

SECTION 2.1.

DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

CHAPITRE 2.1.1.

METHODES DE LABORATOIRE UTILISEES POUR LES TESTS DE SENSIBILITE DES BACTERIES AUX ANTIMICROBIENS

RESUME

Avec l'augmentation des résistances bactériennes aux agents antimicrobiens utilisés traditionnellement, il est devenu plus difficile pour les cliniciens de choisir empiriquement l'agent antimicrobien approprié. Par conséquent, les tests in vitro de sensibilité aux antimicrobiens (TSA) des bactéries pathogènes importantes, sur des échantillons correctement prélevés, doivent faire appel, pour leur réalisation, à des méthodes validées. Les TSA sont donc un élément important des lignes directrices concernant un usage prudent des antimicrobiens dans la production animale au niveau mondial et les vétérinaires de tous les pays doivent disposer de ces données afin de prendre des décisions éclairées.

Même s'il existe toutes sortes de méthodes, les tests in vitro de la sensibilité aux antimicrobiens ont pour objectifs communs soit de fournir un paramètre prédictif fiable de la manière dont le microorganisme est susceptible de répondre au traitement antimicrobien chez l'hôte infecté, soit d'évaluer, à des fins de surveillance, s'il y a eu développement de résistance. Ce type d'information permet au clinicien de choisir l'agent antimicrobien approprié, aide à l'élaboration de stratégies concernant l'usage des antimicrobiens et fournit des données de surveillance épidémiologique. Ces données de surveillance épidémiologique servent de base pour choisir le traitement empirique approprié (traitement de première ligne) et pour détecter l'émergence et/ou la dissémination de souches bactériennes résistantes ou de facteurs de résistance chez différentes espèces bactériennes. Le choix d'une méthode de TSA en particulier repose sur de nombreux facteurs tels que données de validation, commodité, flexibilité, automation, coût, reproductibilité, exactitude, normalisation et harmonisation.

Le recours aux approches génotypiques pour la détection de gènes de résistance aux antimicrobiens est également encouragé pour accroître la rapidité et l'exactitude des tests de sensibilité. De nombreux tests ADN sont en cours de développement pour détecter, au niveau génétique, la résistance des bactéries aux antimicrobiens. Ces méthodes, utilisées conjointement avec l'analyse phénotypique, offrent des perspectives pour accroître la sensibilité, la spécificité et la rapidité de la détection de certains gènes de résistance connus et peuvent être utilisées en tandem avec les méthodes de laboratoire traditionnelles pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens.

INTRODUCTION

La multiplication des bactéries pathogènes multirésistantes aux antimicrobiens a été reconnue par l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA, fondée comme OIE), par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) comme un sérieux problème mondial de santé humaine et animale. Le développement des résistances bactériennes aux antimicrobiens n'est un phénomène ni

fortuit ni nouveau. Les préoccupations vont toutefois croissant en raison de la fréquence à laquelle de nouveaux phénotypes émergents résistants apparaissent parmi les bactéries pathogènes ou chez les microorganismes commensaux, telles les résistances aux carbapénèmes, à la colistine, au linézolide, aux macrolides, etc.

Historiquement, de nombreuses infections pouvaient être traitées avec succès sur la base de l'expérience clinique antérieure du clinicien ou parce que la sensibilité des germes pouvait être prédite de manière fiable (permettant ainsi le recours à un traitement empirique) ; c'est désormais plus souvent l'exception que la règle (Walker, 2007). Des résistances à quasi tous les agents antimicrobiens actuellement approuvés pour une utilisation chez l'homme ou en médecine vétérinaire ont été observées. Si l'on y ajoute la multiplicité d'agents antimicrobiens actuellement disponibles, cela rend le choix d'un agent approprié de plus en plus compliqué. Cette situation a rendu les cliniciens plus dépendants des données provenant des tests *in vitro* de sensibilité aux antimicrobiens, soulignant l'importance des laboratoires diagnostiques pour la pratique clinique.

De nombreuses méthodes de test de la sensibilité aux antimicrobiens (TSA) sont disponibles pour déterminer la sensibilité des bactéries aux antimicrobiens. Le choix d'une méthode repose sur plusieurs facteurs tels que commodité, flexibilité, automatisation, coût, reproductibilité, exactitude, accessibilité et préférences individuelles. La normalisation et l'harmonisation des méthodes de TSA utilisées pour la surveillance épidémiologique des résistances aux antimicrobiens est essentielle pour comparer les données entre les différents programmes nationaux ou internationaux de surveillance des Membres de l'OMSA. Il est primordial que les méthodes de TSA fournissent des résultats reproductibles lors de leur utilisation quotidienne de routine en laboratoire et que ces données soient comparables aux résultats obtenus avec une méthode reconnue comme une référence absolue. La méthode de TSA actuellement considérée comme la méthode de référence est la technique de microdilution en bouillon telle que décrite par l'Organisation internationale de normalisation (ISO, 2006), méthode qui permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). En l'absence de méthodes normalisées ou de procédures de référence, les données de sensibilité provenant de laboratoires différents ne peuvent pas être comparées de manière fiable. La méthode utilisée pour sélectionner les échantillons à inclure dans les programmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens ainsi que les méthodes utilisées pour l'isolement préalable des bactéries constituent aussi des facteurs importants à normaliser ou harmoniser afin de permettre une comparaison directe des données entre différentes régions ; un document de l'OMSA traite de ces questions (Dehaumont, 2004).

Avec les progrès des TSA, c'est aussi la compréhension des multiples facteurs susceptibles d'influencer le résultat global des tests de sensibilité qui a progressé (OMS, 2017). Ce document fournit des lignes directrices pour la normalisation des méthodes de TSA ainsi que pour l'interprétation des résultats des tests de sensibilité aux antimicrobiens.

1. Exigences des essais

Afin de parvenir à la normalisation des méthodes de TSA et à la comparabilité de leurs résultats, les exigences suivantes devraient s'appliquer :

- i) l'utilisation de méthodes de TSA normalisées est essentielle, y compris l'harmonisation des paramètres de test tels que milieu, inoculum, temps d'incubation, contrôles de qualité, choix des agents antimicrobiens et critères d'interprétation consécutifs ;
- ii) les méthodes normalisées de TSA ainsi que toutes les spécifications essentielles et les critères d'interprétation doivent être clairement définis, documentés en détail et utilisés par tous les laboratoires concernés ;
- iii) toutes les méthodes de TSA doivent générer des données exactes et reproductibles ;
- iv) la sensibilité quantitative (CMI) doit faire l'objet de rapports ;
- v) l'établissement de laboratoires nationaux ou régionaux de référence pour coordonner les méthodes de TSA, les interprétations et les techniques opérationnelles appropriées utilisées pour garantir l'exactitude et la reproductibilité (p. ex. contrôles qualité) est essentiel ;
- vi) les laboratoires de microbiologie doivent appliquer et suivre un programme officiel de gestion de la qualité (voir Chapitre 1.1.5 *Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire*) ;
- vii) les laboratoires doivent avoir obtenu l'accréditation d'une tierce partie comprenant bien les méthodes de TSA utilisées dans le domaine d'application de cette accréditation. L'organisme d'accréditation doit répondre aux

normes de l'ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) et aux lignes directrices relatives aux normes utilisées pour le processus d'accréditation. Les normes d'accréditation utilisées doivent également exiger la participation aux programmes d'essais d'aptitude ;

- viii) des souches bactériennes spécifiques témoins de référence/de qualité sont essentielles pour procéder au contrôles de qualité, à l'assurance qualité et aux essais d'aptitude intralaboratoire et interlaboratoires.

