à l'incertitude de mesure avec des différences de diamètre inférieures ou égales à 2 mm pour des diamètres proches d'un diamètre critique.

- Pour les BGN non fermentaires :

Nous avons relevé une erreur très majeure pour le couple *P. aeruginosa*/ceftazidime, les diamètres relevés étaient respectivement de 15 mm et 16 mm pour la méthode manuelle et la méthode automatisée. Une variabilité du niveau d'expression de la céphalosporinase et l'incertitude de mesure autour du diamètre critique unique peuvent expliquer ce résultat. L'erreur majeure concernant le même couple *P. aeruginosa*/ceftazidime est très probablement liée à un disque de ceftazidime déchargé. L'antibiogramme de la souche, ensemencé et pastillé par l'automate PreLUD®, présentait un diamètre d'inhibition très faible comparativement au diamètre retrouvé sur l'antibiogramme réalisé manuellement. La souche testée était un *P. aeruginosa* qui ne présentait par ailleurs pas d'autre résistance (phénotype sauvage). La souche a été retestée le lendemain après changement de la cartouche de disque de ceftazidime. Ce nouvel antibiogramme était alors comparable à l'antibiogramme effectué par la méthode manuelle.

Concernant les autres erreurs (1 erreur majeure concernant la gentamicine et 2 erreurs mineures concernant le méropénème et l'amikacine), elles sont dues à l'incertitude de mesure avec des différences de diamètre inférieures ou égales à 2 mm.

Concernant la comparaison de méthodes de réalisation de l'antibiogramme à partir de fioles d'hémoculture positives, nous avons obtenu des résultats très satisfaisants en ne mettant pas en évidence d'erreur très majeure. Les erreurs observées sont

expliquées par des diamètres mesurés de part et d'autre du diamètre critique avec des différences de diamètre inférieures ou égales à 2 mm. La concordance obtenue est supérieure à 99% entre ces deux méthodes.

Enfin, pour la comparaison des méthodes de lecture, nous obtenons une concordance parfaite entre la méthode automatisée (SIRscan®) et la méthode manuelle à l'aide d'un pied à coulisse. Néanmoins, dans certains cas, un réajustement des diamètres d'inhibition a été nécessaire sur le logiciel. Ces ajustements ont été réalisés pour les antibiogrammes des souches de *P. aeruginosa* productrices de pigments teintant la gélose. Outre ces souches particulières, les zones d'inhibition des antibiogrammes réalisés sur gélose MH-F étaient parfois mal reconnues par le système de lecture automatisé. Ces ajustements manuels étaient d'ailleurs plus fréquents lorsqu'une zone d'hémolyse venait couronner la zone d'inhibition. Les mécanismes de résistance étaient dans tous les cas bien visibles à l'écran permettant de donner au système expert les informations nécessaires pour l'application des règles d'interprétation du CA-SFM.

In fine, quelle que soit la méthode de réalisation des antibiogrammes, nous observons une corrélation satisfaisante. La plupart des erreurs que nous avons pu mettre en évidence sont inévitables car liées aux incertitudes de mesure. Néanmoins, nous avons été obligés de changer à deux reprises des cartouches antibiotiques car des disques semblaient défectueux lors de la lecture de l'antibiogramme. Après le remplacement des cartouches incriminées, nous n'avons plus remis en évidence ce type de problème. Dans la majorité des cas, la reconnaissance du phénotype par le biologiste aurait conduit au déclenchement d'un contrôle. Pour les autres cas, les erreurs constatées n'auraient pas eu d'impact pour le patient car les molécules n'auraient pas été utilisées pour le traitement de leur infection (céphalosporine de troisième génération sur une souche productrice de BLSE ou productrice d'une céphalosporinase à haut niveau, dépistage rectal d'une souche BLSE, etc.).

Enfin, nous avons évalué la durée de stabilité de l'inoculum au-delà du délai maximum d'une heure recommandé par le CA-SFM, temps nécessaire pour la réalisation de 10 antibiogrammes d'entérobactéries par l'automate. Nos essais visaient à étudier la stabilité de l'inoculum pendant les 2 heures suivant sa réalisation. Nous n'avons pas mis en évidence de variation de l'inoculum de plus d'un logarithme décimal, la qualité

des suspensions obtenues est comparable aux différents temps et jusqu'à 2 heures. Cette étude permettra de lisser la charge de travail des techniciens de laboratoire et celle du PreLUD® au cours de la journée. Cela permettra également de pouvoir pallier une éventuelle panne de l'automate et d'éviter de refaire les inocula en cas d'arrêt du PreLUD®.

Compte tenu de l'ensemble de ces essais et des performances observées, la méthode peut donc être validée. Nous l'évaluerons dans le temps à l'aide de CIQ hebdomadaires et des EEQ.

L'automatisation de l'antibiogramme par diffusion a plusieurs avantages qui répondent aux enjeux actuels d'efficience et de qualité. D'abord, la simplicité d'utilisation du dispositif Inoclic® comparativement à l'utilisation d'un néphélomètre pour la réalisation d'un inoculum calibré a permis au laboratoire de se l'approprier rapidement et de gagner du temps pour la réalisation de chaque inoculum. Nous avons observé que l'Inoclic® a permis de diviser par trois le temps de réalisation de l'inoculum calibré. Il est également nécessaire de mentionner que l'utilisation du dispositif a permis de s'affranchir de la calibration et de la maintenance de plusieurs néphélomètres au laboratoire diminuant ainsi les coûts. Néanmoins, tous les types de colonies ne sont pas adaptés à l'Inoclic®. Par exemple, lors des essais réalisés, il a été rapporté que pour *S. pneumoniae*, lorsque la colonie prélevée pour réaliser l'inoculum était de taille inférieure ou égale au diamètre de la tige de platine Inoclic®, l'inoculum produit ne permettait pas d'obtenir des colonies confluentes sur l'antibiogramme. Dans ce cas-là et comme mentionné sur la notice utilisateur, plusieurs colonies doivent être prélevées afin d'obtenir un inoculum correct.

