

## Les principales méthodes phénotypiques et génotypiques

## Méthodes pour la détermination des résistances aux antibiotiques

PD Dr méd. Dr phil. Adrian Egli<sup>a,b</sup>; Prof. Dr méd. Gilbert Greub<sup>c</sup>, PhD, FAMH; Dr phil. nat. Franziska Suter-Riniker<sup>d</sup>; Prof. Dr méd. Jacques Schrenzel<sup>e,f</sup>

<sup>a</sup> Klinische Mikrobiologie, Universitätsspital Basel, Basel; <sup>b</sup> Applied Microbiology Research, Département Biomedizin, Universität Basel, Basel; <sup>c</sup> Institute de microbiologie, Centre hospitalier universitaire vaudois, Lausanne; <sup>d</sup> Institut für Infektionskrankheiten, Universität Bern, Bern; <sup>e</sup> Laboratoire de bactériologie, Hôpitaux Universitaires Genève, Genève; <sup>f</sup> Laboratoire de recherche génomique, Université de Genève, Genève



Une détermination rapide et fiable des résistances aux antibiotiques est indispensable pour la mise en place d'un traitement efficace et ciblé. La surveillance de la situation des résistances livre des informations essentielles pour la détermination du traitement empirique et aide à prendre des mesures destinées à éviter une plus large propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques.

## Introduction et contexte

Les bactéries multirésistantes constituent sans aucun doute l'un des plus grands défis pour notre société et les accomplissements de la médecine moderne. Les interventions chirurgicales simples, les chimiothérapies anticancéreuses, la guérison d'une pneumonie ainsi que bien d'autres aspects de la médecine hautement spécialisée, tels que les transplantations d'organes et de cellules souches, sont tributaires de l'efficacité des antibiotiques [1]. Sans contre-mesures efficaces, la propagation fulgurante des bactéries multirésistantes à travers le monde conduira à 10 millions de décès associés par an d'ici 2050, ce qui dépasse le nombre actuel de décès liés au cancer (O'Neill Report, Royaume-Uni, [www.amr-review.org](http://www.amr-review.org)). En raison de cette situation grave et menaçante, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a récemment publié une liste des dix principales bactéries multirésistantes pour lesquelles de nouveaux types d'antibiotiques devraient être développés en priorité (tab. 1).

Ces dernières années, des bactéries multirésistantes sont de plus en plus souvent trouvées en Europe et également en Suisse. Notamment les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE), les entérobactéries productrices de carbapénémases [2–4] ainsi que les entérocoques (*Enterococcus faecium*) résistants à la vancomycine (ERV) sont en augmentation ([www.bag.admin.ch](http://www.bag.admin.ch)). La problématique des *Staphylococcus (S.) aureus* résistants à la méticilline (SARM) est quant à elle en déclin [5] et a pu en grande partie être contrôlée au moyen de me-

sures d'hygiène hospitalière rigoureuses. Les isolats résistants de *Neisseria gonorrhoeae* ont également fortement augmenté ces dernières années [6], même si

**Tableau 1:** Liste prioritaire de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour les bactéries multirésistantes (adapté d'après [www.who.int](http://www.who.int)).

| Statut de priorité        | Pathogène                                                                                                         |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Priorité 1: critique      | <i>Acinetobacter baumannii</i> , résistants aux carbapénèmes                                                      |
|                           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , résistants aux carbapénèmes                                                       |
|                           | <i>Enterobacteriaceae</i> , résistants aux carbapénèmes ou producteurs de BLSE                                    |
| Priorité 2: élevée        | <i>Enterococcus faecium</i> , résistants à la vancomycine                                                         |
|                           | <i>Staphylococcus aureus</i> , résistants à la méticilline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine |
|                           | <i>Helicobacter pylori</i> , résistants à la clarithromycine                                                      |
|                           | <i>Campylobacter spp.</i> , résistants aux fluoroquinolones                                                       |
|                           | <i>Salmonella spp.</i> , résistants aux fluoroquinolones                                                          |
|                           | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , résistants aux céphalosporines                                                     |
| Priorité 3: intermédiaire | <i>Streptococcus pneumoniae</i> , insensibles à la pénicilline                                                    |
|                           | <i>Haemophilus influenzae</i> , résistants à l'ampicilline                                                        |
|                           | <i>Shigella spp.</i> , résistants aux fluoroquinolones                                                            |

