

Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

Bactériologie	16BAC1	juin 2016
----------------------	---------------	------------------

Identification bactérienne : *Propionibacterium acnes* et *Finnegoldia magna*
Antibiogramme : *Pseudomonas aeruginosa* Colistine-R

mars 2017

Christophe de CHAMPS (Reims)
Muriel FROMAGE (Ansm)
Gérard LINA (Lyon)

Expédition : 01 juin 2016

Clôture : 27 juin 2016

Edition des compte-rendus individuels : 19 octobre 2016

Paramètres contrôlés :

Identification bactérienne : *Propionibacterium acnes* et *Finegoldia magna* (*Peptostreptococcus magnus*)

Antibiogramme : *Pseudomonas aeruginosa* Colistine-R

Nombre de laboratoires concernés* : 933

Nombre de laboratoires participants** : 913

* Laboratoires ayant déclaré à l'Ansm pratiquer au moins une des analyses concernées par l'envoi

** Laboratoires ayant saisi leurs résultats sur internet avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

Cette opération de contrôle comportait deux souches lyophilisées à identifier : *Propionibacterium acnes* et *Finegoldia magna*, bactéries anaérobies commensales de la peau qui ont en commun d'être les deux espèces les plus fréquemment isolées dans les infections ostéo-articulaires à anaérobies (respectivement 32% et 21% des 61 cas répertoriés dans une étude récente du CIOA Sud Méditerranée).

On note une nette amélioration de l'identification de *P. acnes*, par rapport au dernier envoi en 2004, avec 82% de diagnostic exact d'espèce (+15%). Quant à l'espèce *F. magna*, moins connue des biologistes et proposée pour la première fois dans le cadre du CNQ, trois quarts des LBM participants l'ont correctement identifiée. Cette espèce, anciennement appelée *Peptostreptococcus magnus*, fait partie des cocci à Gram positif anaérobies dont la nomenclature a subi de nombreux changements ces dernières années.

Cette opération de contrôle comportait également une souche de *Pseudomonas aeruginosa* lyophilisée pour antibiogramme. Cette souche, résistante à la colistine, a été spécifiquement choisie dans le but d'évaluer la capacité des LBM à détecter ce type de résistance. Les réponses, tous réactifs confondus, des LBM participants montrent près d'un tiers de fausses réponses « sensible ».

Ces résultats sont l'occasion d'une part, de rappeler aux biologistes que seule la mesure de la CMI peut être utilisée pour tester la sensibilité à cet antibiotique et d'autre part, de montrer que dans le cas de la colistine, certaines méthodes de détermination de la CMI ne sont pas robustes ; seule la technique de microdilution en milieu liquide est recommandée.

Identification bactérienne

Définition des échantillons

Bactérie (origine)	N° des échantillons	Renseignements cliniques
<i>Propionibacterium acnes</i> (CHU Reims, C. de Champs)	119, 277, 373, 428, 500, 692,736, 841.	Bactérie isolée <u>après quelques jours de culture en anaérobiose</u> d'une ponction de hanche et de l'ensemble des prélèvements opératoires chez un patient de 75 ans porteur d'une prothèse de hanche droite depuis 6 mois. La ré-intervention est motivée par une douleur modérée et une sensation d'instabilité de la hanche avec suspicion de descellement.
<i>Fingoldia magna</i> (CHU Reims, C. de Champs)	174, 183, 315, 461, 555, 598, 820, 932.	

Résultats des participants

Le bilan des identifications bactériennes transmises par les laboratoires participants est présenté dans le tableau I. Les techniques d'identification (MALDI-TOF, automate, galerie, biologie moléculaire) ainsi que les réactifs utilisés sont détaillés dans les tableaux II et III.

Les résultats de la coloration de Gram sur les colonies isolées de l'échantillon sont rassemblés dans le tableau IV. Les réponses attendues ou acceptables apparaissant en gras.

Enfin, les résultats obtenus lors des deux envois précédents d'une souche de *Propionibacterium acnes* sont rapportés dans le tableau V. C'était la première fois qu'une souche de *Fingoldia magna* (anciennement *Peptostreptococcus magnus*) était proposée dans le cadre du CNQ.

tableau I - identification des souches bactériennes : fréquence des résultats

Réponse attendue	Genre exact				Genre faux	Absence de diagnostic	Total
	espèce exacte	espèce fautive	espèce non précisée	total			
<i>P. acnes</i>	347 (81,8%)	7 (1,7%)	5 (1,2%)	359 (84,7%)	24 (5,7%) ^(a)	41 (9,6%)	424
<i>F. magna</i>	320 (75,3%)	4 (1,0%) ^(b)	35 (8,2%) ^(c)	359 (84,5%)	40 (9,4%) ^(d)	26 (6,1%)	425

^(a) : dont 8 cocci à Gram positif anaérobies

^(b) : *Peptostreptococcus anaerobius*, ^(c) : *Peptostreptococcus sp.*, ^(d) : dont 12 *Anaerococcus prevotii* et 7 *Alloiooccus otitis*

tableau II - technique ou combinaison de techniques utilisée(s) selon la souche à identifier

MALDI-TOF	automate	galerie	PCR	<i>P. acnes</i>	<i>F. magna</i>
	X			173	200
X				110	102
		X		59	64
	X	X		20	12
X	X			14	8
X			X	2	-
X		X		1	2
X	X	X		-	2
	X		X	-	1
X	X		X	1	1
Non précisé				25	23

tableau III - détail des réactifs utilisés dans chaque technique selon la souche à identifier

	<i>P. acnes</i>	<i>F. magna</i>
MALDI-TOF		
Bruker	78	72
BioMérieux Vitek MS	39	36
Andromas	5	2
Non précisé (NP)	6	5
Automate		
Biomérieux Vitek 2 ANC	192	203
Biomérieux Vitek 2 GP	14	16
Biomérieux Vitek 2 GN	1	1
Becton Dickinson Phoenix	1	1
Beckman Rapid Anaérobie ID	-	2
Non précisé	-	1
Galerie biochimique		
Biomérieux API 20 A	27	30
Biomérieux API Rapid ID 32 A	23	36
Biomérieux API Coryne	13	1
Biomérieux API 20 E	1	1
Biomérieux API Rapid ID 20 E	1	-
Biomérieux API Rapid ID 32 STREP	-	1
Biomérieux API STAPH	-	1
Oxoid RapID ANA II (Remel)	11	7
Elitech ELLchrom Coryne	1	-
Becton Dickinson BBL Crystal Gram positif	1	-
Becton Dickinson BBL Crystal anaérobies	-	1
Non précisée	2	2

tableau IV - coloration de Gram sur les cultures bactériennes : fréquence des résultats (%)

	Bacilles Gram +	Cocci Gram +	Coccobacilles Gram +	Bacilles Gram -	Cocci Gram-	absence de réponse	total
<i>P. acnes</i>	364 (85,9)	13 (3,1)	12 (2,8)	8 (1,9)	1 (0,2)	26 (6,1)	424
<i>F. magna</i>	4 (0,9)	400 (94,2)	3 (0,7)	4 (0,9)	2 (0,5)	12 (2,8)	425

tableau V - bilan des trois opérations de contrôle « *Propionibacterium acnes* ».

année	effectif	espèce exacte (%)	espèce fausse (%)	espèce non précisée (%)	genre exact (%)	genre faux (%)	absence de diagnostic (%)
2016	424	81,8	1,7	1,2	84,7	5,7	9,6
2004	757	67	< 1	5	72	17	11
2001	785	63	1,5	5,5	70	19	11