2. Choix des antimicrobiens pour les tests et les rapports

Le choix de l'antimicrobien approprié pour les tests de sensibilité peut s'avérer difficile, compte tenu du grand nombre d'agents disponibles. Les lignes directrices suivantes doivent être observées :

- i) l'atelier conjoint d'experts FAO/OMSA/OMS sur l'usage hors médecine humaine des antimicrobiens recommande de dresser une liste d'antimicrobiens à usage vétérinaire et humain très importants pour les tests de sensibilité ;
- ii) la décision concernant le choix des antimicrobiens les plus appropriés est prise par chaque Membre de l'OMSA en concertation avec les organismes et les organisations appropriés ;
- iii) les antimicrobiens d'une même classe peuvent avoir une activité *in vitro* similaire contre des bactéries pathogènes données. Dans de tels cas, il convient de choisir un antimicrobien représentatif qui permette de prédire la sensibilité des autres membres de sa classe ;
- iv) certains microorganismes peuvent être intrinsèquement résistants à des classes d'antibiotiques particulières ; il est donc inutile et trompeur de tester certains agents pour leur activité *in vitro*. Le type de résistance intrinsèque sera déterminé pour ces microorganismes soit à l'aide de la littérature scientifique, soit par des analyses ;
- v) le nombre d'antimicrobiens à tester doit être conforme aux directives utilisées (CLSI/EUCAST/ISO) et contenir au moins les représentants des différentes classes afin d'assurer la pertinence et la faisabilité des TSA (voir également OMS, 2017).

Une révision périodique des microorganismes connus pour leur sensibilité à certains agents antimicrobiens est recommandée afin de garantir qu'une résistance émergente ou inattendue soit détectée. Une résistance émergente peut également être suspectée en cas de mauvaise réponse à un traitement antimicrobien conventionnel ou d'échec thérapeutique.

3. Méthodes de test de la sensibilité aux antimicrobiens

Les exigences suivantes doivent être respectées :

- i) les bactéries faisant l'objet d'un TSA devraient être isolées à partir de cultures pures de l'échantillon soumis ;
- ii) des méthodes normalisées de référence doivent être utilisées pour l'identification, de telle sorte que le genre et/ou l'espèce des bactéries faisant l'objet du test puissent être identifiés ;
- iii) les isolats bactériens considérés comme les plus importants ainsi qu'une sélection d'autres isolats doivent être conservés pour une éventuelle analyse ultérieure (conservation par lyophilisation ou cryogénéisation entre -70°C et -80°C).

Du fait qu'ils influencent les méthodes de TSA, les facteurs suivants doivent être déterminés, optimisés et documentés en détail dans une procédure opérationnelle normalisée :

- i) une fois la bactérie isolée en culture pure, une concentration normalisée de l'inoculum doit être préparée au moyen d'un néphélomètre ou d'un spectrophotomètre, garantissant un nombre défini d'unités formant colonies afin d'obtenir des résultats de sensibilité précis et reproductibles. Les bactéries ou autres microorganismes utilisés dans les TSA doivent provenir d'une culture fraîche de 24 heures ;
- ii) la composition et la préparation de la gélose et du bouillon de culture utilisés (p. ex. pH, cations, thymidine ou thymine, utilisation de milieux enrichis) doivent être conformes aux directives (CLSI/EUCAST/ISO). La performance et la stérilité des lots du milieu doivent également être analysées et documentées, tout comme les procédures employées ;

- iii) la teneur, la plage/intervalle et la concentration de l'agent antimicrobien utilisé (dans les plaques de microtitrage, les disques, les bandelettes ou les comprimés) doivent être conformes aux directives (CLSI/EUCAST/ISO) et pertinents du point de vue de l'espèce testée;
- iv) la composition des solvants et des diluants pour la préparation des solutions mères d'antibiotiques ;
- v) la croissance et les conditions d'incubation (durée, température, atmosphère p. ex. CO₂) ;
- vi) l'épaisseur de la gélose ;
- vii) les témoins à utiliser, y compris les microorganismes de référence employés ;
- viii) les critères d'interprétation consécutifs (seuils cliniques, valeurs limites épidémiologiques – ECOFFs).

Pour toutes ces raisons, une importance particulière doit être portée à l'utilisation de procédures documentées et validées ainsi que de méthodes bien documentées, une reproductibilité suffisante ne pouvant être atteinte autrement.

4. Choix de la méthode de test de la sensibilité aux antimicrobiens

Le choix d'une méthode de TSA peut être influencé par les facteurs suivants :

- i) facilité d'exécution,
- ii) flexibilité,
- iii) adaptabilité aux systèmes automatisés ou semi-automatisés,
- iv) coût,
- v) reproductibilité,
- vi) fiabilité,
- vii) exactitude,
- viii) microorganismes et antibiotiques d'un intérêt particulier pour un Membre de l'OMSA donné,
- ix) disponibilité de données de validation adéquates pour l'éventail de microorganismes dont la sensibilité doit être testée.

5. Méthodes de test de la sensibilité aux antimicrobiens

Les trois méthodes suivantes se sont montrées aptes à fournir de manière constante des résultats reproductibles et répétables lorsqu'elles sont suivies correctement (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2008 ; Walker, 2007) :

- i) diffusion en disque,
- ii) dilution en bouillon,
- iii) dilution en gélose.

5.1. Méthode de diffusion en disque

La diffusion en disque fait référence à la diffusion d'un agent antimicrobien à partir d'un disque ou d'un comprimé contenant une concentration donnée de l'agent dans un milieu de culture solide (généralement une gélose de Müller- Hinton), inoculé avec une culture pure (voir section 3). Le résultat de la diffusion en disque est obtenu par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque, ce diamètre étant proportionnel à la sensibilité de la bactérie à l'agent antimicrobien présent dans le disque.

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture se traduit par un gradient de concentration de l'antimicrobien. Lorsque la concentration de l'antimicrobien devient si faible qu'il ne parvient plus à inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition se démarque. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque d'antimicrobien est lié à la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour

cette combinaison spécifique bactérie/antimicrobien ; la zone d'inhibition est en corrélation inverse avec la CMI de la bactérie testée. En règle générale, plus la zone d'inhibition est large, plus la concentration d'antimicrobien requise pour inhiber la croissance des microorganismes est faible. Cela dépend toutefois de la concentration d'agent antimicrobien dans le disque et de sa diffusibilité. Les agents antimicrobiens dont la taille moléculaire est très élevée diffusent mal dans la gélose, ce qui rend les méthodes de diffusion en disque peu fiables pour ces composés. C'est pourquoi les méthodes de diffusion en disque ne sont par exemple pas recommandées pour tester la sensibilité à la colistine/polymyxine (Matuschek *et al.*, 2018).

À noter : les tests par diffusion en disque reposant uniquement sur la présence ou l'absence d'une zone de diffusion sans considération de la taille de la zone d'inhibition ne sont pas acceptables comme méthode de TSA.

