

Détermination de la sensibilité aux antibiotiques pour le traitement et le contrôle du choléra

OBJECTIF : fournir des instructions permettant de déterminer la sensibilité in vitro de *Vibrio cholerae* O1/O139 aux antibiotiques

MÉTHODES

Association de deux méthodes :

- Diffusion en gélose à partir de disques imprégnés d'antibiotiques à des concentrations prédéterminées
- Mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à l'aide de bandelettes de test imprégnées d'un gradient de concentrations prédéfinies d'antibiotiques

NOTE : Les bandelettes de test sont recommandées pour les antibiotiques pour lesquels aucun diamètre critique n'est défini ou lorsque des tests complémentaires sont nécessaires.

NOTE : La (les) souche(s) de référence doivent toujours être testées en parallèle avec les échantillons.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- Boîtes de milieu gélosé Mueller-Hinton (MHA) (4 mm ± 0,5 mm d'épaisseur, Ø 90 mm)
- Solution saline stérile (0,85% ou 0,9% de NaCl) + tubes à essai de tailles identiques pour les suspensions bactériennes et l'étalon McFarland
- Ecouillons à embouts en coton stériles
- Distributeur pour 5 à 6 disques d'antibiotiques ou pinces stériles
- Double-décimètre (permettant de mesurer en mm)
- Etalon de 0,5 McFarland
- Papier avec des traits noirs sur fond blanc pour une comparaison visuelle (peut être dessiné manuellement ou imprimé)
- Souches de référence : *Escherichia coli* ATCC 25922
Staphylococcus aureus ATCC29213



Antibiotiques sélectionnés et méthodes recommandées :

Tests de dépistage par diffusion en gélose Tests de confirmation par mesure de la CMI

- Erythromycine (EM), (15 mg)
- Péfloxacin (PEF), (5 µg)
- Tétracycline (TE), (30 µg)
- Azithromycine (AZ)
- Ciprofloxacine (CIP)
- Doxycycline (DO)

AZ, CIP et TE sont les trois antibiotiques recommandés par la GFTCC pour le traitement du choléra : <https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2020/04/gtfcc-note-technique-sur-l-utilisation-d-antibiotiques-pour-le-traitement-et-le-contro%CC%82le-du-chole%CC%81ra.pdf>

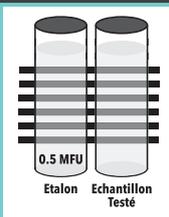
- Conserver les disques d'antibiotiques et les bandelettes entre -20°C et +8°C selon les recommandations du fournisseur.
- Vérifier la date de péremption des disques et des bandelettes avant utilisation.

PROCÉDURE POUR LE TEST DE SENSIBILITÉ AVEC LES DISQUES ET LES BANDELETTES

1. Préparation de l'inoculum

Réaliser une suspension bactérienne en solution saline stérile avec quelques colonies bien isolées à partir d'une culture d'une nuit sur boîte (18-24 heures à 35±2°C) pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland* par comparaison visuelle.

NOTE : Veiller à ce que l'étalon de 0,5 MFU soit aliquoté dans un tube de même taille que celui utilisé pour préparer la suspension à tester.



*correspondant à un inoculum d'environ 1 à 2 x 10⁸ UFC/mL (Absorbance_{600nm} = 0.08-0.1)

3. Application des disques d'antibiotiques

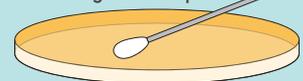
- Pas plus de 15 min après l'ensemencement.
- Déposer les disques avec un distributeur ou individuellement avec des pinces stériles en les pressant doucement contre la gélose.
- Ne pas déplacer les disques après les avoir déposés.
- Remettre le couvercle, retourner les boîtes et les incuber à l'étuve.



NOTE : Laisser les disques revenir à température ambiante avant d'ouvrir les cartouches ou les contenants.