De plus, l'utilisation des automates PreLUD® et SIRscan 2000 Automatic® permet d'obtenir une traçabilité quasi complète du processus. En effet, une fois l'inoculum réalisé et correctement étiqueté, la traçabilité du prélèvement est totale. L'heure de chaque étape est enregistrée ainsi que le numéro de lot de chaque réactif utilisé (gélose et cartouche antibiotique en particulier). Les dates de péremption des cartouches antibiotiques sont également gérées par l'automate permettant ainsi de faciliter la gestion de stock des différents consommables.

Le PreLUD® est un système ouvert et entièrement programmable permettant d'ensemencer les antibiogrammes à la fois sur des boîtes rondes mais aussi des boîtes carrées ce qui est un avantage par rapport à la concurrence. Il sera par ailleurs possible de réaliser à terme et à l'aide de ce système ouvert, des antibiogrammes ciblés. En effet, l'automate dépose les disques de façon individuelle et en fonction des différentes batteries programmées par le laboratoire. Seuls les antibiotiques les plus appropriés notamment au contexte clinique et au germe impliqué seront donc testés permettant ainsi de ne pas déposer des disques qui ne seraient pas nécessaires. Jusqu'alors les disques étaient stockés dans des distributeurs manuels ne permettant pas d'adapter simplement les antibiotiques à tester selon le contexte.

Il reste néanmoins nécessaire qu'un contrôle visuel des boîtes soit réalisé avant leur mise à l'étuve afin de vérifier qu'il n'y ait pas eu d'erreur lors du dépôt des disques. En effet, à plusieurs reprises, il a été constaté que des pastilles ont été déposées au mauvais endroit ou ont été éjectées de la boîte. Un réglage du module antibiogramme de l'automate a toutefois permis de résoudre ce problème. De plus, au moment de la lecture de l'antibiogramme, le SIRscan® est capable d'identifier les disques déposés limitant le risque d'une interprétation erronée de l'antibiogramme.

Une fois les géloses contrôlées, la mise à l'étuve se fait soit dans une étuve traditionnelle soit dans l'étuve automatisée reliée au lecteur. Si l'étuve automatisée est utilisée, il est demandé de scanner les boîtes préalablement identifiées à l'aide d'un code à barres par l'ensemenceur. Outre le fait de s'assurer de la traçabilité du processus, scanner les boîtes permet également à l'automate de programmer la lecture de la boîte après son incubation (délai d'incubation choisi par le laboratoire). Concernant la lecture, celle réalisée par l'automate est plus rapide que celle effectuée par le personnel qualifié. Comme Medeiros *et al*, nous estimons que le temps de lecture d'une boîte par l'automate est au moins deux fois plus rapide que la lecture par du personnel habilité et expérimenté (39). L'étuve intégrée aide à réduire d'autant plus le délai de lecture car lors de nos essais la durée d'incubation était de 18 heures. La lecture s'effectuait donc pour la plupart des antibiogrammes avant 8 heures le matin. A l'arrivée du personnel, les images étaient déjà enregistrées et les antibiogrammes étaient prêts à être vérifiés puis validés. Enfin, l'automatisation du processus et en particulier de la lecture permet de diminuer de façon importante la manipulation des boîtes d'antibiogrammes apportant alors plus de sécurité pour le personnel.

L'arrivée et la mise en production de ces automates au sein du laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen va nécessairement se faire conjointement à des modifications d'organisation. L'activité du laboratoire devrait être repensée autour de ces automates afin d'obtenir un rendement optimal. En effet, comme nous avons pu le mettre en évidence précédemment, les temps morts sont importants et doivent être mis à profit en particulier pour l'ensemencement des antibiogrammes. L'arrivée récente d'un deuxième spectromètre de masse a déjà permis de diminuer les temps d'attente pour les identifications et de débiter l'ensemencement des antibiogrammes dès la fin de matinée. Nous avons pu identifier qu'à partir de la mi-journée et en particulier sur l'heure du repas, les automates étaient très largement sous exploités avec des arrêts fréquemment supérieurs à une heure. Ces temps-morts devraient être exploités pour la réalisation des antibiogrammes par l'automate dès midi. Au vu du nombre d'antibiogrammes par diffusion réalisés chaque jour par le laboratoire, il est indispensable de commencer cette tâche le plus tôt possible. En effet, même si nous estimons que quotidiennement, 3 heures et 30 minutes sont nécessaires pour l'ensemencement automatisé de l'ensemble des antibiogrammes, des aléas techniques (pannes, recharge des géloses et des disques, etc.) seront inévitables. Il paraît nécessaire que la charge de travail soit étalée sur une période plus importante qu'actuellement en démarrant les automates plus tôt le matin et/ou en les arrêtant plus tard le soir. Afin d'assurer un fonctionnement en continu des 2 automates, la création d'un poste technique dédié à la gestion des flux semble nécessaire afin d'assurer l'approvisionnement constant en géloses, cônes, écouvillons, cartouches de disques d'antibiotiques, prélèvements ou suspensions bactériennes pour antibiogrammes ainsi que le déchargement des milieux ensemencés, la résolution d'éventuels incidents techniques ou la maintenance. La préparation des inocula alors confiée à ce technicien permettra de décharger les techniciens actuellement en charge de l'analyse des cultures. Par ailleurs l'acquisition de ces 2 automates s'accompagne d'un rendu de 2 postes techniques en raison du gain de temps technique.