Commentaires

Les infections ostéo-articulaires à bactéries anaérobies (IOA-ANA) sont rares. Elles surviennent suite à l'implantation de matériel étranger (ostéosynthèse, prothèse) et leur fréquence, longtemps sous-estimée, augmente grâce à l'amélioration de chacune des étapes conduisant à leur diagnostic : nombre et qualité des

prélèvements, sonication du matériel explanté, choix pertinent des milieux et des conditions de culture, incubation prolongée (14 jours) et techniques d'identification récentes : MALDI-TOF ou séquençage ARNr 16S. Les IOA-ANA sont majoritairement polymicrobiennes (anaérobie + aérobie ou deux anaérobies). Parmi les anaérobies isolés, *Propionibacterium acnes* est le plus fréquent, suivi par les cocci à Gram positif anaérobies tels que *Fingoldia magna*, *Peptinophilus sp.* et *Anaerococcus sp.*

1- *Propionibacterium acnes*

Cette bactérie anaérobie (aérotolérante) a été identifiée par près de 82% (espèce exacte) et 85 % (genre exact) des participants (tableau I). On note une nette amélioration par rapport à l'envoi précédent, en 2004, pour lequel les scores obtenus étaient respectivement de 67 et 72 % (tableau V).

Propionibacterium acnes est bien connu pour son rôle dans la pathogénèse de l'acné inflammatoire. Commensal de la flore cutanée, c'est un pathogène opportuniste qui peut être à l'origine d'infections post-chirurgicales liées à la pose de matériel étranger dues à sa capacité d'adhésion et de formation d'un biofilm autour de l'implant.

On le retrouve principalement dans les infections ostéo-articulaires tardives survenant 4 à 24 mois après la pose d'une prothèse ou ostéosynthèse (*P. acnes* est l'espèce anaérobie la plus fréquemment retrouvée dans ce type d'infections) en particulier au niveau de l'épaule et des vertèbres. Il est également à l'origine d'infections cardiovasculaires sur matériel étranger : prothèses valvulaires, pacemaker, défibrillateur automatique implantable. Enfin, il aurait un rôle (infection subclinique) dans les contractures capsulaires modérées à sévères qui sont une complication locale de la pose d'implants mammaires.

Le genre *Propionibacterium* tient son nom de l'acide propionique (mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse) qu'il produit majoritairement lors du métabolisme du glucose.

Cette espèce autrefois connue sous le nom de *Corynebacterium acnes* (aspect au Gram : bacilles à Gram positif corynéformes) a été rattachée dans les années 70 au groupe des bacilles à Gram positif anaérobies non sporogènes.

Les principaux caractères d'identification de *Propionibacterium acnes* sont rassemblés ci-dessous :

- croissance lente sur gélose au sang, en anaérobiose à 37°C.
- petites colonies blanches avec une β -hémolyse variable.
- **bacille à Gram positif**, non sporulé, **diphitérimorphe**.
- **catalase-positif**, **anaérobie** aérotolérant.
- nitrate réductase (+), **indole (+)**, esculine (-).
- fermente le glucose, le glycérol et le ribose
- **ne fermente pas le maltose, le saccharose**, le lactose, le mannitol et le xylose.

La souche testée a été parfaitement reconnue par les 3 systèmes MALDI-TOF (Bruker, Vitek MS, Andromas) actuellement commercialisés.

Le Vitek 2 (carte ANC : Anaérobies Corynébactéries) est le moyen d'identification majoritairement utilisé. Trois espèces du genre *Propionibacterium* font partie de la base de données de la carte ANC : *P. acnes*, *P. granulosum* et *P. propionicum*. L'identification de la souche n'a pas posé de problème. Néanmoins, sept participants ont rendu « *P. granulosum* » (pour rappel, cette espèce contrairement à *P. acnes*, est indole (-), nitrate réductase (-) et fermente le maltose et le saccharose), trois participants n'ayant pas pu identifier précisément l'espèce ont rendu « *Propionibacterium sp.* ». On note également six identifications inexplicables d'un genre différent de *Propionibacterium* : *Atopobium* (2), *Anaerococcus prevotii* (2), *Fusobacterium* (1) et *Clostridium* (1).

Les galeries pour anaérobies (API rapid ID 32A, API 20A et rapID ANA II) ont conduit à 100% d'identifications exactes. En revanche, la galerie API Coryne utilisée seule par six LBM a conduit à deux diagnostics incorrects (*Brevibacterium sp.* et *Corynebacterium sp.*). Cette galerie est sans doute plus adaptée aux corynébactéries classiques.

2- *Fingoldia magna*

La taxonomie des cocci anaérobies à Gram positif (GPAC) a subi de profonds changements ces dernières années. Auparavant, on distinguait deux genres principaux : les *Peptostreptococcus* et les *Peptococcus*. En 1983, quatre espèces du genre *Peptococcus* (*P. asaccharolyticus*, *P. indolicus*, *P. prevotii* et *P. magnus*) ont été transférés dans le genre *Peptostreptococcus* laissant *P. niger* seule espèce du genre *Peptococcus*.

Depuis 1999, le genre *Peptostreptococcus* connaît de nombreux remaniements : *P. magnus* et *P. micros* sont transférés dans deux nouveaux genres, *Fingoldia magna* et *Micromonas micros*. Puis en 2006, le genre *Micromonas* est renommé *Parvimonas* avec *Parvimonas micra* comme seule espèce présente dans le genre.

Pour les autres *Peptostreptococcus*, trois nouveaux genres ont été proposés en 2001 : *Peptinophilus*, *Anaerococcus* et *Gallicola*. Les espèces qui restent attachées au genre *Peptostreptococcus* sont *P. anaerobius* ainsi que deux espèces récentes *P. stomatis* (2006) et *P. russellii* (2011).

Les principaux caractères d'identification de *Finegoldia magna* sont rassemblés ci-dessous :

- cocci à Gram positif en amas ou par deux (parfois courtes chainettes).
- croissance lente sur gélose au sang ou gélose chocolat, en anaérobiose ou sous 5% de CO₂, à 37°C.
- **ne fermente pas le glucose**
- catalase-positif, anaérobie strict.
- **β-glucuronidase (-)**, β-galactosidase (-), α-glucosidase (-).
- **Pyroglutamyl Arylamidase (+)**, **Proline Arylamidase (-)**, Arginine Arylamidase (+), Leucine Arylamidase (+)
- indole (-), uréase (-), nitrate réductase (-).

Finegoldia magna fait partie de la flore anaérobie de la peau, de la cavité buccale, du tractus gastro-intestinal et des voies génito-urinaires.

Parmi les GPAC, *F. magna* est probablement le plus pathogène. Cette espèce est isolée d'abcès des tissus mous, d'infections chroniques des plaies, d'endocardites infectieuses sur prothèse valvulaire et d'infections ostéo-articulaires. Pour ces dernières, on distingue deux entités cliniques : d'une part, l'infection post traumatique impliquant des patients avec des fractures ouvertes et d'autre part, l'infection nosocomiale post chirurgie orthopédique des membres inférieurs (pose de prothèse de hanche ou de genou rapidement suivie de douleur, fièvre modérée et inflammation locale). Un autre tableau clinique décrit est l'infection dans le mois qui suit une reconstruction du ligament croisé antérieur.