5.1.1. Considérations concernant l'utilisation des méthodes de diffusion en disque

La diffusion en disque est d'une exécution facile, reproductible lorsqu'elle est normalisée et ne nécessite pas d'équipement coûteux. Ses principaux avantages sont :

- i) son faible coût,
- ii) la facilité à modifier le test en changeant les disques d'antimicrobien si nécessaire,
- iii) la possibilité d'y recourir pour le dépistage d'un grand nombre d'isolats,
- iv) son aptitude à identifier un sous-ensemble d'isolats pour des analyses complémentaires selon d'autres méthodes, telle la mesure de la CMI,
- v) la procédure est contrôlée par l'inclusion d'organismes témoins appropriés pour lesquels un intervalle cible en termes de taille des zones est disponible (ou a été déduit) pour chacun des agents antimicrobiens pertinents à tester lors de la procédure de test par diffusion en disque.

La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Des dispositifs automatiques de lecture des zones existent et peuvent être intégrés dans le système de rapports et de traitement des données du laboratoire. Les disques doivent être répartis uniformément à la surface de la gélose de sorte que les zones d'inhibition qui les entourent ne se chevauchent pas au point qu'il ne soit plus possible de les distinguer. En général, cette condition est réalisée si les disques sont distants d'au moins 24 mm d'un centre à l'autre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de l'aptitude de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose. Une contamination des plaques de culture peut être plus difficile à détecter lorsqu'on utilise des lecteurs automatisés.

Le diamètre de la zone d'inhibition obtenu dans les tests par diffusion en disque est fortement influencé par la densité de l'inoculum bactérien utilisé, ce qui souligne la nécessité de standardiser l'inoculum, conformément aux directives (CLSI, EUCAST, ISO). Un inoculum plus dense qu'attendu résultera dans des zones d'inhibition plus petites tandis qu'un inoculum clairsemé résultera dans des zones d'inhibition plus larges (BSAC [British Society for Antimicrobial Chemotherapy], 2015).

5.2. Méthodes de dilution en bouillon et en gélose

L'objectif des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien inhibant la croissance visible de la bactérie testée, soit dans un bouillon, soit sur gélose (CMI, généralement exprimée en $\mu\text{g/ml}$ ou mg/litre). La gamme de concentrations testées par les méthodes de dilution en bouillon ou sur gélose inclut généralement le seuil (clinique ou microbiologique) avec des dilutions au demi de part et d'autre de cette valeur, si cela est jugé approprié. La CMI ne représente toutefois pas toujours exactement la concentration qui était testée. La « vraie » CMI est un point entre la concentration testée la plus basse qui inhibe la croissance de la bactérie et sa dilution suivante. Par conséquent, les mesures de la CMI effectuées au moyen de séries de dilutions peuvent être considérées comme ayant une variabilité inhérente de l'ordre d'une dilution.

Les séries de dilution des antimicrobiens doivent englober à la fois les critères d'interprétation (sensible, intermédiaire et résistant) pour une combinaison spécifique bactérie/antibiotique et des

microorganismes de référence appropriés pour le contrôle qualité. Les intervalles CMI cibles devraient être disponibles pour chacun des agents antimicrobiens à tester.

Pour mesurer la sensibilité aux antimicrobiens, les méthodes de dilution sont plus reproductibles que la diffusion en disque, raison pour laquelle la microdilution en bouillon est actuellement la méthode d'analyse de référence. Traditionnellement, les antibiotiques sont toutefois testés en dilutions au demi, ce qui peut produire des données de CMI inexactes. L'intervalle continu des valeurs obtenues pour le diamètre de la zone lors de la diffusion en disque peut donc présenter des avantages dans certaines circonstances, comme par exemple lors du dépistage d'isolats sensibles en grand nombre.

Tout laboratoire qui prévoit d'utiliser une méthode de dilution et de préparer ses propres réactifs ainsi que ses propres dilutions d'antibiotiques a la possibilité d'obtenir, de préparer et de conserver de manière appropriée des solutions mères d'antimicrobiens de qualité réactif, représentatives de la puissance de l'antimicrobien (fourni par le fabricant), et de fabriquer des dilutions de travail complexes sur une base régulière. Les méthodes publiées doivent être consultées et il est essentiel que ces laboratoires utilisent des microorganismes témoins pour le contrôle qualité (voir ci-dessous) afin de garantir l'exactitude et la normalisation de leurs procédures.

5.2.1. Dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension de bactéries d'une concentration optimale préalablement définie est testée par rapport à des concentrations variables d'un agent antimicrobien (en général, dilutions sérielles au demi) dans un milieu liquide à la formulation prédéfinie et documentée. La méthode de dilution en bouillon peut être réalisée soit dans des tubes contenant un volume minimal de 2 ml (macrodilution) ou en plus petits volumes au moyen de plaques microtitres (microdilution). De nombreuses plaques microtitres contenant, dans leurs puits échantillon, des antibiotiques pré-dilués lyophilisés ou déshydratés sont sur le marché. L'utilisation de plaques microtitres issues des mêmes lots peut contribuer à minimiser les variations susceptibles d'apparaître lors de la préparation et de la dilution des antimicrobiens par différents laboratoires. L'utilisation de ces plaques, avec un protocole de test documenté incluant la spécification ainsi que les organismes de référence appropriés, facilitera la comparabilité des résultats entre laboratoires.

Du fait que la plupart des éprouvettes de test par microdilution en bouillon sont préparées commercialement, cette méthode est moins flexible que la dilution sur gélose ou la diffusion en disque en matière d'ajustement aux besoins variables des programmes de surveillance ou de contrôle.

L'achat des plaques antimicrobiennes et de l'équipement connexe étant coûteux, cette méthode n'est pas envisageable pour certains laboratoires.

5.2.2. Dilution en gélose

La dilution en gélose consiste à incorporer des concentrations variables d'agent antimicrobien dans un milieu gélosé, traditionnellement en procédant à des dilutions sérielles au demi, suivies de l'insémination d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose. Cette méthode peut être considérée comme la plus fiable pour déterminer la CMI pour certains antimicrobiens (fosfomycine, mécillina) ainsi que pour certaines bactéries pour lesquelles les méthodes de dilution en bouillon ne sont pas bien établies.

Les avantages des méthodes de dilution en gélose comprennent :

- i) la possibilité de tester de multiples bactéries, à l'exception des bactéries qui forment des colonies, sur le même jeu de plaques de gélose en même temps ;
- ii) la possibilité d'améliorer les critères d'identification de la CMI et d'étendre la plage de concentration de l'antibiotique ;
- iii) la possibilité de semi-automatiser la méthode en utilisant un appareil de multiplication de l'inoculum. Des répliqueurs d'inoculum produits commercialement sont sur le marché et permettent le transfert de 32 ou de 60 inoculums bactériens à chaque plaque de gélose.

Les méthodes de dilution en gélose ont aussi certains inconvénients. Par exemple,

- i) si elles ne sont pas automatisées, elles sont très laborieuses et demandent des ressources économiques et techniques substantielles ;
- ii) une fois les plaques préparées, elles doivent normalement être utilisées dans les 1 à 3 semaines, selon le contrôle qualité (ou moins, selon la stabilité des antimicrobiens testés) ;
- iii) les critères d'identification ne sont pas toujours faciles à lire.