Concernant les coûts d'un tel projet, et hormis l'investissement initial, les consommables utilisés par l'automate sont les mêmes que ceux utilisés pour la technique manuelle. Les géloses et les disques utilisés sont identiques. Le dispositif Inoclic® quant à lui, a été adopté par le laboratoire indépendamment de l'automatisation de l'antibiogramme puisqu'il est utilisé depuis plus d'un an et demi au

laboratoire et a permis d'éviter dans la plupart des cas le recours à un néphélomètre. Seuls les écouvillons permettant d'ensemencer les géloses sont différents mais le coût des deux types d'écouvillons est identique.

L'automatisation des antibiogrammes par diffusion est à peine mise en place dans les laboratoires de biologie médicale, que de nouvelles solutions apparaissent afin de raccourcir le temps de rendu du résultat. Une méthode utilisant un milieu spécifique (MH-R, I2a) permettant de raccourcir la durée d'incubation peut être utilisée et a montré une excellente corrélation entre les résultats obtenus avec ce milieu spécifique et ceux obtenus après une subculture (51,52). Lorsque les antibiogrammes sont réalisés directement à partir de prélèvements biologiques, les urines par exemple, les résultats peuvent être obtenus 40 heures plus tôt par rapport à la technique standard. L'EUCAST a récemment publié une méthode permettant d'obtenir des résultats d'antibiogramme dans la journée (RAST) (53). Les antibiogrammes sont réalisés à partir de fioles d'hémoculture positives et peuvent être lus à partir de 4 heures après le début de l'incubation. Le système ouvert PreLUD® et le lecteur SIRscan 2000 Automatic®, nous permettront à terme d'adapter cette méthode afin d'automatiser ce processus (ensemencement, dépôt des disques, incubation et lecture).

Grâce à ces méthodes, les résultats de l'antibiogramme pourront être rendus dans la journée, améliorant ainsi grandement le service médical rendu avec en particulier un impact clinique important sur le choix et/ou la réduction du spectre de l'antibiothérapie (54).

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'assurer la mise en route et la validation d'une méthode automatisée d'antibiogramme par diffusion au laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen. Dans ce cadre, deux automates ont été couplés afin de permettre l'ensemencement, la dépose des disques, l'incubation et la lecture de l'antibiogramme par diffusion. La seule étape nécessitant l'expertise d'un personnel formé et habilité est la réalisation de l'inoculum qui a toutefois été simplifiée à l'aide du dispositif Inoclic®. Les performances obtenues sont conformes aux exigences fixées par le laboratoire que ce soit pour l'ensemencement et le dépôt des disques par l'automate PreLUD® ou pour l'incubation et la lecture automatisée par le lecteur SIRscan 2000 Automatic®. La méthode automatisée a également montré des résultats comparables à ceux obtenus à l'aide de la méthode manuelle permettant d'utiliser indifféremment ces deux méthodes.

L'inoculum quant à lui, pourra être réalisé de deux façons, à partir de colonies à l'aide du dispositif Inoclic® ou à partir d'une fiole d'hémoculture positive. La méthode manuelle restera toujours utilisée au laboratoire pour les souches qui ne sont pas adaptées au dispositif Inoclic® ou lors d'une éventuelle panne d'un automate.

L'automate PreLUD® permettait déjà l'ensemencement de certains prélèvements comme les urines et ceux sur écouvillons. Désormais, son utilisation sera renforcée et optimisée permettant à terme de réduire les coûts sans impacter la qualité des résultats. Le temps technique gagné par l'automatisation des étapes d'ensemencement et de dépôt des disques, tâches chronophages et répétitives, pourra être utilisé pour réaliser des tâches non automatisables et nécessitant une réelle expertise (informatique, qualité, développement de nouvelles techniques, etc.). La lecture, également chronophage, sera plus rapide et permettra surtout une traçabilité complète de ce processus en adéquation avec les exigences actuelles de qualité.

Bibliographie

1. Doetsch RN. Studies on biogenesis by Sir William Roberts. *Med Hist.* juill 1963;7(3):232-40.
2. Poupard JA, Rittenhouse SF, Walsh LR. The Evolution of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods. In: Poupard JA, Walsh LR, Kleger B, Antimicrobial Susceptibility Testing: Critical Issues for the 90s. Boston, MA: Springer US; 1994. p. 3-14. (Advances in Experimental Medicine and Biology).
3. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* juin 1929;10(3):226-36.
4. Fleming A, Wright AE. A comparison of the activities antiseptics on bacteria and on leucocytes. *Proc R Soc Lond Ser B Contain Pap Biol Character.* 1 avr 1924;96(674):171-80.
5. Reddish GF. Methods of testing antiseptics. *J Lab Clin Med.* 1 avr 1929;14(7):649-58.
6. Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, et al. Further observations on penicillin. *The Lancet.* août 1941;238(6155):177-89.
7. Mohs FE. A simple quantitative test for the penicillin sensitivity of bacteria: The "radial streak" method. *J Lab Clin Med.* 1 sept 1945;30(9):800-2.
8. Stokes EJ. Antibiotic Sensitivity Testing. *Br Med J.* 19 juin 1971;2(5763):707.
9. Bondi A, Spaulding EH. A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *Am J Med Sci.* févr 1947;213(2):221-5.
10. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* avr 1966;45(4):493-6.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standards M2-A7 ASM-2. 1975.
12. Berild D, Mohseni A, Diep LM, Jensenius M, Ringertz SH. Adjustment of antibiotic treatment according to the results of blood cultures leads to decreased antibiotic use and costs. *J Antimicrob Chemother.* févr 2006;57(2):326-30.
13. Eveillard M, Lemarié C, Cottin J, Hitoto H, Mahaza C, Kempf M, et al. Assessment of the usefulness of performing bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing 24 h a day in a clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(8):1084-9.
14. Quentin-Noury C. Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie. *Rev Francoph Lab.* mai 2016;2016(482):49-59.