La souche testée a été parfaitement reconnue par les 3 systèmes MALDI-TOF actuellement commercialisés à l'exception d'une réponse « *Peptostreptococcus sp* » pour un utilisateur du Vitek MS et d'une réponse « *Streptococcus* groupe *mitis* » pour un utilisateur du système Bruker Maldi Biotyper.

En ce qui concerne les automates, le Vitek 2 / carte ANC (Anaérobies Corynébactéries) est le moyen d'identification majoritairement utilisé. Avec cette carte, seuls huit participants ont identifié un GPAC autre que *F. magna*. En revanche, les sept identifications erronées « *Alloiococcus otitis* » sont dues à l'utilisation inappropriée de la carte GP (Gram positifs). Enfin, on note que les deux utilisateurs de la carte Rapid AnaID (automate Beckman) ont rendu « *Peptostreptococcus sp.* ».

Les performances des galeries pour anaérobies (API rapid ID 32A, API 20A, rapid ANA II) sont variées. La galerie API 20A conduit à « *Peptostreptococcus sp.* » et la galerie rapid ID 32A conduit dans près de la moitié des cas à une identification inexacte « *Anaerococcus prevotii* » (autre GPAC). Quant à la galerie rapid ANA II, parmi les sept utilisateurs, six ont rendu « *F. magna* » et un « *Peptostreptococcus sp.* ». Enfin, l'unique utilisateur d'une galerie BBL Crystal a conclu « *Peptinophilus asaccharolyticus* » (autre GPAC).

Bibliographie

Walter J, Vernier M, Pinelli PO, Million M, Coulange M, Seng P, Stein A. Bone and joint infections due to anaerobic bacteria : an analysis of 61 cases and review of the literature. Eur J Microbiol Infect Dis, 2014, 33(8) : 1355-64.

Murphy EC, Frick IM. Gram positive anaerobic cocci - commensals and opportunistic pathogens, FEMS Microbiol Rev, 2013, 37(4) : 520-53.

Levy P-Y, Fenollar F, Stein A, Borriero F, Raoult D. *Finegoldia magna* : a forgotten pathogen in prosthetic joint infection rediscovered by molecular biology, Clin Inf Dis, 2009, 49 : 1244-7.

Antibiogramme *Pseudomonas aeruginosa*

Définition de l'échantillon

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* adressée aux LBM était résistante à la colistine. Elle a été fournie par le CNR de la résistance aux antibiotiques (CHRU Besançon), avec pour objectif de pouvoir évaluer la capacité des LBM à détecter ce type de résistance.

Il était demandé aux laboratoires participants de tester la sensibilité de la souche isolée vis-à-vis de 16 antibiotiques définis. Pour chaque antibiotique testé, le résultat « lu » permet de contrôler la qualité technique de l'antibiogramme tandis que le résultat « transmis » correspond à l'interprétation de l'antibiogramme par le biologiste en présence d'un éventuel mécanisme de résistance.

Les laboratoires devaient également préciser le phénotype de résistance aux β -lactamines détecté en choisissant parmi les sept phénotypes suivants : phénotype sauvage, pénicillinase, surproduction de céphalosporinase AmpC, BLSE, carbapénémase, efflux, porine OprD déficiente.

En complément des résultats (S, I ou R) de l'antibiogramme, les laboratoires qui utilisent la méthode de diffusion en milieu gélosé (disques) devaient rapporter les diamètres d'inhibition obtenus pour cinq antibiotiques (ceftazidime, céfépime, aztréonam, ciprofloxacine, lévofloxacine), tandis que ceux qui déterminent les CMI devaient préciser celles obtenues pour deux antibiotiques (colistine, fosfomycine).

Les résultats des experts - Dr K. JEANNOT, Besançon, Pr C. de CHAMPS, Reims et Pr G. LINA, Lyon - sont présentés dans le tableau VI.

tableau VI - antibiogramme : résultats des experts

Antibiotiques	Résultat lu	Résultat transmis
1- Ticarcilline	S	S
2- Ticarcilline + ac. clavulanique	S	S
3- Pipéracilline	S	S
4- Pipéracilline + tazobactam	S	S
5- Ceftazidime	S	S
6- Céfépime	S	S
7- Imipénème	S	S
8- Méropénème	S	S
9- Aztréonam	I/S ^(a)	I/S
10- Gentamicine	R	R
11- Tobramycine	R	R
12- Amikacine	R	R
13- Ciprofloxacine	S ^(b)	S
14- Lévofloxacine	S/I ^(c)	S/I
15- Colistine	R ^(d)	R
16- Fosfomycine	S	S

(a) : "S" selon le CA-SFM 2013, "I" depuis le CA-SFM 2014 (car la concentration critique inférieure est établie afin que les souches sauvages soient rendues "I")

(b) : CMI E test = 0,25-0,5 mg/L

(c) : CMI E test = 1 mg/L

(d) : CMI méthode de référence (microdilution en milieu liquide) = 16-32 mg/L, CMI Etest = 6-8 mg/L

Résultats des participants

Les réactifs utilisés dans les laboratoires pour la réalisation de l'antibiogramme d'un *Pseudomonas aeruginosa* en 2016 sont détaillés dans le tableau VII. On remarque que la part des automates, en particulier le Vitek de BioMérieux est prépondérante, devant la méthode de diffusion (disques) utilisée par près d'un tiers des laboratoires.

tableau VII - antibiogramme *P. aeruginosa* : réactifs utilisés

Techniques / Réactifs	16BAC1
Galleries	6,4%
ATB PSE EU bioMérieux	45
ATB G- EU bioMérieux	7
ATB UR EU bioMérieux	4
Automates	60,4%
Vitek 2 bioMérieux :	
carte AST-N240	464
autres cartes	8
MicroScan Walkaway Beckman Coulter	25
Phoenix Becton Dickinson	32
Disques	32%
BioRad	176
I2a	68
Oxoid	36
Réactif non précisé	1,2%
Total	876

Les résultats obtenus, tous réactifs confondus, sont détaillés le tableau VIII (la réponse attendue pour chaque antibiotique apparaît en gras). Le phénotype de résistance aux β -lactamines détecté est rapporté dans le tableau IX.

tableau VIII - antibiogramme : résultats des participants

Antibiotiques	Lus				Transmis			
	n	S (%)	I (%)	R (%)	n	S (%)	I (%)	R (%)
ticarcilline	478	93,3	0,4	6,3	473	92,6	0,6	6,8
ticarcilline+ac.clavulanique	832	90,6	6,5	2,9	817	84,5	11,6	3,9
pipéracilline	835	92,3	7,1	0,6	822	87,4	11,4	1,2
pipéracilline+tazobactam	854	92,6	7,2	0,2	838	87,6	11,7	0,7
ceftazidime	863	99,0	0,5	0,5	849	98,9	0,5	0,6
céfépime	843	95,1	3,9	1,0	827	97,3	1,6	1,1
imipénème	860	99,8	0,1	0,1	846	99,8	0,0	0,2
méropénème	754	99,6	0,1	0,3	743	99,6	0,1	0,3
aztréonam	771	15,6	84,0	0,4	755	15,9	83,6	0,5
gentamicine	855	1,1	0,0	98,9	839	1,4	0,0	98,6
tobramycine	851	4,1	0,1	95,8	836	4,4	0,4	95,2
amikacine	857	1,6	0,7	97,7	841	2,0	1,0	97,0
ciprofloxacine	864	92,6	6,9	0,5	848	91,4	7,8	0,8
lévofloxacine	711	49,8	44,3	5,9	696	49,1	41,1	9,8
colistine	498	31,1	4,2	64,7	475	31,6	3,8	64,6
fosfomycine	239	85,8	0,4	13,8	232	84,9	0,4	14,7

tableau IX - phénotype de résistance aux β -lactamines : réponses des participants

phénotype sauvage	pénicillinase	surproduction Case	BLSE	carbapénémase	efflux	OprD déficiente	Effectif (%)
X							623 (76,0)
					X		89 (10,9)
X					X		11 (1,3)
	X						55 (6,7)
	X				X		14 (1,7)
X	X						7 (0,9)
						X	4 (0,5)
	X			X			4 (0,5)
	X	X					3 (0,4)
				X			2 (0,2)
		X					2 (0,2)
X	X				X		1 (0,1)
X	X	X					1 (0,1)
			X				1 (0,1)
	X		X		X		1 (0,1)
	X		X	X			1 (0,1)
		X			X		1 (0,1)