La dilution en gélose est souvent recommandée comme méthode de TSA normalisée pour des microorganismes fastidieux (CLSI, 2015), tels les anaérobies ou les espèces du genre *Helicobacter*.

5.3. Autres TSA bactériens et tests spécifiques de résistance aux antimicrobiens

Les concentrations inhibitrices moyennes des antimicrobiens sur les bactéries peuvent également être obtenues en utilisant des bandes de gradient disponibles dans le commerce qui diffusent un antibiotique à des concentrations prédéfinies. L'utilisation de bandes de gradient peut néanmoins s'avérer très coûteuse et des écarts peuvent apparaître pour certaines combinaisons bactérie/antimicrobien par comparaison avec les résultats des autres méthodes (Ge *et al.*, 2002 ; Rathe *et al.*, 2009). Les méthodes utilisant des bandes de gradient ne sont pas recommandées pour tester la sensibilité à la colistine en raison de la taille élevée de cette molécule et de sa faible diffusion en gélose (Matuschek *et al.*, 2018).

Quelle que soit la méthode de TSA utilisée, les procédures doivent être documentées en détail afin de garantir l'exactitude et la reproductibilité des résultats et des microorganismes de référence et témoins appropriés doivent être systématiquement testés avec chaque TSA afin de garantir l'exactitude et la validité des données.

Le choix du TSA approprié pourra dépendre des caractéristiques de croissance de la bactérie concernée, ainsi que des objectifs du test. Dans certaines circonstances, de nouvelles méthodes de test ou de nouveaux essais peuvent être plus appropriés pour la détection de phénotypes aux résistances particulières. Par exemple, les tests utilisant un substrat imprégné de céphalosporine chromogène, comme la nitrocéfine (CLSI, 2018), peuvent fournir des résultats plus fiables et plus rapides pour la mise en évidence de l'activité de la bêta-lactamase chez certaines bactéries, tandis que la résistance inductible à la clindamycine des staphylocoques peut être détectée avec une méthode de diffusion en disque en employant des disques normaux d'érythromycine et de clindamycine en positions adjacentes et en mesurant les zones d'inhibition qui en résultent (soit zone D ou test D) (Zelazny *et al.*, 2005).

De manière analogue, l'activité des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) (CLSI, 2018) de certaines bactéries peut aussi être mise en évidence en utilisant les méthodes courantes de test de la sensibilité par diffusion en disque, en y incorporant des céphalosporines spécifiques (céfotaxime et ceftazidime), séparément ainsi qu'en combinaison avec un inhibiteur de bêta-lactamase (acide clavulanique) et en mesurant les zones d'inhibition qui en résultent. De même, la protéine fixatrice de la pénicilline 2a (PBP 2a) peut être détectée chez les staphylocoques résistants à la méthicilline avec un test d'agglutination du latex (Stepanovic *et al.*, 2006). Il est essentiel de procéder à l'analyse de souches témoins négatives et positives connues parallèlement à celle des isolats cliniques pour garantir l'exactitude des résultats.

Les tests de sensibilité peuvent aussi être effectués en utilisant des valeurs seuils spécifiquement destinées à détecter des mécanismes particuliers de résistance bactérienne d'importance clinique ou de santé publique, par exemple la résistance aux carbapénèmes qui sont utilisés avec prudence pour traiter les bactéries extrêmement résistantes chez l'homme (EUCAST [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing], 2017).

5.4. Orientations futures de la détection de la sensibilité/résistance aux antimicrobiens

L'utilisation d'approches génotypiques pour la détection des gènes de résistance aux antimicrobiens est encouragée pour accroître la rapidité et l'exactitude des tests de sensibilité (Cai *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2005). De nombreux tests ADN sont en cours de développement pour détecter la résistance bactérienne aux antimicrobiens au niveau génétique. L'approche la plus récente et sans doute la plus pointue consiste

à utiliser le séquençage du génome pour prédire les phénotypes de résistance aux antimicrobiens par l'identification et la caractérisation des gènes connus codant les mécanismes spécifiques de résistance.

Les méthodes qui utilisent la génomique comparative, les sondes génétiques, les micropuces, les techniques d'amplification de l'acide nucléique (p. ex. réaction de polymérisation en chaîne [PCR]) ou le séquençage de l'ADN sont très prometteuses pour accroître la sensibilité, la spécificité et la rapidité de la détection de gènes spécifiques de résistances connues (Cai et al., 2003 ; Chen et al., 2005 ; Perreten et al., 2005). Les méthodes génotypiques sont appliquées avec succès pour compléter les méthodes traditionnelles de TSA phénotypique pour certains microorganismes, dont les staphylocoques résistants à la méthicilline ou les entérocoques résistants à la vancomycine ainsi que pour la détection des mutations responsables de la résistance aux fluoroquinolones (Cai et al., 2003 ; Chen et al., 2005 ; Perreten et al., 2005). Des méthodes de PCR ont également été décrites pour les bêta-lactamases, les enzymes inactivant les aminoglycosides et les gènes codant pour les pompes d'efflux des tétracyclines (Cai et al., 2003 ; Chen et al., 2005 ; Frye et al., 2010 ; Perreten et al., 2005).

Les innovations technologiques des tests ADN devraient permettre la détection de gènes multirésistants et/ou de variants lors du même test. Le développement de méthodes de diagnostic rapide d'identification et de tests de résistance génotypique doit contribuer à réduire l'apparition de résistance aux antimicrobiens et permettre l'utilisation de l'antimicrobien le plus approprié dès le début du traitement. Les techniques ADN doivent cependant encore démontrer leur complémentarité avec les méthodes et les résultats des TSA.

Par ailleurs, les progrès des nouvelles technologies pourraient faciliter la recherche d'un grand nombre de gènes de résistance aux antimicrobiens chez les espèces bactériennes, de manière rapide et à bon compte, fournissant ainsi des données pertinentes supplémentaires pour les programmes de surveillance et de contrôle (Frye et al., 2010). Malgré l'afflux nouveau de tests génotypiques, les méthodes phénotypiques de TSA documentées et agréées jusqu'ici resteront indispensables dans un proche avenir pour détecter l'apparition de mécanismes de résistance parmi les bactéries pathogènes ainsi que pour détecter et caractériser les mécanismes de résistance nouveaux ou émergents afin de développer et de valider les analyses génétiques. Une revue de la littérature (Ellington et al., 2017) a étudié le rôle du séquençage de l'ensemble du génome dans les tests de sensibilité des bactéries aux antimicrobiens et est arrivée à la conclusion que les preuves à l'appui d'un remplacement des TSA phénotypiques par des TSA génotypiques en contexte clinique pour la totalité des espèces bactériennes ne sont pas suffisantes, même si certaines bactéries (p. ex. *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*) ont été bien caractérisées à cette fin. Par la suite, plusieurs publications sont venues étayer l'utilisation des TSA génétiques (p. ex. McDermott et al., 2016, Zhao et al., 2016). L'avenir des analyses génétiques dans la détection de la résistance aux antimicrobiens est prometteur, mais les analyses phénotypiques resteront fondamentales.