15. Dauwalder O, Vandenesch F. Disc diffusion AST automation: one of the last pieces missing for full microbiology laboratory automation. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mai 2020;26(5):539-41.
16. Jehl F, Chabaud A, Grillon A. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? *J Anti-Infect.* 1 déc 2015;17(4):125-39.
17. Bayot ML, Bragg BN. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 25 août 2020].* Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>
18. McFarland J. The Nephelometer:an Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. *J Am Med Assoc.* 5 oct 1907;XLIX(14):1176-8.
19. D'Amato RF, Hochstein L. Evaluation of a rapid inoculum preparation method for agar disk diffusion susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* févr 1982;15(2):282-5.
20. Hombach M, Maurer FP, Pfiffner T, Böttger EC, Furrer R. Standardization of Operator-Dependent Variables Affecting Precision and Accuracy of the Disk Diffusion Method for Antibiotic Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol.* déc 2015;53(12):3864-9.
21. Paquin C. Antibiogramme direct sur flacon d'hémoculture positif : mise au point et intérêt en thérapeutique. 2016.
22. Coorevits L, Boelens J, Claeys G. Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(6):1207-12.
23. Nizet V. The Accidental Orthodoxy of Drs. Mueller and Hinton. *EBioMedicine.* 4 juill 2017;22:26-7.
24. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol [Internet]. American Society of Microbiology; 2009 [cité 5 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3189>
25. Dibb WL, Digranes A, Bottolfsen KL. Effects of carbon dioxide upon the in vitro activity of erythromycin. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B].* juin 1986;94(3):173-6.
26. Goldstein EJ, Sutter VL, Kwok YY, Lewis RP, Finegold SM. Effect of carbon dioxide on in vitro susceptibility of anaerobic bacteria to erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 1981;20(6):705-8.
27. Johnson MM, Hill SL, Piddock LJ. Effect of carbon dioxide on testing of susceptibilities of respiratory tract pathogens to macrolide and azalide antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* août 1999;43(8):1862-5.
28. Rosenblatt JE, Schoenknecht F. Effect of Several Components of Anaerobic Incubation on Antibiotic Susceptibility Test Results. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1972;1(5):433-40.

29. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control, and effect of calcium on in vitro tests. *Diagn Microbiol Infect Dis.* sept 2000;38(1):51-8.
30. Cooper GL, Louie A, Baltch AL, Chu RC, Smith RP, Ritz WJ, et al. Influence of zinc on *Pseudomonas aeruginosa* susceptibilities to imipenem. *J Clin Microbiol.* sept 1993;31(9):2366-70.
31. Humphries RM, Kircher S, Ferrell A, Krause KM, Malherbe R, Hsiung A, et al. The Continued Value of Disk Diffusion for Assessing Antimicrobial Susceptibility in Clinical Laboratories: Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. *J Clin Microbiol.* 26 juill 2018;56(8).
32. Åhman J, Matuschek E, Kahlmeter G. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers-EUCAST evaluations in 2014 and 2017. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mars 2019;25(3):346-52.
33. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2014;20(4):O255-266.
34. Société Française de Microbiologie. Recommandations du comité de l'antibiogramme V.2.0. 2019.
35. van den Bijllaardt W, Buiting AG, Mouton JW, Muller AE. Shortening the incubation time for antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion for Enterobacteriaceae: how short can it be and are the results accurate? *Int J Antimicrob Agents.* mai 2017;49(5):631-7.
36. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk Diffusion - Reading Guide v7.0. 2020.
37. Kolbert M, Chegrani F, Shah PM. Evaluation of the OSIRIS video reader as an automated measurement system for the agar disk diffusion technique. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mai 2004;10(5):416-20.
38. Sánchez MA, Sánchez del Saz B, Loza E, Baquero F, Cantón R. Evaluation of the OSIRIS video reader system for disk diffusion susceptibility test reading. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2001;7(7):352-7.
39. Medeiros AA, Crellin J. Evaluation of the Sirscan automated zone reader in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* avr 2000;38(4):1688-93.
40. Andrews JM, Boswell FJ, Wise R. Evaluation of the Oxoid Aura image system for measuring zones of inhibition with the disc diffusion technique. *J Antimicrob Chemother.* oct 2000;46(4):535-40.
41. Hombach M, Zbinden R, Böttger EC. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader. *BMC Microbiol.* 8 oct 2013;13:225.

42. Hombach M, Ochoa C, Maurer FP, Pfiffner T, Böttger EC, Furrer R. Relative contribution of biological variation and technical variables to zone diameter variations of disc diffusion susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* janv 2016;71(1):141-51.
43. Gunnar Kahlmeter and the EUCAST Steering Committee. Redefining susceptibility testing categories S, I and R. 2019.
44. Alexandre K, Fantin B. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Temocillin. *Clin Pharmacokinet.* 2018;57(3):287-96.
45. Weber. Les points sur les " i " - i comme incertitude. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse; 2019; Paris.
46. AFNOR. Norme NF EN ISO 15189:2012. 2012.
47. Comité français d'accréditation (COFRAC). Règlement d'accréditation (SH REF 05) - Révision 12.
48. Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie. QUAMIC. 2019.
49. Comité français d'accréditation (COFRAC). SH FORM 43 - FICHE TYPE. 2015.
50. Leclercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* janv 1997;24 Suppl 1:S80-84.
51. Perillaud C, Pilmis B, Diep J, Perreau S, Ruffier d'Epenoux L, Reissier S, et al. Étude de l'antibiogramme rapide sur milieu solide MHR (i2a) directement à partir des urines. *Médecine Mal Infect.* 1 juin 2017;47(4, Supplement):S53.
52. Pilmis B, Jiang O, Thy M, Defarge S, Le Monnier A, Nguyen Van J-C. Impact clinique de l'antibiogramme rapide MHR-SIR (i2a) directement à partir des urines. *Médecine Mal Infect.* 1 juin 2019;49(4, Supplement):S2.
53. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *J Antimicrob Chemother.* 1 avr 2020;75(4):968-78.
54. Pilmis B, Thy M, Diep J, Krob S, Périllaud C, Couzigou C, et al. Clinical impact of rapid susceptibility testing on MHR-SIR directly from blood cultures. *J Antimicrob Chemother.* 01 2019;74(10):3063-8.