En ce qui concerne les diamètres d'inhibition relevés par les participants qui utilisent la méthode des disques, les paramètres statistiques pour chaque antibiotique (effectif, moyenne et écart-type) ont été calculés à partir des données fournies. Ils ont ensuite été recalculés après une troncature à 2 écart-types (opération consistant à éliminer les valeurs situées au-delà de 2 écart-types de part et d'autre de la moyenne).

De plus, pour chaque antibiotique, deux groupes de résultats ont été distingués et traités séparément : d'une part, ceux obtenus par les laboratoires ayant suivi comme référentiel le CA-SFM 2013 et d'autre part, ceux obtenus par les laboratoires ayant suivi le CA-SFM 2014 ou 2015 ou 2016.

L'ensemble des paramètres statistiques obtenus pour la souche est rapporté dans le tableau X. Les distributions des diamètres d'inhibition relevés tous réactifs confondus sont représentées figures 1 à 10.

Enfin, les distributions des CMI de la colistine rapportées par les participants, en fonction du référentiel utilisé sont illustrées par les figures 11 et 12.

tableau X - diamètres d'inhibition (mm) tous réactifs confondus selon le référentiel utilisé

Antibiotique (Référentiel)	d-D *	Effectif	Effectif tr **	Moyenne tr **	ET tr **
Ceftazidime (CASFM 2014-15-16)	16-16	235	223	30,6	3,5
Ceftazidime (CASFM 2013)	19-19	88	85	35,0	4,1
Céfépime (CASFM 2014-15-16)	19-19	227	217	27,4	3,7
Céfépime (CASFM 2013)	19-19	78	76	30,5	4,8
Aztréonam (CASFM 2014-15-16)	16-50	221	214	33,8	3,5
Aztréonam (CASFM 2013)	19-27	82	78	35,3	3,9
Ciprofloxacine (CASFM 2014-15-16)	22-25	232	222	30,1	2,7
Ciprofloxacine (CASFM 2013)	22-25	86	81	32,6	3,0
Lévofloxacine (CASFM 2014-15-16)	17-20	152	144	23,7	2,2
Lévofloxacine (CASFM 2013)	17-20	33	32	25,5	3,5

d-D * : diamètres critiques, ** : troncature à 2 écart-types (opération consistant à éliminer les valeurs situées au-delà de 2 ET de part et d'autre de la moyenne)

figure 1 : *P. aeruginosa* / ceftazidime
CA-SFM 2013 (n : 91)

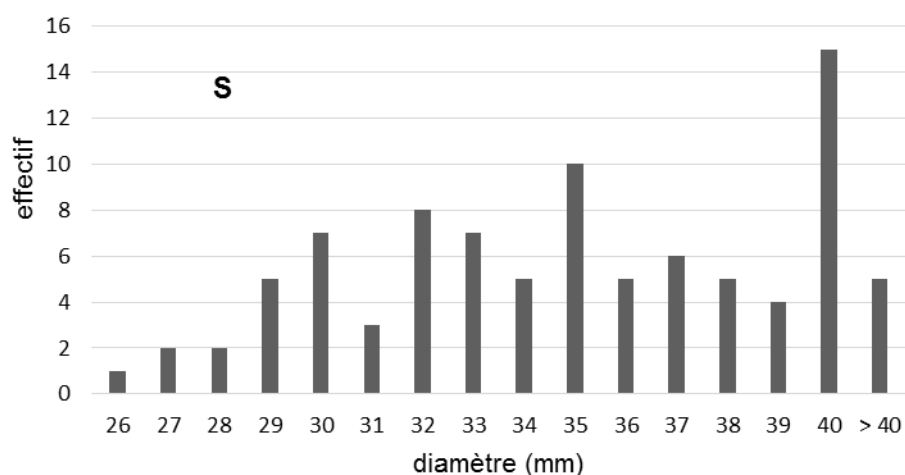


figure 2 : *P. aeruginosa* / ceftazidime
CA-SFM 2014-2015-2016 (n : 235)

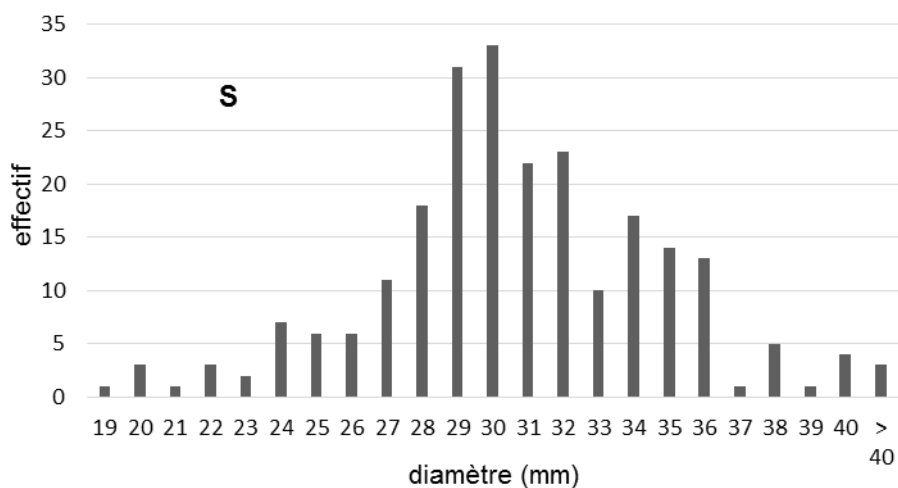


figure 3 : *P. aeruginosa* / céfépime
CA-SFM 2013 (n : 78)

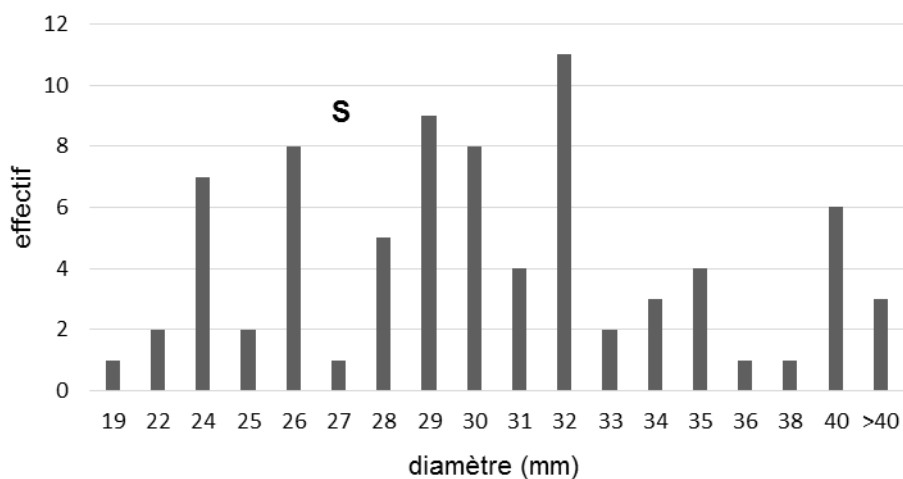


figure 4 : *P. aeruginosa* / céfépime
CA-SFM 2014-2015-2016 (n : 227)