6. Seuils de sensibilité aux antimicrobiens et critères pour la zone d'inhibition

Le principal objectif des TSA *in vitro* est de prédire comment une bactérie pathogène pourrait répondre à un agent antimicrobien *in vivo*. Le résultat généré lors d'un test de sensibilité des bactéries aux antimicrobiens *in vitro*, que l'on utilise la méthode de diffusion en disque ou celle de dilution, est généralement interprété et décrit comme résistant, sensible ou intermédiaire sous l'effet d'un antimicrobien donné en fixant des seuils cliniques. Aucune formule unique n'a été établie pour définir les seuils optimaux. Ce processus nécessite l'examen des données existantes et est influencé par les méthodes employées pour sélectionner les seuils appropriés.

En règle générale, les seuils de sensibilité aux antimicrobiens sont établis par des organismes nationaux de normalisation, des sociétés professionnelles ou des instances régulatrices. Les documents pertinents devraient être consultés. Il peut néanmoins exister des différences notables de seuils pour le même agent antimicrobien au sein d'un pays ainsi que d'un pays à l'autre en raison des différences entre les organismes de normalisation et les instances régulatrices ou en raison de différences régionales ou nationales concernant les posologies (Brown et MacGowan, 2010 ; de Jong et al., 2009 ; Kahlmeter et al., 2006).

Comme mentionné plus haut, les tests de sensibilité aux antimicrobiens doivent être enregistrés de manière quantitative :

- i) sous la forme d'une distribution des CMI en milligrammes par litre ou µg/ml
- ii) ou sous celle du diamètre de la zone d'inhibition en millimètres.

Les deux principaux facteurs suivants permettent de déduire qu'un isolat bactérien est sensible ou résistant à un agent antimicrobien.

- i) Le développement et l'élaboration de plages de contrôle qualité (CLSI, 2015) pour les tests de diffusion en disque ou de dilution pour les microorganismes de référence du contrôle qualité.

L'élaboration de plages de contrôle qualité pour les microorganismes témoins est essentiel pour valider les résultats de test obtenus avec une méthode de TSA donnée. Les plages acceptables des catégories d'interprétation pour les microorganismes témoins de référence doivent être déterminées en plus de définir les valeurs seuils de sensibilité ou de résistance. L'utilisation de microorganismes de référence est une activité qui relève du contrôle qualité et de l'assurance qualité.

- ii) L'établissement de critères d'interprétation appropriés concernant la définition des seuils (CLSI, 2015).

Cela nécessite de générer trois types de données distincts :

- a) les distributions des populations de CMI des microorganismes concernés,
- b) les paramètres pharmacocinétiques et les indices pharmacodynamiques de l'agent antimicrobien,
- c) les résultats des essais cliniques et les résultats thérapeutiques de cas cliniques de maladie.

L'élaboration d'un concept connu sous le nom de « seuil microbiologique » ou de « valeurs seuils épidémiologiques » (la valeur de CMI la plus élevée pour la bactérie et l'agent antimicrobien en question, lorsque la bactérie est dépourvue de toute résistance phénotypique exprimée à l'agent antimicrobien concerné) peut se révéler plus appropriée pour certains programmes de surveillance antimicrobienne. Les valeurs seuils épidémiologiques sont déduites après examen des distributions de la population de CMI pour les espèces bactériennes et les antimicrobiens spécifiques, effectuées dans plusieurs laboratoires selon une méthode normalisée de microdilution en bouillon. Les isolats bactériens qui possèdent une résistance phénotypique acquise (qui ont donc une CMI supérieure à la valeur seuil épidémiologique) et, par conséquent, s'écartent de la population normale sensible de type sauvage sont désignés comme non sauvages (également appelés microbiologiquement résistants) et les modifications de la sensibilité de la combinaison spécifique antimicrobien/bactérie peuvent ainsi être suivies (Kahlmeter, 2015 ; Kahlmeter *et al.*, 2006 ; Turnidge *et al.*, 2006). L'enregistrement des données quantitatives de sensibilité présente l'avantage de permettre d'analyser ces données en fonction de seuils cliniques ou au moyen de valeurs seuils épidémiologiques.

L'élaboration de critères seuils pour les tests de diffusion en disque comprend généralement la comparaison des données de diffusion en disque avec les données de dilution et requiert la création d'un diagramme de dispersion de la distribution de la population bactérienne (isolats bactérien représentatifs), sur lequel doit être reportée la zone d'inhibition par rapport au logarithme en base 2 de la CMI pour chaque isolat bactérien d'une unique espèce bactérienne. Le choix des seuils se base ensuite sur plusieurs facteurs, dont l'analyse de la courbe de régression qui corrèle les CMI et le diamètre des zones d'inhibition, la distribution des populations bactériennes, la marge d'erreur, la pharmacocinétique et enfin la vérification clinique.

7. Lignes directrices pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens

Il existe actuellement dans le monde de nombreuses normes et lignes directrices nationales. Les normes et lignes directrices internationales pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens ainsi que pour les critères d'interprétation consécutifs dans le monde entier sont :

Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2018),

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017)

À l'heure actuelle, seul le CLSI a élaboré des protocoles pour les tests de sensibilité des bactéries d'origine animale et pour la détermination des critères d'interprétation (CLSI, 2018). Une sous-commission vétérinaire (VETCAST) a également été créée sous l'égide d'EUCAST. Des protocoles et des lignes directrices sont toutefois disponibles auprès de nombreux organismes de normalisation et professionnels, y compris ceux énumérés ci-dessus, pour les tests de sensibilité des espèces bactériennes similaires responsables d'infections chez les humains. Il est possible que ces lignes directrices soient adoptées pour les tests de sensibilité des bactéries d'origine animale, mais chaque pays doit évaluer ses propres normes et lignes directrices en matière de TSA. Par ailleurs, les efforts faits pour une normalisation et une harmonisation des seuils de sensibilité/résistance à l'échelon international se poursuivent. Ces efforts se sont d'abord concentrés sur l'adoption des normes et des lignes directrices du CLSI et de l'EUCAST, qui fournissent aux laboratoires des méthodes et des valeurs de contrôle qualité permettant la comparaison des

méthodes de TSA et des données générées (CLSI, 2018 ; Kahlmeter *et al.*, 2006). Pour ceux des Membres de l'OMSA ne disposant pas de méthodes de TSA normalisées, l'adoption soit de l'un soit de l'autre de ces ensembles de normes pourrait constituer une première étape judicieuse vers des méthodes acceptables et vers l'harmonisation.

Bon nombre de bactéries responsables de maladies chez les animaux aquatiques requièrent des conditions de croissance (p. ex. températures basses, milieux enrichis ou semi-solides) qui peuvent considérablement différer de celles s'appliquant aux bactéries pathogènes des animaux terrestres. Cela a nécessité le développement de méthodes de tests de sensibilité aux antimicrobiens pour les bactéries isolées à partir d'espèces aquatiques. Plus d'informations concernant les méthodes pour tester la sensibilité aux antimicrobiens par diffusion en disque ou dilution en bouillon des bactéries isolées à partir d'animaux aquatiques se trouvent dans deux documents du CLSI (CLSI, 2006 ; 2014b). Plus d'informations concernant les méthodes pour tester la sensibilité aux antimicrobiens par diffusion en disque ou dilution en bouillon de bactéries rarement isolées ou de certaines bactéries fastidieuses (p. ex. *Campylobacter*, *Pasteurella*) figurent, pour leur part, dans le document M45-A du CLSI (CLSI, 2015).