Annexes

Annexe 1 – Notice Inoclic®

Procédure d'utilisation d'INOCLIC®

PRESENTATION

Le "Fil droit" ou "Fil de platine" a été très largement utilisé par le passé pour inoculer des milieux de culture. INOCLIC s'inspire directement de ce principe, en gardant la simplicité du procédé, et en éliminant les défauts. INOCLIC est recommandé pour tous les usages traditionnels du fil de platine, comme par exemple l'inoculation de milieux de culture gélosés ou de milieux de conservation en tube par piqûre centrale profonde, ou encore la mise en suspension de bactéries dans un milieu liquide. Fabriqué à l'aide de matériaux utilisant de nouvelle technologie, INOCLIC est particulièrement adapté pour la réalisation d'inoculum standardisés d'antibiogrammes ; il évite la double dilution.

A usage unique, les tiges INOCLIC sont éliminées après usage. Elles sont utilisables à l'aide du porte tiges INOCLIC ou bien directement à la main.

NATURE ET CONDITIONNEMENT

INOCLIC est une tige métallique de dimension et composition spécifiquement étudiées pour assurer les fonctions décrites ci-dessus.

Les tiges INOCLIC sont présentées en sachet de 250 tiges ; le porte tiges INOCLIC est disponible à l'unité (ou en coffret de 500 tiges INOCLIC + 1 porte tiges).

UTILISATION

INOCLIC doit être utilisé conformément aux recommandations générales concernant le matériel à usage unique pour Laboratoire de Bactériologie, aux bonnes pratiques de laboratoire et, le cas échéant, aux indications données dans le Guide de Bonne Exécution des Analyses (G.B.E.A.) du Laboratoire.

CONSERVATION

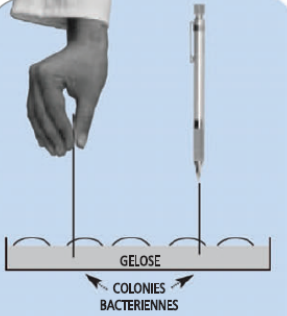
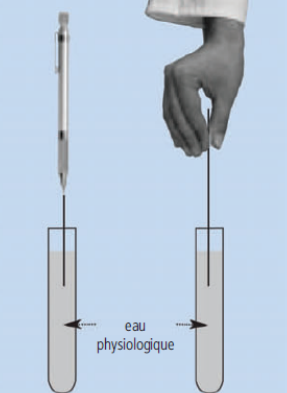
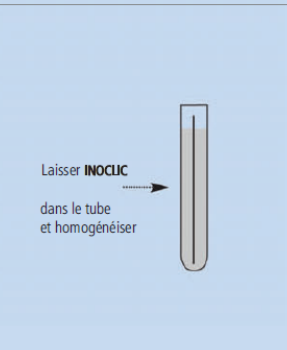
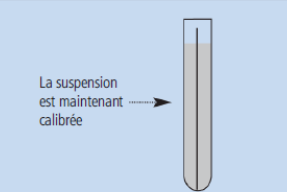
Les tiges INOCLIC doivent être conservées dans leur emballage d'origine, dans un lieu sec et à température ambiante.

PRECAUTIONS D'EMPLOI/LIMITES D'UTILISATION

Il est recommandé de ne pas manipuler les tiges par l'extrémité destinée à piquer la colonie, afin d'éviter une éventuelle contamination. Les tiges INOCLIC ne doivent pas être flambées avant usage. Il ne faut jamais piquer une colonie en deux temps, ni utiliser une tige ayant touché la surface de la gélose, les germes n'adhérant plus à une extrémité humide. Les tiges INOCLIC ne sont pas recommandées pour les petites colonies présentant un diamètre inférieur ou égale à celui de la tige elle-même (ex. : pneumocoque).

Les colonies anormalement muqueuses n'adhèrent pas à la pipette Pasteur, n'adhèrent pas aux tiges INOCLIC dans de bonnes conditions. Ces colonies ne doivent pas être reprises avec les tiges INOCLIC, en particulier si on recherche à prélever une quantité précise de germes de manière reproductible.