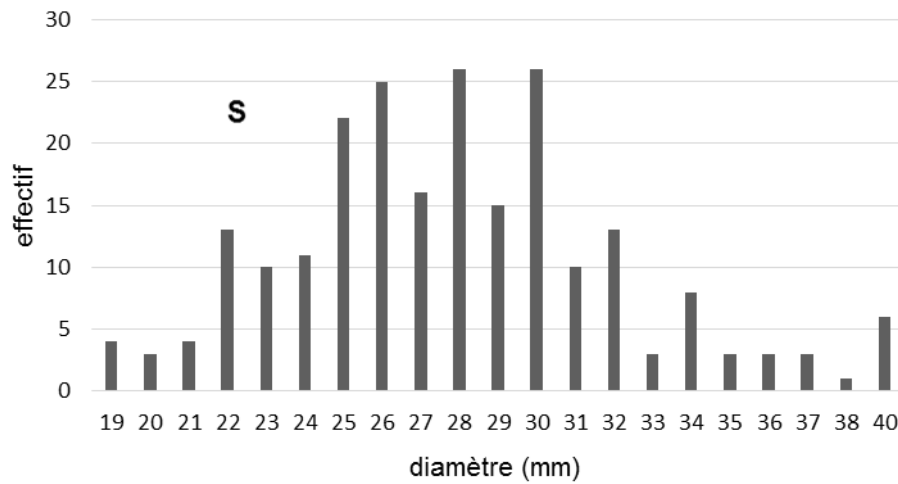


figure 5 : *P. aeruginosa* / aztréonam
CA-SFM 2013 (n : 82)

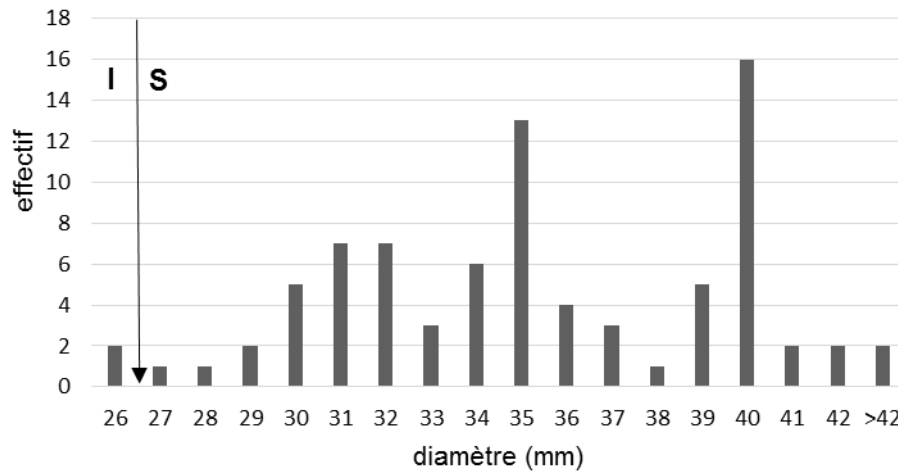


figure 6 : *P. aeruginosa* / aztréonam
CA-SFM 2014-2015-2016 (n : 221)

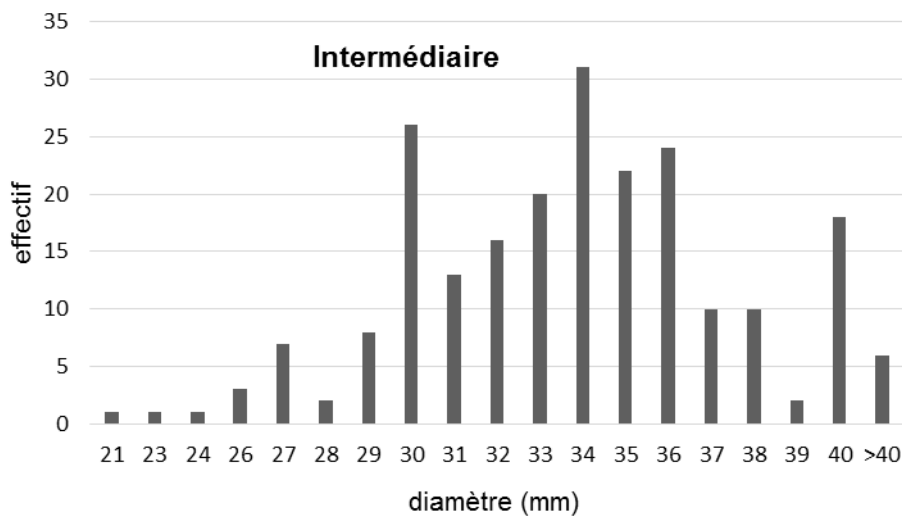


figure 7 : *P. aeruginosa* / ciprofloxacine
CA-SFM 2013 (n : 86)

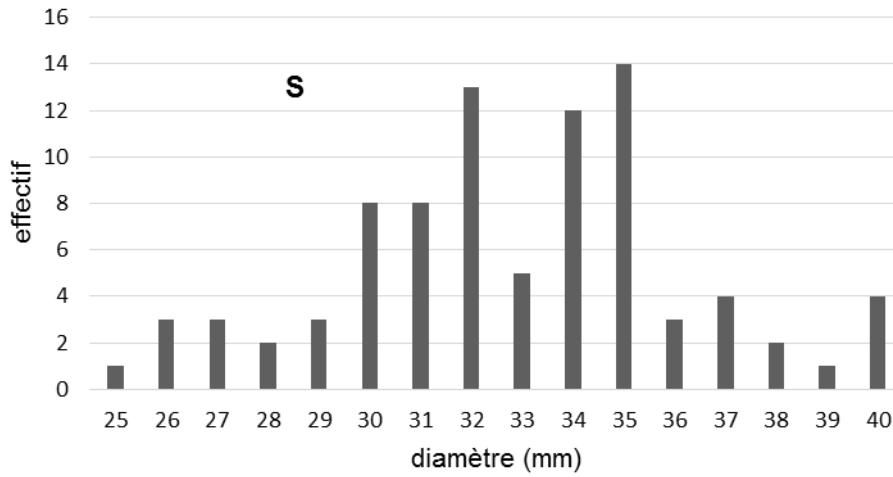


figure 8 : *P. aeruginosa* / ciprofloxacine
CA-SFM 2014-2015-2016 (n : 232)