BLSE: bêta-lactamases à spectre élargi

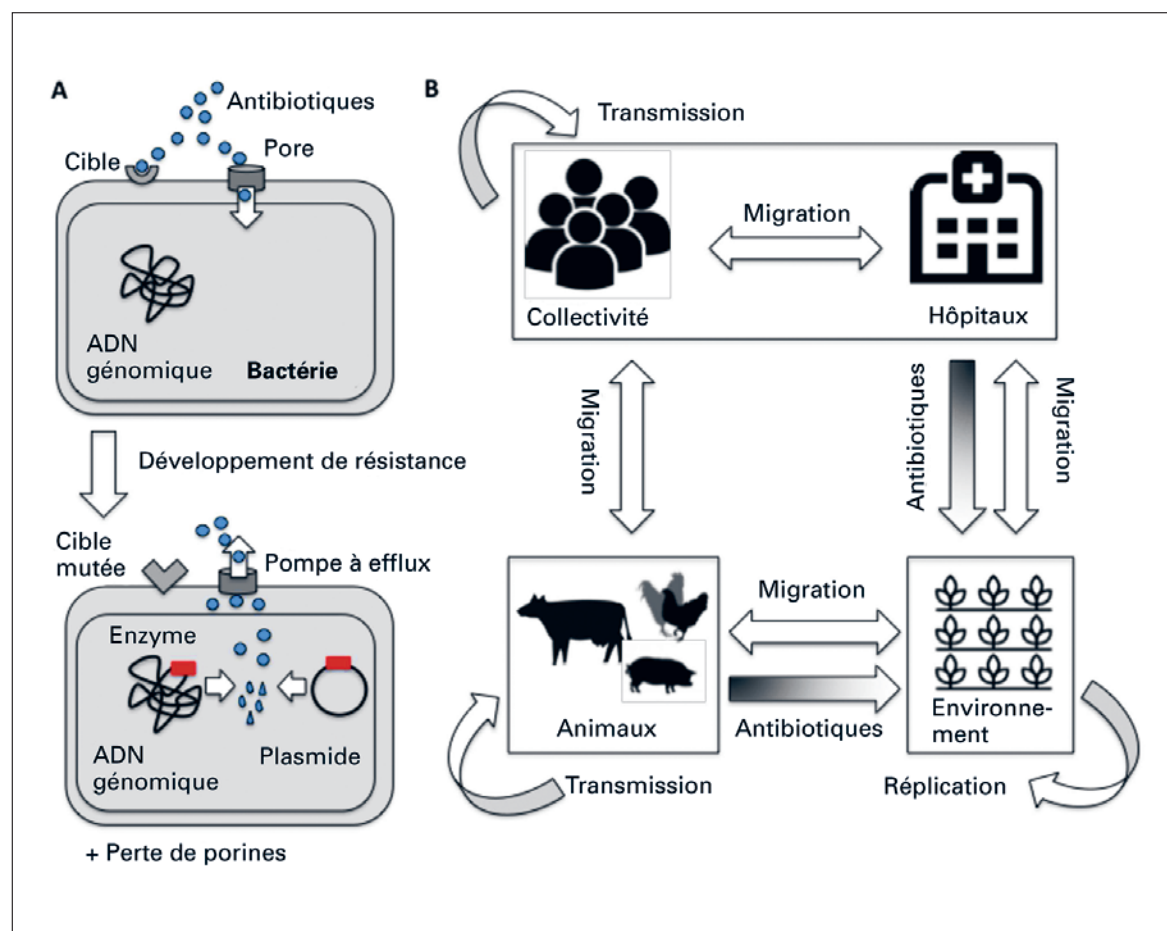


Adrian Egli

aucun cas pan-résistant n'a jusqu'à présent été déclaré en Suisse. Les données de surveillance des antibiotiques de toute la Suisse sont coordonnées et évaluées par Anresis ([www.anresis.ch](http://www.anresis.ch)) et en cas de nouvelles résistances aux antibiotiques, le Centre national de référence pour la détection précoce des résistances émergentes aux antibiotiques (NARA) se tient à ses côtés (<https://www.nara-antibiotic-resistance.ch>). L'industrie pharmaceutique et les institutions de référence ne sont pas les seules à être fortement sollicitées de toute urgence afin d'affronter cette crise. Dans le cadre du diagnostic microbiologique également, il est essentiel de détecter rapidement les nouvelles résistances aux antibiotiques et les résistances existantes avec des méthodes de test innovantes, peu coûteuses et fiables. Les collègues issus du domaine clinique devraient également être conscients de cette problématique. Dans ce contexte, la compréhension fondamentale des principaux mécanismes de résistance et de leur propagation revêt une importance de premier ordre.