SCHEMA D'UTILISATION DU SYSTEME INOCLIC

| | |
|---|---|
|  | <p>Extraire la tige INOCLIC du Porte Tiges en tirant sur la tige grâce à une pince à épiler (flambée) tout en appuyant sur l'extrémité du Porte Tiges. On peut également utiliser les tiges INOCLIC manuellement (sans le Porte Tiges) en les maintenant entre deux doigts par l'extrémité opposée à la pointe destinée à piquer la colonie.</p> <p>La tige INOCLIC est maintenue verticalement, soit à 90° par rapport à la surface de la gélose. On pique la colonie en la traversant (ainsi que la gélose) jusqu'au fond de la boîte. On retire la tige en réalisant le mouvement inverse, en prenant soin de ne pas imprimer de mouvement latéral à la tige au moment du contact avec la colonie, pour éviter une charge excessive.</p> |
|  | <p>La partie de colonie ainsi prélevée peut être mise en suspension dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile. Pour ce faire, il y a lieu d'incliner légèrement le tube et de plaquer l'extrémité de la tige sur la pente humide du tube, sans l'immerger. On dilacère ensuite la colonie sur cette pente en imprimant à la tige un mouvement de haut en bas ainsi qu'un mouvement de rotation sur son axe.</p> <p>Méthode d'inoculation par inondation : Passer le tube sur un "Vortex" pendant quelques secondes afin d'assurer une homogénéisation parfaite de la suspension. Inoculer les géloses par inondation. Placer les géloses 15 minutes à 37°C pour sécher leur surface.</p> |
|  | <p>Méthode d'inoculation par écouvillonnage : Lâcher la tige INOCLIC dans la suspension. Passer le tube sur un "Vortex" pendant quelques secondes afin d'assurer une homogénéisation parfaite de la suspension. Plonger l'écouvillon dans la suspension ; l'extraire sans l'égoutter sur les bords du tube.</p> <p>Boîtes rondes : ensemencer ensuite la boîte classiquement en frottant l'écouvillon sur toute la surface de la gélose, puis en la tournant à 90° afin d'entrecroiser les dépôts de bactéries et d'éviter l'apparition de traînées visibles après incubation.</p> <p>Boîtes carrées : ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la moitié de la boîte puis tourner celle-ci à 90° et frotter l'écouvillon sur une autre moitié de boîte. Plonger à nouveau l'écouvillon dans la suspension. L'extraire sans l'égoutter puis terminer l'ensemencement de la boîte comme précédemment. Les écouvillons SirScan Swabs sont recommandés pour cette opération.</p> |
|  | <p>Élimination des tiges : Le tube et les tiges INOCLIC doivent ensuite être éliminés en suivant la procédure habituelle du laboratoire pour le matériel à usage unique contaminé.</p> |



A présent le futur !

Annexe 2 – D’après Ahman *et al*, étude de la qualité des disques et évolution dans le temps

| STUDY 2014 | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-------|-----|-------------|---------|---------|-------------|------|-------|---------|-------------|
| Antimicrobial disk | Abtek | BD | Bio-analyse | Bio-Rad | HiMedia | Liofil-chem | Mast | Oxoid | SirScan | |
| Benzyloxyethyl penicillin 1 unit | | L | H | | NA | | | | H | |
| Amoxicillin-clav. 20-10 µg | L | | | H | H | | | | | |
| Piperacillin-tazo. 30-6 µg | L | | | | NA | | | | H | |
| Oxacillin 1 µg | | L | L | | H | L | | | L | |
| Mecillinam 10 µg | L | | H | | H | | | | H | |
| Cefotaxime 5 µg ¹ | NA | | | | NA | | | | | |
| Cefoxitin 30 µg | NA | | | H* | L* | H | | | | |
| Ceftazidime 10 µg | L | | | | L** | | | | | |
| Meropenem 10 µg ¹ | L | | | H | H | H* | | H | | |
| Ciprofloxacin 5 µg ¹ | | L | | | H | | L | | | |
| Pefloxacin 5 µg | NA | L | | | H | L | | | NA | |
| Norfloxacin 10 µg | L | | | | H* | | | | L | |
| Gentamicin 10 µg | | H | | | H | | | | NA | |
| Tobramycin 10 µg | | | | NA | H* | H | | | | |
| Erythromycin 15 µg | L | L | L* | | H | L | | | L | |
| Tetracycline 30 µg | L | L* | L | | | L | L | | L* | |
| Total number of readings | 84 | 102 | 102 | 96 | 78 | 102 | 102 | 102 | 93 | 861 |
| STUDY 2017 | | | | | | | | | | |
| Antimicrobial disk | Abtek | BD | Bio-analyse | Bio-Rad | HiMedia | Liofil-chem | Mast | Oxoid | SirScan | |
| Benzyloxyethyl penicillin 1 unit | | L | | | | | | | NA | |
| Amoxicillin-clav. 20-10 µg | L | | | H | L** | L | | | | |
| Piperacillin-tazo. 30-6 µg | L | | H | | L** | | H | | | |
| Oxacillin 1 µg | | | | H | H | | | | | |
| Mecillinam 10 µg | | | | | | | | | | |
| Cefotaxime 5 µg | | | | | | | | | | |
| Cefoxitin 30 µg | | L | H | | L | | | | | |
| Ceftazidime 10 µg | L | | | | L* | | | | | |
| Meropenem 10 µg | | | | | L* | | | | | |
| Ciprofloxacin 5 µg | | | | | | | | | | |
| Pefloxacin 5 µg | | | | | H | L | | | | |
| Norfloxacin 10 µg | | | | | | | | | | |
| Gentamicin 10 µg | | | | | H | | H | | | |
| Tobramycin 10 µg | | | | | H | | | | | |
| Erythromycin 15 µg | | | | | | | | | | |
| Tetracycline 30 µg | | | | | L | | | | | |
| Total number of readings | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 | 111 | 1071 |

¹Data reanalysed due to changes in QC criteria since 2014.

| |
|--|
| 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 |

NA = Not Available
H = High, mean value > 1 mm above target
L = Low, mean value > 1 mm below target
* Single reading out of QC range
** Variation ≥4 mm for consecutive tests

