

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 29 septembre 2023
Par M. SOHIER Thomas**

**TECHNIQUES DISPONIBLES POUR RÉALISER LES ANTIBIOGRAMMES
EN MILIEU LIQUIDE POUR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* &
*ACINETOBACTER BAUMANNII***

Membres du jury :

Président :

Madame le Professeur Goffard Anne, PU-PH, CHU de Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Madame le Docteur Mazars Edith, Biologiste, PH, CH de Valenciennes

Assesseur(s) :

Madame le Docteur Dewulf Gisèle, Biologiste, PH, CH de Valenciennes

Monsieur le Docteur Wallet Frederic, Biologiste, PH au CHU de Lille

REDACTION	VERIFICATION	APPROBATION
Audrey Hennebelle Assistante de direction	Cyrille Porta Responsable des Services	Delphine Allorge Doyen

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85

M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86

Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAK-PAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86

Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacociné-	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceu-	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacociné-	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galé-	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceu-	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82

Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Remerciements

À ma Présidente de jury,

Madame la Professeure Goffard Anne,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse et d'évaluer mon travail.

Soyez assurée de mon respect et ma sincère reconnaissance pour votre présence aujourd'hui.

À mes assesseurs,

Monsieur le Docteur Frederic Wallet,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse.

Je suis sensible à l'attention que vous portez à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Madame le Docteur Gisèle Dewulf,

Je vous remercie d'être présente pour juger de mon travail.

Je suis heureux de vous compter parmi les membres de mon jury, en espérant que vous trouvez autant d'intérêt à lire cette thèse que moi à l'écrire.

A ma directrice de thèse,

Le docteur Edith Mazars,

Je vous présente mes sincères remerciements pour votre expérience, votre patience et votre humour, la rédaction de cette thèse restera un très bon souvenir. En espérant que ça le restera pour vous aussi, vous avez toute ma reconnaissance.

À ma famille,

À mes parents, pour la chance et l'amour infini qu'ils m'ont donnés tout au long de ces années. Je vous remercie pour le sens du courage et de la créativité que vous m'avez enseigné, je continuerai de pousser au milieu du désert et de brûler même au fond de l'océan. Simplement merci pour tout, je vous aime.

Je remercie **ma sœur** de m'avoir toujours montré le bon chemin tout en veillant sur moi. Malgré quelques orages, les souvenirs sont sous le soleil. Je t'aime tête de crotte.

À mon grand-père, Paul, précurseur dans le domaine de la biologie, ta philosophie dans le travail et la vie sont un exemple pour moi, merci pour ton écoute et tes conseils sages.

À mes amis,

Je remercie mes amis les plus proches **Maxence, FG, Alice et GG** pour le soutien dans les moments difficiles ; Vous m'enrichissez à chaque moment partagé, vous êtes des personnalités singulières et sincères, ne changez rien.

À ma vie amiénoise, aux aventures nocturnes indénombrables et aux heures de BU interminables. Ces années sont parmi les meilleures, elles ont été remplies de liberté, d'amitiés et de maux de têtes. Je remercie mes camarades d'Ô et particulièrement **Gaspar** pour cette époque inoubliable.

Au **NLC** je vous remercie pour les moments de passion et de ride partagés. Pendant mon internat vous m'avez rappelé que le bonheur ne tenait qu'à un rayon de soleil, une session, une bière et des amis.

Merci à mes co-internes de virologie **Davidax, Marcax, Sarax** et notre chef **Alexandrax**. Vous m'avez montré l'âge d'or de la fonction publique avec ses pauses café et ses parties de baby-foot endiablées le midi.

Merci à mes copines d'hématologies, **Joan, Sarah, Manon F., Manon D.**, on a passé un stage difficile dans la bonne humeur et l'entraide. Vous m'avez énormément appris sur l'hématologie et le One piece. Je vous souhaite une vie pleine de piraterie.

Merci aux équipes de St Philibert, **Julien, Juliette, Amélie, Zoé, Nicolas, Clément et toute l'équipe technique**. Durant mes 2 stages, j'ai travaillé avec plaisir dans une ambiance quasiment familiale, gardez votre bonne humeur rayonnante.

Enfin,

Je remercie profondément **Léopoldine** ma chérie, ma meilleure amie, mon soleil, ma batterie nucléaire au quotidien. Je te remercie pour ton amour dans mes moments de doute et ta patience dans mes mauvais jours. J'espère te rendre autant d'amour, je t'aime plus qu'au premier jour et je pressens un horizon merveilleux à deux.