## Les mécanismes de résistance les plus fréquents et leur propagation

L'antibiorésistance désigne la capacité des bactéries à s'adapter de façon évolutive et à résister à l'action des antibiotiques. Les bactéries résistantes peuvent également se multiplier et continuer à se propager en présence d'un antibiotique. Le développement d'une résistance aux antibiotiques peut (1.) survenir *de novo* via une pression de sélection correspondante d'un traitement antibiotique dont l'efficacité n'est pas optimale [7]. Dans ce cas, des mutations aléatoires (angl.: «*single nucleotide polymorphism*») sont intégrées dans le génome bactérien du grand nombre de bactéries présentes. Certaines de ces mutations conduisent à une résistance aux antibiotiques accrue, qui confère ainsi un avantage évolutif permettant à ces bactéries résistantes de s'imposer. Les bactéries peuvent également devenir résistantes via (2.) la transmission d'éléments génétiques mobiles, par ex. des plasmides portant la



**Figure 1:** Les résistances aux antibiotiques et leur propagation. (A) Représentation de l'évolution d'une bactérie avec ses quatre principaux mécanismes de défense, à savoir perte de porines, mutations des cibles, pompes à efflux et enzymes clivant les antibiotiques. (B) La propagation par les trois compartiments (homme, animal et environnement), la transmission et la réplication conduisent à un échange permanent.

propriété de résistance sur eux [8]. Ce processus a par exemple été décrit pour des plasmides portant la carbapénémase appelée New Delhi métallo-bêta-lactamase (NDM) et leur transfert [9].

En principe, il existe quatre possibilités pour l'acquisition d'une résistance aux antibiotiques (fig. 1A) [10, 11].

### *Modification de la structure cible*

La structure cible de l'antibiotique est modifiée de telle sorte que l'affinité de liaison pour la cible baisse de façon significative et que la liaison de l'antibiotique soit moins bonne. Un exemple en est la protéine de liaison aux pénicillines (PLP) modifiée en cas de SARM [12] ou d'*Haemophilus influenzae* [13]. Un problème croissant dans le contexte des bactéries multirésistantes est la résistance à la colistine, qui résulte de modifications du lipopolysaccharide (LPS), par substitution cationique dans la membrane cellulaire. Ces mutations peuvent être transmises via les plasmides («mobilized colistin resistance» [mcr]) ou par voie chromosomique [14].

### *Régulation positive des pompes à efflux*

Les pompes à efflux peuvent rapidement pomper les antibiotiques en dehors des cellules bactériennes, si bien qu'aucune action n'est exercée au niveau de la structure cible. Un exemple en est le système MexXY-OprM de *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, qui peut être induit [15].

### *Perte de porines*

Certains antibiotiques atteignent l'espace intra-plasmique des cellules bactériennes via des pores spécifiques. Via la régulation négative des pores, une quantité moindre d'antibiotique atteint les cellules. Il s'agit d'un mécanisme de résistance fréquent contre les antibiotiques carbapénèmes chez *P. aeruginosa* (pore oprD) [16] ou d'*Enterobacter (E.) cloacae* (pore Omp) [17]. Dans ce cas de figure, un codon-stop est introduit dans le gène de la porine, souvent via une mutation ponctuelle, si bien que le gène ne peut plus être complètement exprimé.

### *Clivage de l'antibiotique par des enzymes*

Les exemples connus sont les pénicillinases de *S. aureus* (gène blaZ) [18] ou la production d'une bêta-lactamase à large spectre par des entérobactéries, telle que l'AmpC [19], la BLSE [20] ou les carbapénémases [21].

### *Digression sur la tolérance*

Outre les mécanismes de résistance «classiques», de nombreuses bactéries ont également la possibilité de réguler leur métabolisme cellulaire en présence d'un antibiotique. Par ce biais, les bactéries diminuent la

synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines. Via ce mécanisme appelé «tolérance», les bactéries peuvent survivre aux traitements antibiotiques et reprennent la division cellulaire aussitôt que l'antibiotique a atteint une concentration sub-inhibitrice [22]. Cette forme de défense a été particulièrement bien étudiée pour *P. aeruginosa* dans le cadre des infections chroniques chez les patients avec fibrose kystique [23]. Le rôle que joue la tolérance est toutefois dans l'ensemble insuffisamment étudié et compris sur le plan clinique, étant donné que la plupart des tests de laboratoire sont tributaires des bactéries en croissance et se divisant, et qu'une bactérie métaboliquement inactive ne peut pratiquement pas être détectée [24]. Il est possible que la tolérance joue un rôle important dans la sélection des bactéries résistantes également sur le plan clinique [25]. Des études ultérieures dans le domaine de la tolérance aux antibiotiques montreront l'influence qu'elle exerce sur le traitement et l'évolution clinique. Les méthodes de test actuelles ne permettent pas de mettre en évidence la tolérance dans la pratique de routine.