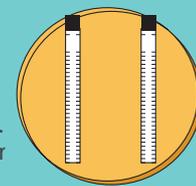
2. Ensemencement des géloses de Mueller-Hinton

- Pas plus de 15 minutes après la préparation de la suspension bactérienne.
- Plonger un écouillon dans la suspension, éliminer l'excès de liquide contre les parois du tube.
- Ensemencer la totalité de la surface de la gélose par écouillonnage dans trois directions, en effectuant une rotation d'environ 60 degrés à chaque fois.
- S'assurer que la surface est complètement sèche avant de passer à l'étape suivante.



4. Application des bandelettes

- Pas plus de 15 min après l'ensemencement.
- Déposer les bandelettes à la surface de la gélose suivant les recommandations du fabricant.
- Ne pas déplacer les bandelettes après les avoir déposés.
- Remettre le couvercle, retourner les boîtes et les incuber à l'étuve.



NOTE : Les bandelettes doivent être constamment conservées au congélateur à -20°C. Laisser celles qui seront utilisées revenir à température ambiante avant de les déposer sur la gélose.

5. Incubation : 18 heures à 35°C ± 2°C.

6. Lecture : après 18 heures, observer les boîtes et mesurer les diamètres (en mm) des zones d'inhibition. Lire la CMI à l'intersection de la partie inférieure de la zone d'inhibition de croissance, en forme d'ellipse, avec la bandelette test. Si la valeur de CMI se situe entre deux dilutions, toujours choisir la valeur la plus élevée.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

• **Contrôle de Qualité** : si les résultats de la souche de référence ne sont pas conformes aux résultats attendus, les résultats sont invalides pour les souches de *V. cholerae* testées et le laboratoire doit identifier les sources d'erreur.

• Tétracycline : test de dépistage de la sensibilité à la doxycycline. Les souches sensibles à la TE peuvent être considérées comme "sensibles" à la doxycycline. En cas de résistance à la TE, la doxycycline doit être testée individuellement par mesure de la CMI.

• Péfloxacin : test de dépistage de la sensibilité à la ciprofloxacine.

• Érythromycine : test de dépistage de la sensibilité à l'azithromycine.

NOTE : La mesure de la CMI pour l'AZ et la CIP n'est pas nécessaire pour la prise en charge des cas, mais elle est recommandée pour la surveillance épidémiologique des souches.

NOTE 1 : Le test de diffusion en gélose à partir de disques d'acide nalidixique (NA) s'est avéré une méthode fiable pour identifier les souches de *V. cholerae* O1 présentant une sensibilité réduite ou une résistance à la CIP, et peut être utilisé comme alternative au test de dépistage par le disque de PEF. S'il est résistant à NA (sur la base des critères d'interprétation des *Enterobacteriaceae*), l'isolat doit faire l'objet d'un test de sensibilité à la CIP par mesure de la CMI. Les souches présentant une croissance contact avec le disque de NA doivent être considérées comme résistantes à la CIP (CMI ≥ 0,25 mg/L).

NOTE 2 : Des antibiotiques supplémentaires peuvent être testés pour le suivi épidémiologique des souches (par exemple colistine, polymyxine B, ampicilline, chloramphénicol, triméthoprime/sulfaméthoxazole, céphalosporines de 1ère et 3ème générations, streptomycine).

INTERPRÉTATION : se reporter à l'un des référentiels suivants :

CLSI : <https://clsi.org/all-free-resources/>, CLSI M45 ED3:2016, Table 20. *Vibrio* spp. (Including *Vibrio cholerae*)

EUCAST : http://www.eucast.org/clinical_breakpoints

CA-SFM / EUCAST : https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf

NOTE : Les référentiels sont révisés régulièrement, veuillez vérifier que vous utilisez une version à jour.

Ce document est à l'usage de laboratoires de référence. Conserver l'isolat jusqu'à réalisation de la totalité des tests ou conformément à la politique de conservation des échantillons du laboratoire.