En guise de première étape vers la comparabilité des données de contrôle et de surveillance, les Membres doivent être encouragés à défendre une conception harmonisée et normalisée des programmes (Brown & MacGowan, 2010 ; Kahlmeter *et al.*, 2006 ; White *et al.*, 2001), sans quoi les données provenant de pays qui utilisent des méthodes et des programmes différents pourraient ne pas être directement comparables (Brown et MacGowan, 2010). Quoi qu'il en soit, les données collectées au fil du temps dans un pays donné pourront au moins permettre la détection de l'apparition d'une résistance aux antimicrobiens ou de tendances dans la prévalence de la sensibilité/résistance dans le pays en question (Petersen *et al.*, 2003). Si les résultats obtenus avec des méthodes de TSA différentes devaient être comparés, la comparabilité des résultats devrait toutefois être démontrée et un consensus sur leur interprétation obtenu. Pour ce faire, il conviendra d'utiliser des méthodes de TSA documentées, exactes et fiables, en conjonction avec le contrôle de la performance des TSA au moyen de microorganismes de référence bien caractérisés au sein des laboratoires participant à ces comparaisons.

Tableau 1. Méthodes phénotypiques existantes de tests de sensibilité et leurs caractéristiques

Méthode de test de sensibilité	Norme internationale existante	Méthodes publiées existantes	Utilisation dans les programmes de surveillance nationaux	Utilisation dans les tests de sensibilité à des fins thérapeutiques	Seuils pouvant être utilisés	Résultat du test	Comparabilité des résultats	Caractéristiques
Détermination de la CMI par (micro) dilution en bouillon	Oui (ISO 20776-1), CLSI, EUCAST	Oui (CLSI, EUCAST)	Oui, la détermination de la CMI par microdilution est la méthode de choix	Oui	Valeurs seuils cliniques ou épidémiologiques (ECOFFs)	CMI	Elevée	Méthode de référence actuelle. L'enregistrement des valeurs CMI permet d'interpréter les résultats de test en utilisant différents seuils (p. ex. seuil clinique ou ECOFF) ainsi que de réévaluer des données historiques en cas de changement des valeurs seuils et d'évaluer des modifications de la CMI. De nombreux programmes nationaux de surveillance ont adopté cette méthode. La valeur CMI peut parfois indiquer le mécanisme probable de résistance (p. ex. résistance élevée à l'amikacine et ARN méthylases) ou fournir un marqueur épidémiologique. Il s'agit actuellement de la seule méthode adéquate pour déterminer la sensibilité à la colistine.
Détermination de la CMI par dilution en gélose	Non	Oui (CLSI, EUCAST)	Pas utilisé à grande échelle	Oui	Seuils cliniques ou ECOFFs	CMI	Dépendante de la congruence des méthodes utilisées	Méthode de référence. Les seuils appropriés pour la dilution en bouillon peuvent ne pas être directement applicables à la diffusion en gélose. Actuellement utilisée en particulier pour tester certains microorganismes fastidieux.
Méthode du seuil	Non	Oui (littérature scientifique)	Pas utilisé à grande échelle	Oui	Le test est effectué à un seuil défini	Résistant ou sensible au seuil choisi	Dépendante de la congruence des méthodes utilisées	Des changements dans le seuil de cette méthode rendent l'interprétation des données historiques impossible. Des modifications de la sensibilité dans les catégories S ou R ne peuvent pas être détectées. La méthode du seuil repose sur la croissance ou l'absence de croissance des bactéries dans le bouillon ou la gélose contenant un antimicrobien à une dilution unique (seuil).
Méthode des bandes de gradient	Non	Oui (fabricant)	Pas utilisé à grande échelle	Oui	Seuils cliniques ou ECOFFs	CMI	Elevée	Fournit une méthode alternative pratique pour déterminer la CMI et nécessitant un équipement supplémentaire minimal.

Méthode de test de sensibilité	Norme internationale existante	Méthodes publiées existantes	Utilisation dans les programmes de surveillance nationaux	Utilisation dans les tests de sensibilité à des fins thérapeutiques	Seuils pouvant être utilisés	Résultat du test	Comparabilité des résultats	Caractéristiques
Test de diffusion en disque	Non	Oui (CLSI, EUCAST) Plusieurs méthodes différentes existent. Elles ne sont généralement pas équivalentes.	Peut être utilisé, mais la détermination de la CMI par microdilution en bouillon est la méthode de choix	Oui	Seuils cliniques (des ECOFFs existent aussi pour la méthode de diffusion en disque EUCAST)	Diamètre de la zone d'inhibition, interprété comme résistant ou sensible selon les directives du test	Dépendante de la congruence des méthodes utilisées	Fréquemment utilisée pour fournir une indication de la sensibilité à des fins thérapeutiques. Modulable en ceci que différents disques peuvent être utilisés, selon les antimicrobiens autorisés pour le traitement. Les différentes méthodes ne sont généralement pas équivalentes (la taille des zones obtenues avec une méthode ne peut pas être interprétée selon les critères d'une autre méthode). Le recueil des données de taille des zones peut permettre de détecter une modification de la sensibilité. Les méthodes de diffusion en disque peuvent être harmonisées jusqu'à un certain degré avec d'autres méthodes en utilisant les mêmes seuils.

La méthode de test de sensibilité choisie devrait fournir des détails sur la méthode, sur les témoins appropriés, les plages de contrôle qualité et les seuils. La comparabilité des résultats obtenus dans les programmes de surveillance ne dépend pas uniquement de la méthodologie utilisée au laboratoire, mais également de la population de bétail cible incluse dans l'étude et de la méthode d'échantillonnage.

8. Comparabilité des résultats

Pour permettre la comparabilité des résultats provenant de différents systèmes de surveillance, ceux-ci doivent faire l'objet de rapports quantitatifs et inclure des informations sur la performance des méthodes, les microorganismes de référence et les seuils utilisés ainsi que sur les antimicrobiens.

Les données des TSA consistant en un résumé cumulé et continu des profils de sensibilité (antibiogrammes) des microorganismes importants cliniquement ou du point de vue de la surveillance doivent être générées, enregistrées et analysées à intervalles réguliers (CLSI, 2014a). Ces données doivent également être présentées de manière claire et cohérente, de sorte que les nouveaux profils de résistance puissent être identifiés et que les résultats atypiques puissent être confirmés ou réfutés. Ces données doivent figurer dans une base de données centrale et être publiées annuellement.

Les données cumulées des TSA seront utiles pour le suivi des tendances de sensibilité/résistance dans une région au fil du temps ainsi que pour évaluer les effets des mesures destinées à réduire la résistance aux antimicrobiens.

9. Contrôle de qualité (CQ) et assurance qualité (AQ)

Des systèmes de contrôle qualité/d'assurance qualité doivent être établis dans les laboratoires effectuant des TSA, conformément au Chapitre 1.1.5.