### *Propagation des bactéries multirésistantes*

La propagation des bactéries multirésistantes et de leurs plasmides est extrêmement complexe. Les humains, les animaux et l'environnement, au sens du concept *One Health*, forment des interactions et réseaux complexes (fig. 1B) [26–29], ce qui devient particulièrement évident dans le contexte des antibiotiques et des bactéries multirésistantes. Pour ce qui est des denrées alimentaires, le contact étroit entre humains et animaux induit un risque évident de zoonoses et de transmission de bactéries multirésistantes. Ainsi, il a par exemple pu être montré que les planches de cuisine étaient contaminées par des *E. coli* productrices de BLSE dans 12% des cas [30]. La dynamique complexe de l'échange de bactéries multirésistantes et de facteurs de résistance mobiles n'est toutefois jusqu'à présent pas bien étudiée. Dans le cadre du Programme national de recherche actuel (PNR72) sur la résistance aux antimicrobiens, ces problématiques sont abordées dans le cadre de divers projets ([www.nrp72.ch](http://www.nrp72.ch)).

Afin de mieux comprendre la transmission entre les divers compartiments (humains, animaux et environnement), nous avons besoin (1.) de procédés techniques de haute résolution afin de décrire la similitude et la parenté des bactéries. Autrefois, l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (ECP) était employée à cette fin. Lors de l'ECP, la ressemblance de bandes de fragments d'ADN bactériens est comparée. Aujourd'hui, le séquençage de génome entier (angl.: «*whole genome sequencing*» [WGS]) est de plus en plus utilisé [3, 31, 32].

Nous avons également besoin (2.) de banques de données permettant de recenser les métadonnées épidémiologiques associées, telles que la localisation géographique ainsi que le moment de l'isolement de la souche, de représenter les données sur la ressemblance génétique et de visualiser les voies de transmission. La plateforme de surveillance pour les agents pathogènes viraux Nextstrain ([www.nextstrain.org](http://www.nextstrain.org)) en est un exemple saisissant. Dans le cadre du projet PNR72, une telle plateforme épidémiologique moléculaire est actuellement en train d'être mise en place pour la Suisse ([www.spsp.ch](http://www.spsp.ch)).

## Influence de la résistance aux antibiotiques

La détermination de la résistance aux antibiotiques est essentielle pour une multitude de raisons. Les principaux aspects pour la médecine humaine sont discutés plus en détails dans les paragraphes qui suivent.

### Adaptation individuelle du traitement

Les patients atteints d'une infection sévère nécessitant un traitement reçoivent en règle générale un traitement antibiotique empirique. Le traitement empirique a pour objectif de couvrir un large spectre d'agents pa-

thogènes potentiels; à cet effet, des antibiotiques à large spectre sont généralement employés [33, 34]. Sur la base des profils de résistances, différentes sociétés de discipline nationales et internationales élaborent régulièrement des lignes directrices actualisées pour le traitement empirique des maladies infectieuses.

Dans certains cas, une identification rapide de l'espèce permet déjà d'adapter le traitement antibiotique [35]. Pour certaines espèces, la connaissance des résistances intrinsèques peut déjà permettre d'entreprendre de premières adaptations. Par ex. la bactérie *Listeria monocytogenes* est intrinsèquement résistante aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération [36] et les bactéries du complexe *E. cloacae* portent une bêta-lactamase à large spectre (AmpC). En tant qu'enzyme, l'AmpC peut cliver les antibiotiques bêta-lactames ainsi que les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération. *Enterobacter aerogenes*, un producteur d'AmpC, est désormais considéré comme faisant partie du genre *Klebsiella* en raison de ses propriétés taxonomiques. Ainsi, en cas d'infection à *Klebsiella aerogenes*, le traitement par céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération n'est pas efficace. Jusqu'alors, toutes les bactéries *Klebsiella* spp. étaient intrinsèquement résistantes à l'ampicilline seulement. Le tableau 2 présente les principales résistances intrinsèques [37]. Une analyse détaillée avec un large profil

**Tableau 2:** Antibiorésistances intrinsèques de certaines bactéries (pour des détails supplémentaires, voir «expert rules» de l'EUCAST [34]).