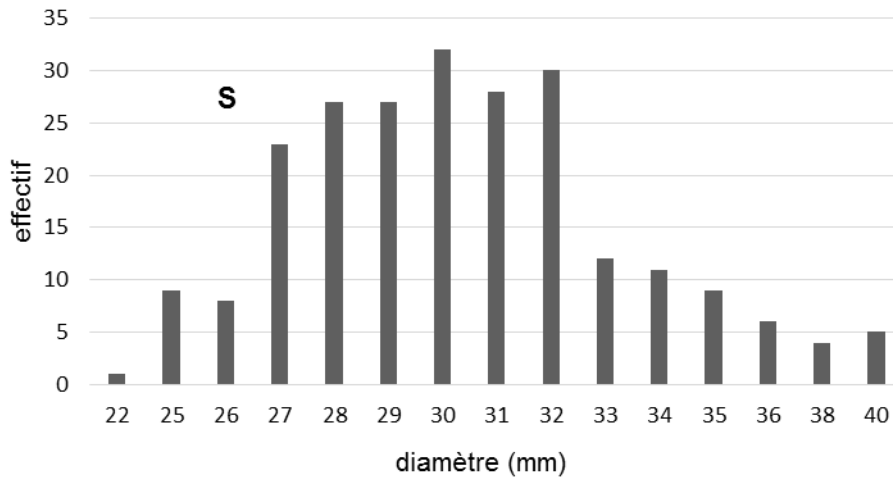


figure 9 : *P. aeruginosa* / lévofloxacine
CA-SFM 2013 (n : 33)

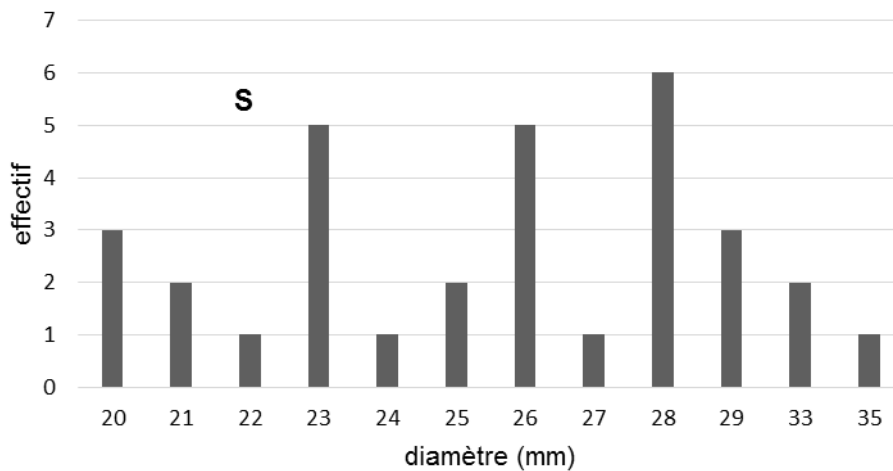


figure 10 : *P. aeruginosa* / lévofloxacine
CA-SFM 2014-2015-2016 (n : 152)

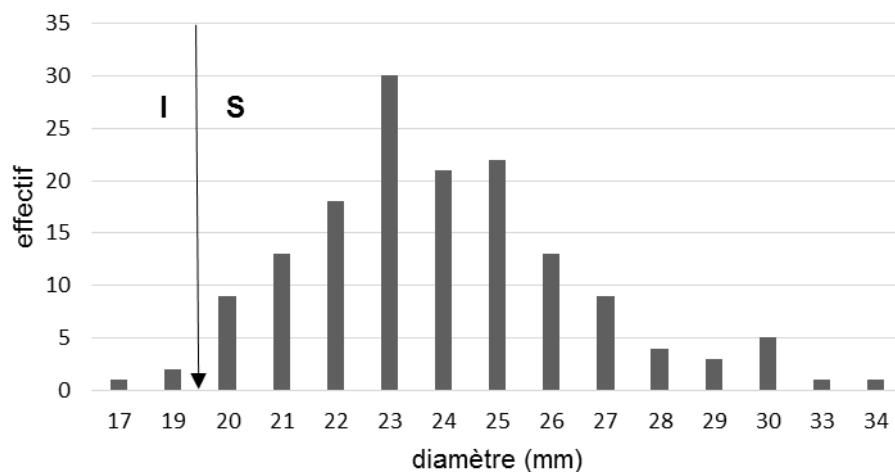


figure 11 : *P. aeruginosa* / CMI colistine
CA-SFM 2013 (n : 25)

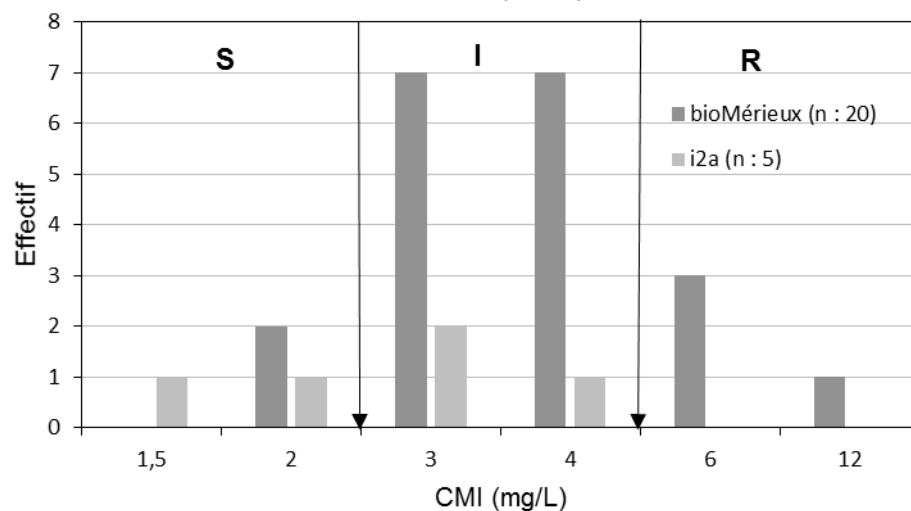
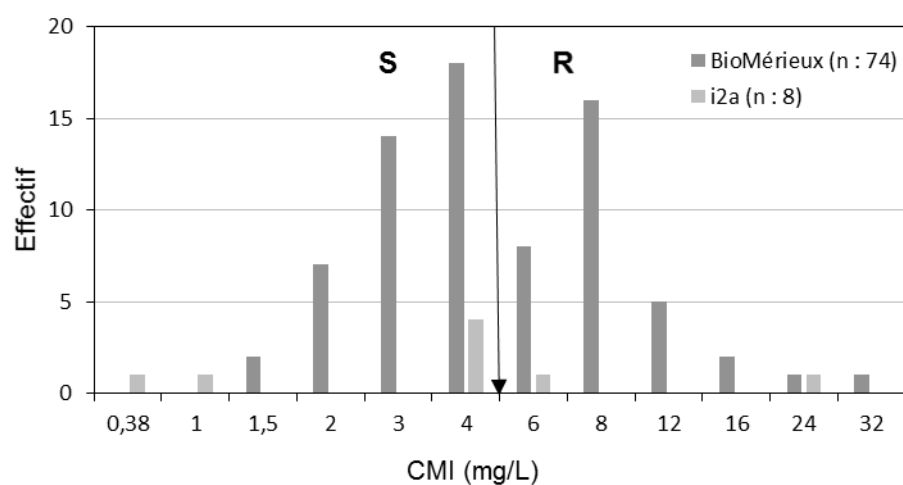


figure 12 : *P. aeruginosa* / CMI colistine
CA-SFM 2014-2015-2016 (n : 82)



Commentaires

Bêta-lactamines :

La souche était sensible à la ticarcilline. Les 6% de réponses « R » sont dues à 23 utilisateurs (sur 464) du Vitek 2. La majorité d'entre eux n'ont pas rendu de résultat car la carte AST-N240 n'est pas validée pour cet antibiotique et aucune CMI n'apparaît pour les bactéries du genre *Pseudomonas*. Toutefois, si cette règle est désactivée par le laboratoire, la CMI est rendue égale à 32 mg/L et la souche est catégorisée « R ».