- i) Le contrôle qualité désigne les techniques opérationnelles qui sont utilisées pour garantir l'exactitude et la reproductibilité des TSA.
- ii) L'assurance qualité inclut, sans s'y limiter, le suivi, la tenue de registres, l'évaluation, la prise éventuelle (si nécessaire) de mesures correctives, l'étalonnage et l'entretien de l'équipement, les essais d'aptitude, la formation et le CQ. Un programme d'AQ aide à garantir que le matériel et les processus de test fournissent des résultats d'une qualité constante.

Les éléments suivants doivent être déterminés et surveillés :

- i) la précision de la procédure des TSA,
- ii) l'exactitude de la procédure des TSA,
- iii) les qualifications, les compétences et les aptitudes du personnel de laboratoire ainsi que du personnel qui interprète les résultats ou qui participe à la surveillance de la résistance aux antimicrobiens,
- iv) la performance des réactifs appropriés.

Les exigences suivantes doivent être respectées.

- i) Le respect rigoureux des techniques spécifiées et documentées en conjonction avec le contrôle qualité (garantie de la performance et autres critères essentiels) des milieux et des réactifs.
- ii) La tenue de registres avec :
 - a) les numéros de lot de tous les matériels et réactifs appropriés,
 - b) les dates d'expiration de tous les matériels et réactifs appropriés,
 - c) l'étalonnage et la surveillance des équipements,
 - d) les spécifications essentielles pour la performance des TSA (résultats de référence, temps, température, etc.).
- iii) Le ou les microorganismes de référence appropriés devraient rester les mêmes, quelle que soit la méthode de TSA employée.
- iv) Les microorganismes de référence doivent être obtenus auprès d'une source fiable, par exemple auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC®), de sources commerciales fiables ou d'institutions réputées pour stocker et utiliser correctement les microorganismes.
- v) Les microorganismes de référence doivent être catalogués et bien caractérisés, y compris les phénotypes dont la sensibilité aux antimicrobiens est bien définie. Les dossiers concernant ces microorganismes de

référence devraient inclure les plages établies pour le caractère résistant ou sensible des antimicrobiens à tester ainsi qu'une mention de la ou des méthodes ayant permis de les déterminer.

- vi) Les laboratoires participant aux TSA doivent utiliser les microorganismes de référence appropriés pour toutes les analyses de TSA.
- vii) Les souches de référence doivent être conservées sous forme de cultures mères à partir desquelles sont produites les cultures de travail. Ces cellules mères doivent être obtenues à partir de collections de cultures nationales ou internationales. Les souches bactériennes de référence doivent être stockées dans des laboratoires désignés, centralisés ou régionaux. Les cultures de travail ne doivent pas être repiquées d'un jour à l'autre, dans la mesure où cela est source de contamination, et la méthode de production des cultures de travail doit garantir que les cultures mères sont rarement utilisées. Cela peut être réalisé grâce à la production de stocks intermédiaires de cultures dérivées des cultures d'origine et utilisées pour créer des cultures de travail au jour le jour.
- viii) Le stock de travail des microorganismes de référence appropriés doit être testé avec la méthode privilégiée pour analyser la performance globale du laboratoire concerné chaque jour où des tests de sensibilité sont réalisés.

Comme cela n'est pas toujours pratique ou économique, la fréquence de ces tests peut être réduite si le laboratoire est capable de démontrer que les résultats des tests faits avec les microorganismes de référence au moyen de la méthode choisie sont reproductibles. Si un laboratoire peut documenter la reproductibilité des méthodes de test de la sensibilité qu'il utilise, ces contrôles pourront être effectués sur une base hebdomadaire. Si des préoccupations concernant l'exactitude, la reproductibilité ou la validité de la méthode surgissent, il incombe au laboratoire d'en déterminer la ou les causes et de répéter les tests avec des matériels de référence. En fonction de la ou des causes, l'utilisation quotidienne de matériel de référence ou toute autre mesure corrective pourra être réinstaurée.

- ix) Les microorganismes de référence doivent être testés chaque fois qu'un nouveau lot de milieu, de plaques ou de disques est utilisé ainsi que régulièrement en parallèle avec les microorganismes à analyser.
- x) Les questions de biosécurité appropriées doivent être résolues lors de l'obtention et de la répartition des microorganismes dans les laboratoires concernés.

10. Essais d'aptitude externes

Les laboratoires doivent participer aux programmes externes d'assurance qualité et/ou d'essais d'aptitude, conformément au Chapitre 1.1.5. Les laboratoires sont également encouragés à participer aux comparaisons internationales interlaboratoires (p. ex. système externe d'assurance qualité de l'OMS) (Hendriksen *et al.*, 2009). Toutes les espèces bactériennes faisant l'objet de TSA doivent être incluses.

Les laboratoires nationaux de référence doivent se voir confier la responsabilité de :

- i) superviser les programmes d'assurance qualité des laboratoires participant à la surveillance et au contrôle de la résistance aux antimicrobiens,
- ii) caractériser un ensemble de microorganismes de référence et les fournir à ces laboratoires,
- iii) créer, gérer et distribuer les échantillons à utiliser pour les essais externes d'aptitude,
- iv) créer une base de données centrale accessible sur l'internet (p. ex. Système européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens [EARSS]) contenant les différents profils de sensibilité/résistance pour chaque espèce bactérienne sous surveillance.

11. Conclusion

Bien qu'il existe une multitude de méthodes, l'objectif des tests de sensibilité aux antimicrobiens *in vitro* à des fins vétérinaires cliniques, de surveillance ou de suivi, est commun à toutes : fournir un indicateur permettant de prédire de manière fiable la manière dont un microorganisme est susceptible de répondre au traitement antimicrobien chez l'hôte infecté. Ce type d'informations permet au clinicien de choisir l'agent antimicrobien approprié, fournit des données de surveillance et aide à élaborer des politiques sur l'usage judicieux des antimicrobiens (Organisation mondiale de la santé animale, 2010).

Les tests de sensibilité aux antimicrobiens *in vitro* peuvent être réalisés sous différentes formes, les plus courantes étant la diffusion en disque, la dilution en gélose, la macrodilution en bouillon, la microdilution en bouillon et l'analyse du gradient de concentration. Chacune de ces procédures requiert des conditions et des méthodes de test spécifiques incluant les milieux, les conditions et les temps d'incubation ainsi que l'identification de microorganismes appropriés pour le contrôle qualité, accompagnés de leurs plages de CQ spécifiques. Il est essentiel que les méthodes de TSA fournissent des résultats reproductibles lors de leur utilisation quotidienne en laboratoire et que les données soient comparables avec les résultats obtenus selon une méthode reconnue comme une référence absolue. En l'absence de méthodes normalisées ou de procédures de référence, les résultats de sensibilité/résistance aux antimicrobiens provenant de laboratoires différents ne pourront pas être comparés de manière fiable.

L'utilisation d'approches génotypiques pour la détection des gènes de résistance aux antimicrobiens a également été encouragée pour accroître la rapidité et l'exactitude des tests de sensibilité. De plus, les progrès des nouvelles technologies dans les techniques moléculaires (p. ex. micropuces) pourraient faciliter la recherche de nombreux gènes de résistance aux antimicrobiens chez les espèces bactériennes, de manière rapide et à bon compte, fournissant ainsi des données pertinentes supplémentaires pour les programmes de surveillance et de contrôle (Ojha & Kostrzynska, 2008; Poxton, 2005). Les méthodes phénotypiques normalisées de TSA resteront indispensables pour détecter l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance parmi les bactéries pathogènes et pour valider leur détection au moyen de techniques génétiques (Ellington *et al.*, 2017).