| Organisme                           | Ampicilline    | Amoxicilline-Clavulanate | Pipéracline-Tazobactam | Céfotaxime     | Ceftriaxone    | Ertapénème | Méropénème | Tétracycline   | Cotrimoxazole | Aminoglycosides | Colistine |
|-------------------------------------|----------------|--------------------------|------------------------|----------------|----------------|------------|------------|----------------|---------------|-----------------|-----------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i>      | R              | R                        |                        | R              | R              | R          |            | R <sup>1</sup> | R             |                 |           |
| <i>Burkholderia cepacia</i> complex | R              | R                        | R                      | R              | R              | R          |            |                | R             | R               | R         |
| <i>Citrobacter freundii</i>         | R              | R                        | R <sup>5</sup>         | R <sup>5</sup> | R <sup>5</sup> |            |            |                |               |                 |           |
| <i>Enterobacter cloacae</i> complex | R              | R                        | R <sup>5</sup>         | R <sup>5</sup> | R <sup>5</sup> |            |            |                |               |                 |           |
| <i>Enterococcus faecium</i>         | R <sup>3</sup> | R <sup>3</sup>           | R <sup>3</sup>         | R              | R              |            |            |                |               | R <sup>4</sup>  |           |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>         | R <sup>5</sup> | R <sup>5</sup>           | R <sup>5</sup>         | R <sup>5</sup> | R <sup>5</sup> |            |            |                |               |                 |           |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | R              |                          |                        |                |                |            |            |                |               |                 |           |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>           | R              |                          |                        |                |                |            |            |                |               |                 |           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | R              | R                        |                        | R              | R              | R          |            | R              | R             |                 |           |
| <i>Proteus mirabilis</i>            |                |                          |                        |                |                |            |            | R              |               |                 | R         |
| <i>Proteus vulgaris</i>             | R              |                          |                        |                |                |            |            | R              |               |                 | R         |
| <i>Serratia marcescens</i>          | R              | R                        | R                      | R              | R              |            |            | R <sup>6</sup> |               |                 | R         |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | R              | R                        | R                      | R              | R              | R          | R          | R <sup>2</sup> |               | R               |           |

<sup>1</sup> Les bactéries *Acinetobacter* sont intrinsèquement résistantes aux tétracyclines et à la doxycycline, mais pas à la minocycline et à la tigécycline.

<sup>2</sup> La bactérie *Stenotrophomonas maltophilia* est intrinsèquement résistante aux tétracyclines, mais pas à la doxycycline, à la minocycline et à la tigécycline.

<sup>3</sup> Bien que la bactérie *E. faecium* de type sauvage soit sensible aux antibiotiques bêta-lactames, les isolats retrouvés chez nous sont presque tous résistants à l'ampicilline.

<sup>4</sup> Faible résistance aux aminoglycosides. La combinaison d'aminoglycosides avec des inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire (pénicilline ou glycopeptides) a une action synergique et bactéricide contre les isolats.

<sup>5</sup> *Citrobacter freundii*, *E. cloacae* complex, *Klebsiella aerogenes* et *Serratia marcescens* peuvent exprimer de l'AmpC, une puissante bêta-lactamase à large spectre.

<sup>6</sup> La bactérie *S. marcescens* est intrinsèquement résistante aux tétracyclines et à la doxycycline, mais pas à la minocycline et à la tigécycline.

antibiotique (antibiogramme) permet d'élaborer un traitement antibiotique à l'efficacité optimale contre la bactérie afin de traiter le patient (angl. «*antibiotic stewardship*»). Les connaissances apportées par l'antibiogramme permettent de ne pas employer des antibiotiques à trop large spectre et d'éviter le développement de résistances.

### Surveillance de la propagation des bactéries multirésistantes

La détermination régulière des résistances aux antibiotiques ne sert pas seulement au traitement du patient individuel. Les données sont également recueillies afin d'évaluer la situation épidémiologique et d'ainsi adapter le traitement empirique en fonction des changements des résistances. Il s'agit là d'une des missions centrales des programmes de surveillance tels que Anresis en Suisse ([www.anresis.ch](http://www.anresis.ch)) ou du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) en Europe (<https://ecdc.europa.eu>). Sur la base de la situation des résistances, des recommandations et mesures correspondantes peuvent être initiées.

### Recherche de bactéries multirésistantes comme dépistage à l'hôpital

Différents facteurs conduisent à un risque accru de colonisation par un germe multirésistant. Sont particulièrement menacés les patients qui ont été en contact avec le secteur de la santé dans des pays hautement endémiques. Les bactéries à Gram négatif multirésistantes sont certes un problème mondial, mais dans certains pays, tels que l'Italie, la Grèce, l'ex-Yougoslavie ou l'Inde, ces germes sont retrouvés de façon endémique. La situation est très variable et change constamment y compris au niveau local: actuellement, en Allemagne [38] et en Suisse [39], un taux élevé d'entérocoques résistants à la vancomycine est par exemple observé. Un patient peut revenir en Suisse suite à voyage en étant colonisé ou en présentant une infection actuelle; un examen rapide permet d'isoler de tels patients conformément aux lignes directrices d'hygiène hospitalière ou de suspendre l'isolement (angl. «*infection control*»). Les recommandations pour le dépistage des patients issus des hôpitaux et de certains pays sont disponibles sur le site internet de SwissNoso ([www.swissnoso.ch](http://www.swissnoso.ch)).