La souche était également sensible à la pipéracilline (CMI Etest égale à 4 mg/L) ainsi qu'aux associations ticarcilline/acide clavulanique et pipéracilline/tazobactam. Cependant, on observe en moyenne 11% de réponses transmises « Intermédiaire » qui sont dues à 94 utilisateurs du Vitek. Ceci est dû au fait que la CMI de la pipéracilline rendue par le Vitek 2 peut-être égale à 8 ou 16 mg/L. Dans le premier cas, les trois antibiotiques sont catégorisés « S ». En revanche, si la CMI de la pipéracilline est égale à 16 mg/L, alors le système expert AES rend « résultat en faveur d'une pénicillinase » et effectue une correction thérapeutique de « S » en « I ».

La sensibilité de la souche aux deux céphalosporines (ceftazidime et céfépime) ainsi qu'aux deux carbapénèmes (imipénème et méropénème) de la liste standard a été correctement détectée par respectivement 99%, 97,3%, 99,8% et 99,6% des participants. En ce qui concerne le céfépime, les réponses « intermédiaire » (3,9% des résultats bruts et 1,6% des résultats transmis) sont dues à une partie des utilisateurs de la galerie ATB PSE EU. Sur cette galerie, le résultat brut « I » est corrigé par le système expert en « S ». Quelques LBM n'ont pas appliqué la correction.

Pour l'aztréonam, on note 84% « I » et 16% « S ». La réponse attendue était « I » (CMI Etest = 2 mg/L). Néanmoins, lorsque la souche est testée en diffusion selon le CA-SFM 2013, le diamètre d'inhibition obtenu avec l'aztréonam est de 35 mm et la souche est catégorisée « S » car les diamètres critiques selon ce référentiel de 2013 sont fixés à 19 et 27 mm (figure 5). Depuis 2014, le CA-SFM a fixé arbitrairement à 50 mm (« hors échelle ») le diamètre critique supérieur afin que toutes les souches sauvages soient catégorisées « intermédiaire » (figure 6).

Aminosides :

La souche était résistante aux trois aminosides de la liste standard. Testée par les experts, selon le CA-SFM 2016, les diamètres d'inhibition obtenus en diffusion, pour la gentamicine, l'amikacine et la tobramycine étaient respectivement de 7, 11 et 13 mm ; tandis que les CMI rendues par le Vitek 2 étaient respectivement ≥ 16 , ≥ 64 et égale à 8 mg/L.

Cette résistance a été détectée par respectivement 98,9%, 97,7% et 95,8% des participants.

Les utilisateurs de l'automate Phoenix ou de la galerie ATB PSE ont tous rendu « R ». Les réponses discordantes « sensible » ont été obtenues par quelques LBM utilisateurs du Vitek 2 ou de la diffusion en gélose :

- gentamicine « S » : 9 LBM (6 Vitek et 3 diffusion)
- amikacine « S » : 14 LBM (7 Vitek et 7 diffusion)
- tobramycine « S » : 34 LBM (9 Vitek et 25 diffusion)

Aucune explication n'a été trouvée. L'existence possible d'une 2^{ème} population plus sensible aux aminosides a été évoquée.

Fluoroquinolones :

En ce qui concerne les fluoroquinolones, la réponse attendue était « sensible » pour la ciprofloxacine et « sensible / intermédiaire » pour la lévofloxacine.

Pour la ciprofloxacine (CMI Etest = 0,25-0,5 mg/L), on note 92,6% de résultats lus « S » et 6,9% « I ».

L'ensemble des utilisateurs du Phoenix ont rendu « S ». De même, les utilisateurs de la méthode des disques ont obtenu un diamètre d'inhibition moyen égal à 33 mm (CA-SFM 2013) ou à 30 mm (CA-SFM 2014/2015/2016) ce qui permet de catégoriser la souche « sensible » dans les deux cas car le diamètre critique supérieur est fixé à 25 mm (figures 7 et 8). Les réponses « intermédiaire » (6,9%) proviennent :

- soit du Vitek 2 (88,4% « S » et 11% « I ») car la CMI rendue par l'automate est égale à 0,5 mg/L (« S ») dans la majorité des cas, mais peut-être rendue ponctuellement égale à 1 mg/L (« I »),
- soit de la galerie ATB PSE (82% « S » et 18% « I ») car pour cet antibiotique, il y a deux lignes (une « CA-SFM » et une « EUCAST ») avec, pour chacune, des concentrations testées différentes.

Sur la ligne « CA-SFM », la souche est « S » car elle ne pousse pas dans les deux concentrations (1 et 2 mg/L) testées. Sur la ligne « EUCAST » qui comporte un puits à 0,5 et un puits à 1 mg/L la souche est « I » car elle pousse dans le premier puits.

Pour la lévofloxacine, la CMI Etest égale à 1 mg/L est sur le « breakpoint ». Par conséquent, la réponse attendue est « S », mais à une dilution près la souche peut être catégorisée « I ».

L'ensemble des utilisateurs de la méthode des disques ont rendu « S » avec un diamètre d'inhibition moyen égal à 26 mm (CA-SFM 2013) ou à 24 mm (CA-SFM 2014/2015/2016) ce qui permet de catégoriser la souche « sensible » dans les deux cas car le diamètre critique supérieur est fixé à 20 mm (figures 9 et 10). Les réponses « intermédiaire » (44,3%) ou « résistant » (5,9%) proviennent :

- soit du Phoenix (30% « S » et 70% « I »)
- soit du Vitek 2 (34% « S », 58% « I » et 8% « R »)
- soit de la galerie ATB PSE (26% « S », 67% « I » et 7% « R ») pour laquelle une note indique « CMI surestimée : quelques colonies de *P. aeruginosa* peuvent apparaître « I » au lieu de « S » ou « R » au lieu de « I ».

Autres antibiotiques (colistine et fosfomycine) :

Ces deux antibiotiques font partie de la liste complémentaire des antibiotiques à tester sur un *Pseudomonas aeruginosa*.

Il était demandé aux LBM participants qui réalisent ces analyses, de déterminer spécifiquement les CMI de la colistine et de la fosfomycine, bien que le profil de résistance de la souche (phénotype sauvage, sensible aux bêta-lactamines) ne le justifiait pas.

En effet, concernant l'antibiogramme de cette souche, la seule difficulté portait sur la détection de la résistance à la colistine et le but de cette opération de contrôle était d'une part, de rappeler aux biologistes que seule la mesure de la CMI de la colistine peut être utilisée pour tester la sensibilité de la souche à cet antibiotique et d'autre part, de leur montrer que dans le cas de la colistine, certaines méthodes de détermination de la CMI ne sont pas fiables.

La colistine est un peptide polycationique qui interagit avec le lipopolysaccharide (LPS), entraînant une désorganisation de la membrane externe et une perméabilisation de la membrane cytoplasmique.

Le mécanisme de résistance à la colistine de la souche est associé à une modification des protéines senseurs PhoQ (substitution d'un acide aminé) et PmrB (substitution d'un acide aminé). L'altération de ces deux protéines aboutit à une augmentation de l'activité des deux systèmes à deux composants PhoPQ et PmrAB. Ces deux systèmes sont impliqués dans la régulation d'un opéron (appelé *arn*) codant la synthèse et le transport de molécules de 4-amino-4-deoxy-L-aminoarabinose (Ara4N) sur le lipide A. L'addition de molécules de Ara4N au niveau du lipide A conduit à une diminution des charges négatives du LPS et limite l'interaction des polymyxines avec la membrane externe ayant pour conséquence une augmentation de la résistance aux polymyxines.