Annexe 3 – Résultats des essais de répétabilité

| <i>E. coli</i> ATCC 25922 Nom de l'ATB | Diamètre cible CA SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 10 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA SFM 2019 (mm) | Conclusion |
|--|-------------------------------|------------------------|--------------------|--------|---------------------|---|------------|
| Pipéracilline - tazobactam | 24 | 22,5 | 0,9 | 4,0% | 21,6 - 23,4 | 21 - 27 | Conforme |
| Ceftazidime | 26 | 26,3 | 1,3 | 4,9% | 25,0 - 27,6 | 23 - 29 | Conforme |
| Méropénème | 31 - 32 | 30,4 | 0,7 | 2,3% | 29,7 - 31,1 | 28 - 35 | Conforme |
| Tobramycine | 22 | 20,5 | 1,7 | 8,3% | 18,8 - 22,2 | 18 - 26 | Conforme |
| Ciprofloxacine | 33 | 34,3 | 1,1 | 3,2% | 33,3 - 35,4 | 29 - 37 | Conforme |
| Triméthoprim | 24 - 25 | 28,8 | 0,8 | 2,8% | 28,0 - 29,6 | 21 - 28 | Acceptable |
| Céfuroxime | 23 | 26,0 | 0,7 | 2,7% | 25,3 - 26,7 | 20 - 26 | Acceptable |

| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Nom de l'ATB | Diamètre cible CA SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 7 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA SFM 2019 (mm) | Conclusion |
|--|-------------------------------|-----------------------|--------------------|--------|---------------------|---|------------|
| Ticarcilline - acide clavulanique | 24 | 24,5 | 0,5 | 2,0% | 24,0 - 25,0 | 20 - 28 | Conforme |
| Pipéracilline - tazobactam | 26 | 26,8 | 1,0 | 3,7% | 25,8 - 27,8 | 23 - 29 | Conforme |
| Ceftazidime | 24 | 26,4 | 1,0 | 3,8% | 25,4 - 26,4 | 21 - 27 | Conforme |
| Méropénème | 30 | 29,6 | 1,3 | 4,4% | 28,3 - 30,9 | 27 - 33 | Conforme |
| Tobramycine | 23 | 25,0 | 1,7 | 6,8% | 24,3 - 26,7 | 20 - 26 | Acceptable |
| Lévofloxacine | 22 - 23 | 23,0 | 0,0 | 0,0% | 23,0 - 23,0 | 19 - 26 | Conforme |

| <i>S. aureus</i> ATCC 29213 Nom de l'ATB | Diamètre cible CA SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 10 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA SFM 2019 (mm) | Conclusion |
|--|-------------------------------|------------------------|--------------------|--------|---------------------|---|------------|
| Pénicilline G | 15 | 13,2 | 0,7 | 5,3% | 12,5 - 13,9 | 12 - 18 | Conforme |
| Cefoxitine | 27 | 25,1 | 0,3 | 1,2% | 24,8 - 25,4 | 24 - 30 | Conforme |
| Gentamicine | 22 | 20,8 | 0,4 | 1,9% | 20,4 - 21,2 | 19 - 25 | Conforme |
| Clindamycine | 25 | 25,3 | 0,5 | 2,0% | 24,8 - 25,8 | 23 - 29 | Conforme |
| Lévofloxacine | 26 | 24,0 | 0,7 | 2,9% | 23,3 - 24,7 | 23 - 29 | Conforme |
| Cotrimoxazole | 29 | 25,8 | 0,7 | 2,7% | 25,1 - 26,5 | 26 - 32 | Acceptable |

| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 Nom de l'ATB | Diamètre cible CA SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 7 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA SFM 2019 (mm) | Conclusion |
|--|-------------------------------|-----------------------|--------------------|--------|---------------------|---|------------|
| Ampicilline | 18 | 18,3 | 0,7 | 3,8% | 17,6 - 19,0 | 15 - 21 | Conforme |
| Norfloxacine | 19 | 19,0 | 0,5 | 2,6% | 18,5 - 19,5 | 16 - 22 | Conforme |
| Lévofloxacine | 22 | 20,0 | 0,0 | 0,0% | 20,0 - 20,0 | 19 - 25 | Conforme |
| Vancomycine | 13 | 14,4 | 0,5 | 3,5% | 13,9 - 14,9 | 10 - 16 | Conforme |
| Teicoplanine | 18 | 18,8 | 0,7 | 3,7% | 18,1 - 19,5 | 15 - 21 | Conforme |
| Cotrimoxazole | 30 | 26,6 | 0,5 | 1,9% | 26,1 - 27,1 | 26 - 34 | Conforme |

| <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 Nom de l'ATB | Diamètre cible CA SFM (mm) | Moyenne (mm) n = 10 | Ecart-type (mm) | CV (%) | Bornes (m ± 1ET) | Diamètres limites CA SFM 2019 (mm) | Conclusion |
|---|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------|-----------------------------|---|-------------------|
| Oxacilline | 11 | 9,8 | 0,4 | 4,1% | 9,4 - 10,2 | 8 - 14 | Conforme |
| Norfloxacine | 21 | 18,7 | 0,6 | 3,2% | 18,1 - 19,3 | 18 - 24 | Conforme |
| Vancomycine | 20 | 18,8 | 0,9 | 4,8% | 17,9 - 19,7 | 17 - 23 | Conforme |
| Cotrimoxazole | 22 | 22,6 | 0,5 | 2,2% | 22,1 - 23,1 | 18 - 26 | Conforme |

Annexe 4 – Résultats de la comparaison de la méthode manuelle à la méthode automatisée à partir d'une culture pure

| Entérobactéries | Nombre de couple | Concordance | | Erreur mineure | | Erreur majeure | | Erreur très majeure | |
|-----------------------------------|------------------|-------------|------|----------------|-----|----------------|----|---------------------|----|
| | | | % | | % | | % | | % |
| Imipénème | 30 | 30 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Cefepime | 30 | 27 | 90% | 3 | 10% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ticarcilline | 30 | 30 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Piperacilline | 30 | 29 | 97% | 1 | 3% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Aztreonam | 30 | 27 | 90% | 3 | 10% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Amoxicilline + acide clavulanique | 30 | 30 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Céfotaxime | 30 | 30 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Tazocilline | 30 | 29 | 97% | 1 | 3% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Temocilline | 30 | 30 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ceftazidime | 30 | 29 | 97% | 1 | 3% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ticarcilline + acide clavulanique | 30 | 30 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ertapénème | 30 | 28 | 93% | 2 | 7% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Meropénème | 30 | 30 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Cefoxitine | 30 | 29 | 97% | 1 | 3% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ampicilline | 30 | 28 | 93% | 0 | 0% | 0 | 0% | 2 | 7% |
| Cefalexine | 16 | 16 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Tobramycine | 29 | 29 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Gentamicine | 29 | 29 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Netilmycine | 29 | 29 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Amikacine | 29 | 29 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Acide Nalidixique | 29 | 29 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ofloxacine | 29 | 29 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ciprofloxacine | 29 | 29 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Fosfomycine | 29 | 28 | 97% | 0 | 0% | 1 | 3% | 0 | 0% |
| Nitrofuranes | 15 | 15 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Trimethoprime | 15 | 15 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Trimethoprime + sulfaméthoxazole | 29 | 29 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Cefixime | 15 | 15 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Cefuroxime | 22 | 22 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Mecillinam | 15 | 15 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |

| Staphylocoques | Nombre de couple | Concordance | | Erreur mineure | | Erreur majeure | | Erreur très majeure | |
|----------------------------------|------------------|-------------|------|----------------|----|----------------|----|---------------------|----|
| | | | % | | % | | % | | % |
| Pénicilline | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Kanamycine | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Tobramycine | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Gentamicine | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Erythromycine | 12 | 12 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Clindamicine | 12 | 12 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Synergistines | 12 | 12 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Céfoxitine | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Norfloxacin | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Triméthoprime + sulfaméthoxazole | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Acide fusidique | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Rifampicine | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Levofloxacin | 19 | 19 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Tétracycline | 0 | | | | | | | | |
| Minocycline | 0 | | | | | | | | |
| Linézolide | 0 | | | | | | | | |
| Ampicilline 2 | 0 | | | | | | | | |
| Triméthoprime | 7 | 7 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Nitrofuranes | 7 | 7 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Fosfomycine | 0 | | | | | | | | |

| Streptocoques et entérocoques | Nombre de couple | Concordance | | Erreur mineure | | Erreur majeure | | Erreur très majeure | |
|--------------------------------------|------------------|-------------|------|----------------|----|----------------|----|---------------------|----|
| | | | % | | % | | % | | % |
| Imipénème | 6 | 6 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Rifampicine | 13 | 13 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Teicoplanine | 13 | 13 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Gentamicine 500 | 7 | 7 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ampicilline | 16 | 16 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Pristinamicine | 7 | 7 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Vancomycine | 24 | 24 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Gentamicine 30 | 7 | 7 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Oxacilline | 3 | 3 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Clindamicine | 7 | 7 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Levofloxacin | 8 | 8 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Tétracycline | 7 | 7 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Penicilline | 6 | 6 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Erythromycine | 13 | 12 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Norfloxacin | 23 | 23 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Fosfomycine | 2 | 2 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Nitrofuranes | 11 | 11 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |

| BGN non fermentaires | Nombre de couple | Concordance | | Erreur mineure | | Erreur majeure | | Erreur très majeure | |
|----------------------|------------------|-------------|------|----------------|----|----------------|----|---------------------|----|
| | | | % | | % | | % | | % |
| Ticarcilline | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Pipéracilline | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Imipénème | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Tazocilline | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Méropénème | 18 | 17 | 94% | 1 | 6% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ceftazidime | 18 | 16 | 89% | 0 | 0% | 1 | 6% | 1 | 6% |
| Claventin | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Céfépime | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Tobramycine | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Amikacine | 18 | 17 | 94% | 1 | 6% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Aztréonam | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Lévofloxacine | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Ciprofloxacine | 18 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Gentamicine 10 | 18 | 17 | 94% | 0 | 0% | 1 | 6% | 0 | 0% |

SERMENT DE GALIEN

Je jure 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 ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



LEYSOUR DE ROHELLO François

L'antibiogramme par diffusion : de sa découverte à son automatisation – Mise en place d'une méthode automatisée au CHU de Rouen

Th. D. Pharm., Rouen, 2020, 99 p.

RESUME

Jusqu'alors modérément automatisés, les laboratoires de bactériologie se voient maintenant dotés d'automates performants capables de réaliser une partie importante du travail auparavant effectué manuellement. Cette automatisation répond aux exigences de qualité et permet d'améliorer l'efficacité d'un laboratoire.

Dans ce contexte, le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Rouen a acquis deux automates permettant la réalisation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé (PreLUD®) et leur lecture après incubation (SIRscan 2000 Automatic®). Notre travail a consisté à valider cette méthode automatisée pour la réalisation et la lecture des antibiogrammes en réalisant l'inoculum de deux façons : à partir d'une culture pure à l'aide du dispositif Inoclic® (I2a) ou directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif. La méthode permettant de réaliser des antibiogrammes directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif était déjà utilisée au laboratoire mais une adaptation était requise pour qu'elle puisse être exploitée sur l'automate PreLUD®.

Les performances de cette méthode selon les préconisations du COFRAC montrent des résultats satisfaisants. Nous relevons une concordance très satisfaisante entre la méthode manuelle et la méthode automatisée quelle que soit la façon de réaliser l'inoculum.

La méthode automatisée peut donc être utilisée au laboratoire de bactériologie permettant à terme de diminuer les coûts en personnel et de réorienter le potentiel humain vers des tâches à plus forte valeur ajoutée.

MOTS CLES : automatisation – antibiogramme – hémoculture – résistance aux antibiotiques – Norme NF EN ISO 15189

JURY

Présidente du jury : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON

Membres du jury : Madame le Docteur Sophie BOYER

Monsieur le Professeur Olivier JOIN-LAMBERT

Madame le Professeur Nadine LEMAITRE

Monsieur le Docteur Jean-Claude NGUYEN

DATE DE SOUTENANCE : 25 septembre 2020