### Considérations méthodologiques

La détermination de la résistance aux antibiotiques doit s'effectuer au moyen de méthodes hautement standardisées afin d'assurer la qualité de l'investigation et de garantir la comparabilité. Afin d'assurer la

qualité et la reproductibilité, les laboratoires ont généralement des contrôles de qualité internes et externes [40]. Le Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens ([www.EUCAST.org](http://www.EUCAST.org)) [41] et l'Institut américain pour les standards cliniques et de laboratoire (CLSI, [www.CLSI.org](http://www.CLSI.org)) fixent des lignes directrices correspondantes quant aux procédés de détermination des sensibilités aux antibiotiques, par exemple concernant la durée d'incubation, le type de plaques d'agar, la température, la densité bactérienne etc. [42]. En dépit du haut degré de standardisation, il existe des écarts considérables entre les méthodes commerciales selon les fabricants, par ex. pour les tests de diffusion [43]. Les résultats mesurés sont lus et interprétés selon des directives standardisées. Les critères d'interprétation reposent sur les distributions des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des isolats de type sauvage [44] et sur la définition d'une valeur seuil clinique (angl. «*clinical breakpoint*»). Les isolats de type sauvage désignent les isolats sans mécanismes de résistance acquis.

Il en résulte trois catégories pour l'interprétation de l'efficacité clinique (angl. «*susceptibility category*») d'un antibiotique:

- *sensible*: probabilité élevée de succès thérapeutique avec un dosage standard.
- *intermédiaire*: résultat thérapeutique incertain avec un dosage standard ou possibilité d'un succès clinique avec des concentrations antibiotiques plus élevées.
- *résistant*: probabilité élevée d'échec thérapeutique.

La transposition de ces valeurs de mesure in vitro au traitement des patients n'est pas une tâche évidente. De nombreux facteurs influencent finalement l'efficacité clinique; outre des aspects pharmacocinétiques (PK), il existe également des aspects pharmacodynamiques (PD), qui sont simulés dans des modèles PK/PD [45]. En pratique, les dosages de la concentration d'antibiotique dans le sérum du patient peuvent également aider à atteindre des concentrations efficaces sur le plan thérapeutique, par ex. dosage de la vancomycine chez les patients obèses ou atteints d'insuffisance rénale [46].

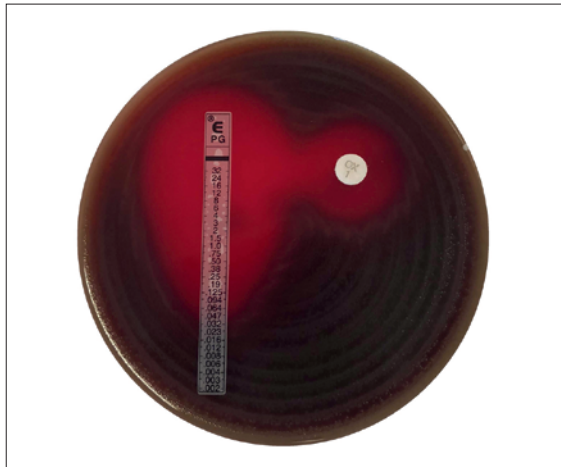
### Processus au laboratoire

Dans le laboratoire de microbiologie, différentes méthodes pour la détermination des résistances aux antibiotiques sont disponibles.

#### Détermination des résistances

La détermination des résistances aux antibiotiques sur un isolat bactérien peut s'effectuer par le biais de la méthode de diffusion sur disque ou de la détermination de la CMI (fig. 2). La mesure de l'efficacité des antibio-





**Figure 2:** Test en gradient de diffusion et méthode de diffusion sur disque. Dans le test en gradient de diffusion (à gauche), une bandelette avec une concentration croissante d'antibiotiques est posée sur une plaque sur laquelle sont étalées des bactéries. La concentration minimale inhibitrice (CMI) peut être lue à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette. Le procédé de diffusion sur disque (à droite) renseigne quant à la sensibilité aux antibiotiques sur la base du diamètre de la zone d'inhibition.

tiques les plus divers contre un isolat bactérien est appelée antibiogramme.