Selon le CNR, la souche est résistante à la colistine avec une CMI égale à 16-32 mg/L en technique de référence (microdilution en milieu liquide) réalisée à plusieurs reprises et une CMI égale à 32 mg/L en macrodilution en milieu liquide (mode opératoire disponible à l'adresse suivante http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/CMI_colistinev3.pdf).

Il est clairement établi que la colistine diffuse mal en milieu gélosé. C'est pourquoi, la méthode des disques ne peut pas être utilisée pour tester la sensibilité à cet antibiotique (absence de diamètres critiques dans les recommandations du CA-SFM).

En pratique, en cas d'utilisation thérapeutique, il est nécessaire de déterminer la CMI. Il faut noter que depuis 2014, une concentration critique unique fixée à 4 mg/L est utilisée (CMI ≤ 4 mg/L => « S » et CMI > 4 mg/L => « R »), alors qu'en 2013 les concentrations critiques étaient fixées à 2 et 4 mg/L (CMI ≤ 2 mg/L => « S » et CMI > 4 mg/L => « R »).

Là encore, les méthodes utilisant une gélose (diffusion en gélose de type bandelette E-Test ou dilution en gélose) ne sont pas recommandées pour mesurer la CMI, du fait d'un risque élevé de sous-estimation de la CMI avec pour corollaire un pourcentage non négligeable de souches catégorisées « S » au lieu de « R ».

Seule la microdilution en milieu liquide (BMD) donne des résultats fiables à condition de respecter quelques contraintes : utiliser du sulfate de colistine, un bouillon Muller Hinton avec des concentrations calibrées en cations (Ca²⁺ et Mg²⁺) et non supplémenté en polysorbate-80 ou autre surfactant, des plaques de polystyrène non traitées....). Deux réactifs permettant de mesurer la CMI selon cette technique sont disponibles : UMIC de Biocentric et Sensititre de Trek Diagnostic.

En ce qui concerne les résultats des LBM participants, on note, tous réactifs confondus, les résultats suivants : 65% « R », 4% « I » et 31% « S », soit près d'un tiers de fausses réponses « sensible » (tableau VIII).

Les automates Phoenix et MicroScan rendent « CMI > 4 mg/L » et catégorisent la souche « R », tandis que pour Vitek 2, la carte AST-N240 indique dans la majorité des cas qu'une croissance ralentie de la souche dans les puits empêche l'algorithme de calcul de la CMI de fonctionner. Lorsque la croissance est suffisante, la carte AST-N240 rend une CMI égale à 8 mg/L.

Une quarantaine de LBM ont rendu un résultat avec la galerie ATB PSE alors que d'une part, cette technique ne permet pas de mesurer la CMI et que d'autre part, les deux concentrations testées pour la colistine (2 mg/L et 4 mg/L) ne correspondent pas à la concentration critique (4 mg/L) fixée depuis 2014 par le CA-SFM.

Seuls 130 LBM ont déterminé précisément la CMI de la colistine, en majorité (96%) avec une bandelette (107 « Etest bioMérieux », 14 « i2a Liofilchem », 3 « MICE Oxoid », 1 « EzyMIC Eurobio »). Les résultats obtenus avec cette technique sont dispersés et inférieurs à ceux obtenus par la technique de référence (BMD) (figures 11 et 12), ce qui entraîne une catégorisation erronée « sensible » de la souche dans 48% des cas.

Trois LBM ont utilisé un des deux réactifs de microdilution en milieu liquide (2 UMIC et 1 Sensititre) et ont rendu une CMI égale à 8 mg/L. Deux LBM ont utilisé une technique « maison » : soit macrodilution (CMI > 8 mg/L), soit microdilution en milieu liquide (CMI = 64 mg/L).

En ce qui concerne la fosfomycine, la réponse attendue était « sensible ». Jusqu'en 2013, le CA-SFM indiquait pour cet antibiotique une concentration critique (32 mg/L) et, pour un disque chargé à 50 µg, un diamètre critique (14 mm). Depuis 2014, aucune concentration ni diamètre critique ne sont précisés. En revanche, il est indiqué d'une part, qu'une souche qui présente un diamètre de 6 mm autour d'un disque chargé à 200 µg est résistante et d'autre part, que des observations cliniques suggèrent que les infections dues à des souches pour lesquelles la CMI est ≤ 128 mg/L pourraient être traitées avec de la fosfomycine.

Cet antibiotique n'est pas testé par les automates. La galerie ATB PSE qui teste une concentration (32 mg/L) rend la souche « S ». La détermination précise de la CMI a été réalisée par 52 LBM uniquement par la technique des bandelettes. Dans 49 cas sur 52, la CMI mesurée est ≤ 128 mg/L avec une CMI médiane égale à 32 mg/L. Le laboratoire de contrôle de la société bioMérieux qui a testé la souche avec les bandelettes E-Test, majoritairement utilisées par les LBM participants, a trouvé une CMI égale à 8 mg/L et rappelle que la fosfomycine étant un antibiotique bactériostatique, la bordure de l'ellipse de la zone d'inhibition n'est pas franche (présence d'un dégradé de petites colonies). Par conséquent, la lecture doit se faire à 80% d'inhibition et ne doit pas tenir compte des petites colonies.

Phénotype de résistance aux bêta-lactamines :

La réponse « phénotype sauvage » rapportée par 76% des participants est considérée comme une bonne réponse. Toutefois, une surproduction du système d'efflux actif MexXY/OprM, relevée par 12% des participants, ne peut être exclue du fait d'une différence de sensibilité de la souche entre la ceftazidime et le céfépime (sensibilité diminuée du céfépime) et du niveau de sensibilité de la lévofloxacine (CMI = 1 mg/L) inférieure à celui d'une souche sauvage.

La réponse erronée « pénicillinase », la plus fréquente, est due comme nous l'avons vu plus haut, au système expert du Vitek qui rend « résultat en faveur d'une pénicillinase » lorsque la CMI de la pipéracilline est égale à 16 mg/L.

Les autres réponses fausses du type : « surproduction de céphalosporinase AmpC » (7 LBM), « carbapénèmase » (7 LBM), « porine OprD déficiente » (4 LBM) ou encore « BLSE » (3 LBM) sont inexplicables au vu du profil « sensible » de la souche aux bêta-lactamines et aux deux carbapénèmes (imipénème et méropénème).

Bibliographie

Janet A. Hindler, Romney M. Humphries. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. J Clinical Microb, 2013, 51, 6 : 1678-84.

Raquel Girardello, Paulo J. M. Bispo, Tiago M. Yamanaka and Ana C. Gales. Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences Polymyxin B susceptibility results. J Clinical Microb, 2012, 50, 7 : 2414-18.

Kaddy Barrow, Dong H. Kwon. Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with Polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemotherapy, 2009, 53, 12 : 5150-54.

Irith Wiegand, Kai Hilpert & Robert E W Hancock. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3, 2008, 163-175.

Aixin Yan, Ziqiang Guan, Christian RH Raetz. An Undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for Polymyxin resistance in *Escherichia coli*. J Biol Chem, 2007, 282, 49 : 36077-89.