RÉFÉRENCES

BROWN D. & MACGOWAN A. (2010). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing breakpoints in Europe: implications for reporting intermediate susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, **65**, 183–185.

BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY (BSAC) (2015). BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 14 janvier 2015 Disponible sous <http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/BSAC-disc-susceptibility-testing-method-Jan-2015.pdf> (consulté 16/08/2018).

CAI H.Y., ARCHAMBAULT M., GYLES C.L. & PRESCOTT J.F. (2003). Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. *Anim. Health Rev.*, **4**, 73–93.

CHEN S., ZHAO S., McDERMOTT P.F., SCHROEDER C.M., WHITE D.G. & MENG J. (2005). A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Probes*, **19**, 195–201.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2018). Document Vet08. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, Fourth Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2014a). Document M39-A4. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline, Fourth Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2006). Document M42-A, Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2014b). Document VET 04-A2, Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Second Edition. Approved Guideline. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2015). Document M45. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Third Edition. Approved Guideline. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

DEHAUMONT P. (2004). OIE International Standards on Antimicrobial Resistance. *J. Vet. Med. [Series B]*, **51**, 411–414.

- DE JONG A., BYWATER R., BUTTY P., DEROOVER E., GODINHO, K., KLEIN U., MARION H., SIMJEE, S., SMETS, K., THOMAS, V., VALLE, M., & WHEADON A. (2009). A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, **63**, 733–744.
- ELLINGTON M.J., EKELUND O., AARESTRUP F.M., CANTON R., DOUMITH M., GISKE C., GRUNDMAN H., HASMAN H., HOLDEN M.T.G., HOPKINS K.L., IREDELL J., KAHLMETER G., KÖSER C.U., MACGOWAN A., MEVIUS D., MULVEY M., NAAS T., PETO T., ROLAIN J.-M., SAMUELSON Ø & WOODFORD N (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee, *Clin. Microbiol. Infect.*, **23**, 2–22.
- EU COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST) (2017). EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or public health importance v2.0 July 2017. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf (Accessed on 16/08/2018).
- FRYE J.G., LINDSEY R.L., RONDEAU G., PORWOLLIK S., LONG G., MCCLELLAND M., JACKSON C.R., ENGLER M.D., MEINERSMANN R.J., BERRANG M.E., DAVIS J.A., BARRETT J.B., TURPIN J.B., THITARAM S.N. & FEDORKA-CRAY P.J. (2010). Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information Database. *Microb. Drug Resist.*, **16**, 9–19.
- GE B., BODEIS S., WALKER R.D., WHITE D.G., ZHAO S., MCDERMOTT P.F. & MENG J. (2002). Comparison of Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 487–494.
- HENDRIKSEN R.S., SEYFARTH A.M., JENSEN A.B., WHICHARD J., KARLSMOSE S., JOYCE K., MIKOLEIT M., DELONG S.M., WEILL F.X., AIDARA-KANE A., LO FO WONG D.M., ANGULO F.J., WEGENER H.C., & AARESTRUP F.M. (2009). Results of use of WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 79–85.
- ISO (2006). ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.
- KAHLMETER G. (2015). The 2014 Garrod Lecture: EUCAST – are we heading towards international agreement? *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 2427–2439.
- KAHLMETER G., BROWN D.F., GOLDSTEIN F.W., MACGOWAN A.P., MOUTON J.W., ODENHOLT I., RODLOFF, A., SOUSSY C.J., STEINBAKK M., SORIANO F. & STETSIOUK. (2006). European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.*, **12**, 501–503.
- MATUSCHEK E., ÅHMAN J., WEBSTER C. & KAHLMETER G. (2018). Antimicrobial susceptibility testing of colistin –evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.*, **24**, 865–870.
- MCDERMOTT P.F., TYSON G. H., KABERA C., CHEN Y, LI C., FOLSTER J. P., AYERS S. L., LAM C., TATE H. P. & ZHAO S. (2016). Whole-Genome Sequencing for Detecting Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 5515–5520.
- OJHA S. & KOSTRZYNSKA M. (2008). Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. *Vet. Res.*, **39**, 4–26.
- PERRETEAU V., VORLET-FAWER L., SLICKERS P., EHRLICH R., KUHNERT P. & FREY J. (2005). Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2291–2302.
- PETERSEN A., AARESTRUP F.M., HOFSHAGEN M., SIPILA H., FRANKLIN A. & GUNNARSSON E. (2003). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing among veterinary diagnostic laboratories in five Nordic countries. *Microb. Drug Resist.*, **9**, 381–388.

POXTON I.R. (2005). Molecular techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: do they have a role in bacteriology? *Med. Princ. Pract.*, **14**, 20–26.

RATHE M., KRISTENSEN L., ELLERMANN-ERIKSEN S., THOMSEN M.K. & SCHUMACHER H. (2009). Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.: validation of susceptibility testing and in vitro activity of vancomycin, linezolid, tigecycline and daptomycin. *APMIS.*, **118**, 66–73.

STEPANOVIC S., HAUSCHILD T., DAKIC I., AL-DOORI Z., SVABIC-VLAHOVIC M., RANIN L. & MORRISON D. (2006). Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 934–937.

TURNIDGE J., KAHLMEYER G., & KRONVALL G. (2006). Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:418-425.

WALKER R.D. (2007). Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. *In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Giguere S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. eds. Ames, IA, Blackwell Publishing.

WHITE D.G., ACAR J., ANTHONY F., FRANKLIN A., GUPTA R., NICHOLLS T., TAMURA Y., THOMPSON S., THRELFALL J.E., VOSE D., VAN VUUREN M., WEGENER H., & COSTARRICA L. (2001). Standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 849–858.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2017). Integrated surveillance of antimicrobial resistance in foodborne bacteria. Application of a One Health approach. WHO, Geneva, Switzerland, pp 76. ISBN: 978 92 4 151241 1

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2018). Chapter 6:10. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *OIE Terrestrial Animal Health Code*, Volume 1. OIE, Paris, France.

ZELAZNY A.M., FERRARO M.J., GLENNEN A., HINDLER J.F., MANN L.M., MUNRO S., MURRAY P.R., RELLER L.B., TENOVER F.C. & JORGENSEN J.H. (2005). Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: a CLSI collaborative study. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2613–2615.

ZHAO S., TYSON G.H., CHEN Y., MUKHERJEE S., YOUNG S., LAM C., FOLSTER J.P., WHICHARD J.M. & McDERMOTT P.F. (2016). Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 459–466.

*
* *

N. B. : il existe un Laboratoire de référence de l'OMSA pour la résistance aux antimicrobiens
(veuillez consulter le site internet de l'OMSA Web pour la liste actualisée
<https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-proposons/reseau-dexpertise/laboratoires-de-reference/#ui-id-3>).
Pour de plus amples informations sur la résistance aux antimicrobiens, veuillez contacter le Laboratoire de
référence de l'OMSA.

N. B. : ADOPTE POUR LA PREMIERE FOIS EN 2004. DERNIERES MISES A JOUR ADOPTEES EN 2019.