Dans le cadre de la *méthode de diffusion sur disque*, un disque avec une quantité définie d'un antibiotique est appliqué sur une plaque d'agar inoculée avec des bactéries. Le diamètre en millimètres de la zone d'inhibition renseigne sur la sensibilité à l'antibiotique, mais cette procédure ne permet cependant pas de déterminer la CMI.

La CMI peut être déterminée au moyen de deux méthodes: la microdilution ou le test en gradient de diffusion. Pour la *microdilution*, une quantité définie de bactérie est incubée avec un antibiotique à différentes concentrations. La concentration la plus faible inhibant encore la croissance bactérienne correspond à la CMI. Les systèmes automatisés commerciaux typiquement utilisés sont par ex. VITEK2® (bioMérieux) ou Phoenix™ (Becton Dickinson). Ils permettent de déterminer un large panel d'antibiotiques. Les systèmes commerciaux manuels permettent la détermination de la CMI pour des antibiotiques individuels. Dans le cadre du *test en gradient de diffusion*, une bandelette de papier avec une concentration croissante d'un antibiotique est appliquée sur une plaque d'agar. Les systèmes commerciaux fréquemment utilisés sont par ex. le MIC Test Strip® de Liofilchem® ou le ETest® de bioMérieux. Après l'incubation, une zone d'inhibition elliptique apparaît; la CMI se lit directement à l'intersection inférieure entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette. La qualité du test en gradient de diffusion varie en

fonction du fabricant. Certains antibiotiques, tels que la colistine, ne devraient pas être déterminés avec cette méthode [14].

Les disques permettent, par le biais d'une méthode automatisée au laboratoire, une lecture et une interprétation rapides de la sensibilité à un antibiotique. Une CMI ne peut toutefois être déterminée qu'au moyen d'une microdilution ou d'un test en gradient de diffusion. D'une manière générale, les méthodes phénotypiques de détermination des résistances nécessitent du temps, étant donné que les bactéries doivent croître en présence de l'antibiotique. Ainsi, la détermination de la sensibilité à l'antibiotique peut nécessiter 48-72 heures après le prélèvement de l'échantillon. Concernant les bactéries multirésistantes, tester les synergies entre antibiotiques est un souhait fréquemment émis par les cliniciens. Ces méthodes de test sont purement expérimentales et peuvent éventuellement être conduites dans des centres universitaires dans des cas spéciaux. Il n'existe toutefois pas de base d'interprétation validée par l'EUCAST ou le CLSI.

### Dépistage

Lors d'un *dépistage*, le patient fait l'objet d'une analyse afin de rechercher une colonisation par un germe résistant précis (par ex. SARM, BLSE, carbapénémases ou ERV). Typiquement, des frottis (rectaux, nasopharyngés, plaies) ou autres échantillons du patient sont placés sur des plaques d'agar sélectives. Une croissance suspecte est confirmée par des méthodes phénotypiques ou génotypiques. Les valeurs seuils (angl. «breakpoint») pour le dépistage d'un mécanisme de résistance sont en règle générale plus faibles que les valeurs seuil cliniques.

### Méthodes de test phénotypiques

Méthodes phénotypiques de confirmation (sur la base des recommandations de l'EUCAST pour la détection de mécanismes de résistance, v2, juillet 2017):

*Disques combinés:* Pour la confirmation de BLSE ou d'une carbapénémase, par ex., des disques spécifiques avec des substances inhibitrices (inhibiteurs de bêta-lactamase) sont employés pour les différentes bêta-lactamases. Si la zone d'inhibition devient plus grande du fait de l'inhibiteur de bêta-lactamase, il est possible de conclure à la présence d'une bêta-lactamase correspondante [47].

*Méthode de test biochimique:* L'hydrolyse du carbapénème ou d'un autre antibiotique bêta-lactame est démontrée en présence de la bactérie au moyen d'un changement de couleur induit par le pH. Le clivage de l'anneau bêta-lactame réduit le pH et le milieu se colore [48, 49].

*Méthode basée sur la MALDI-TOF MS («spectrométrie de*

Correspondance:  
PD Dr méd. Dr phil.  
Adrian Egli  
Abteilung Klinische Mikrobiologie,  
Universitätsspital Basel  
Petersgraben 4  
CH-4031 Basel  
adrian.egli[at]usb.ch

*masse à temps de vol pour la désorption-ionisation laser assistée par matrice*): Dans le cadre de la méthode de spectrométrie de masse, un carbapénème est incubé avec une bactérie. Si un carbapénèmase est produite par la bactérie, celle-ci clive le carbapénème. Le produit de clivage peut être mis en évidence par le spectromètre de masse [50].

### Méthodes génotypiques

Les méthodes génotypiques permettent la mise en évidence directe de gènes de résistance à partir d'un isolat de culture voire d'un échantillon du patient. La mise en évidence directe du mécanisme de résistance représente un gain de temps considérable. Toutefois, ces méthodes sont en règle générale coûteuses, et seuls des gènes de résistance spécifiques peuvent être recherchés. Elles trouvent bon nombre d'applications par ex. pour la mise en évidence d'une carbapénèmase (OXA-48, KPC, NDM etc.) ou de gènes codant pour une BLSE (groupe CTX-M-1 ou M-9) dans les entérobactéries et les bactéries non fermentaires telles que *P. aeruginosa* [51], d'ERV avec mise en évidence de gènes *vanA* ou *vanB* [52], ou de SARM avec la mise en évidence de *mecA* [12] ou *mecC* [53]. La détermination est ici directement réalisée à partir d'une seule colonie, mais elle peut, en fonction de la bactérie, également être réalisée directement à partir du matériel du patient, ce qui se fait notamment pour la mise en évidence de la résistance à la rifampicine de *Mycobacterium (M.) tuberculosis* directement à partir d'expectorations [54]. Différents procédés techniques moléculaires sont disponibles, comme les systèmes de PCR en temps réel (par ex. GeneXpert®), l'amplification isothermique (par ex. Amplex) ou PCR avec panels (par ex. Biofire®).

### Séquençage du génome

Grâce aux procédés technologiques les plus récents, le génome bactérien entier peut être séquencé [31, 32, 55]. La méthode du WGS emploie généralement des isolats bactériens. Toutefois, des protocoles pour le séquen-

çage directement à partir de l'échantillon du patient sont de plus en plus souvent développés. Le séquençage directement à partir du matériel du patient est certes très prometteur par ex. pour la détection des résistances aux antibiotiques de *M. tuberculosis*, mais encore plutôt dans le contexte expérimental. La méthode du WGS permet en outre un typage haute résolution ainsi que la classification des isolats dans un contexte moléculaire épidémiologique. De plus, tous les gènes séquencés peuvent être comparés avec des banques de données plus grandes (par ex. ARG-ANNOT, ResFinder [56], CARD [57]), permettant également la détection de gènes de résistance plus rares [58]. Actuellement, ces analyses basées sur le séquençage ne sont pas réalisées de manière routinière, mais les progrès techniques permettront dans un futur proche d'établir des profils de résistance très rapidement.

### Perspectives pour l'avenir

Différentes innovations techniques sont à notre porte. Dans le laboratoire de microbiologie moderne, le degré d'automatisation augmente. Les échantillons liquides peuvent d'ores et déjà être placés par des robots sur des plaques d'agar de façon entièrement automatisée. À l'avenir, les résistances seront de plus en plus souvent lues automatiquement puis interprétées par des systèmes experts. Ainsi, le traitement des échantillons pourra être réalisé efficacement et à moindre coût. De plus, du fait de la connexion entre les banques de données dans le domaine de la santé, le «big data» est de plus en plus à notre disposition. Le progrès rapide de la digitalisation nous permet de rendre les biomarqueurs numériques exploitables en vue du diagnostic optimal et du traitement optimal des résistances aux antibiotiques. Les banques de données connectées et les systèmes d'intelligence artificielle livreront, également pour le traitement médical, de plus en plus de recommandations relatives au traitement optimal du patient, au sens d'une bactériologie personnalisée.

### Remerciements

Nous remercions le Prof. Reinhard Zbinden (Institut de microbiologie médicale de l'Université de Zurich et président du Comité Suisse de l'Antibiogramme de la Société Suisse de Microbiologie) et le Dr Vladimir Hinic (Hôpital universitaire de Bâle) pour leur révision critique du manuscrit.

### Disclosure statement

Les auteurs n'ont pas déclaré d'obligations financières ou personnelles en rapport avec l'article soumis.

### Références

La liste de références complète est disponible dans la version en ligne de l'article sur [www.medicalforum.ch](http://www.medicalforum.ch).

## L'essentiel pour la pratique

Les germes multirésistants sont en augmentation constante. La détermination de la résistance aux antibiotiques sert non seulement à déterminer le traitement optimal pour le patient, mais également à mieux surveiller et comprendre la propagation des bactéries résistantes. Les méthodes phénotypiques sont fréquemment utilisées en routine, comme par exemple les panels d'antibiotiques potentiels pour permettre un traitement ciblé. Certains mécanismes de résistance peuvent être recherchés ou confirmés au moyen de méthodes moléculaires. En cas d'incertitude dans l'interprétation ou de questions quant aux procédés de test, il convient de s'adresser au laboratoire de microbiologie.