Sommaire

Remerciements	9
Glossaire	13
Index des figures.....	14
I/ Introduction	15
II/ Présentation des deux agents pathogènes	18
A) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
♦ Épidémiologie & clinique.....	18
♦ Biologie.....	19
♦ Phénotypes & mécanismes de résistance.....	21
B) <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
♦ Épidémiologie & clinique.....	23
♦ Biologie.....	24
♦ Phénotypes & mécanismes de résistance.....	25
III/ Liste des antibiotiques recommandés par le CA-SFM (2021 V 1.0 avril) ...	27
A) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> & <i>Acinetobacter baumanii</i>	27
IV/ Mécanismes des antibiotiques étudiés.....	29
♦ Les β -lactamines.....	29
♦ Les aminosides.....	30
♦ Les cyclines	30
♦ Les quinolones	30
♦ Les sulfamides	30
♦ Les polymyxines	31
♦ Acide phosphonique	31
V/ Préconisation de la norme 20776 partie 1 :	32
A) Préparation de microplaques de microdilution.....	32
B) Préparation de l'inoculum	32
C) Incubation des plaques de microdilution.....	33
D) Résultats des lectures.....	33
E) Exigences relatives au bouillon de Muller-Hinton.....	33
F) Ajustement du milieu au milieu de microdilution en bouillon Muller-Hinton de référence pour l'essai d'espèces bactériennes particulières et d'autres agents microbiens	34
VI/ Outils analytiques selon la norme ISO 20776-2 partie 2 :	35

VII/ Techniques disponibles pour réaliser un antibiogramme en milieu liquide	37
A) Le Sensititre.....	37
B) Le Vitek 2	39
VIII/ Panels et valeurs des antibiotiques testés.....	42
A) <i>P. aeruginosa</i>	42
B) <i>A. baumannii</i>	46
IX/ Présentation des articles majeurs.....	50
X/ Analyse des articles majeurs.....	58
A) <i>P. aeruginosa</i> & Vitek 2.....	58
B) <i>A. baumannii</i> & Vitek 2	62
C) Sensititre.....	65
XI/ Conclusion.....	67
Annexes	70
Annexe 1 : Réalisation des solutions mères des antimicrobiens.....	70
Annexe 2 : Taux des β -lactamines dans des articles majeurs sur <i>P. aeruginosa</i> et le Vitek 2	71
Annexe 3 : Résumé des taux d'autres antibiotiques dans les articles sur <i>P. aeruginosa</i> et le Vitek 2	72
Annexe 4 : Automate Sensititre AIM.....	73
Annexe 5 : Automate Sensititre Vizion.....	73
Bibliographie	74

Glossaire

AES : Advanced Expert System : système d'expertise avancé intégré dans les cartes vitek de Biomérieux

BLSE : β -Lactamase à Spectre étendu

BMR : Bactérie Multi-Résistante

BNF : Bacille Non Fermentant

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CC : concentration critique : valeurs spécifiques de paramètres tels que les CMI, sur la base desquelles une bactérie peut être affectée aux catégories cliniques « sensible », « sensible à forte dose » et « résistance ».

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : concentration minimale inhibitrice : concentration la plus faible qui, dans des conditions *in vitro* définies, empêche la croissance de la bactérie en une période de temps défini. Exprimée en mg/L.

CHV : Centre Hospitalier de Valenciennes

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA : Food and Drug Administration

Inoculum : Nombre de bactéries dans une suspension, calculé par rapport au volume final. Exprimé en Unités Formant Colonies/mL (UFC/mL) ou en Mac Farland (McF)

MDB : Réalisation de la dilution en bouillon dans des plaques de micro-dilutions ayant un volume d'essai final $\leq 200 \mu\text{L}$

OXA : Oxacillinase, enzyme capable d'hydrolyser les β -lactamines et plus spécifique à l'oxacilline.

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLP : Proteines Liant Pénicillines

Souche sauvage : Absence de mécanisme de résistance connu vis-à-vis de l'agent antimicrobien pour une souche donnée.

SFM : Société Française de Microbiologie

Index des figures

Figure 1 : Photographies macroscopiques d'une souche de deux *P. aeruginosa* sur gélose au sang (A) et sur gélose au bromocrésol pourpre (B)

Figure 2 : Photographie d'une souche d'*A. baumannii* sur gélose au sang

Figure 3 : Cibles bactériennes des principales classes antibiotiques (1)

Figure 4 : L'automate Sensititre (A) & ses plaques de microdilution (B)

Figure 5 : L'automate Vitek 2 (A) & ses cassettes d'antibiogramme (B)

Figure 6 : Cinétiques de croissance bactérienne à différentes concentrations

Index des tableaux

Tableau 1 : Phénotypes de *P. aeruginosa* et son impact sur les antibiotiques (2)

Tableau 2 : Phénotypes de β -lactamases chez *A. baumannii* (3)

Tableau 3 : Antibiotiques recommandées en 1^{ère} intention pour *P. aeruginosa* & *A. baumannii*

Tableau 4 : Antibiotiques recommandées en complément pour *P. aeruginosa* & *A. baumannii*

Tableau 5 : Critères d'acceptabilité des outils analytiques

Tableau 6 : Panels disponibles avec les antibiotiques de 1^{ère} intention pour *P. aeruginosa*

Tableau 7 : Panels disponibles avec les antibiotiques complémentaires pour *P. aeruginosa*

Tableau 9 : Panels disponibles avec les antibiotiques de 1^{ère} intention pour *A. baumannii*

Tableau 10 : Panels disponibles avec les antibiotiques complémentaires pour *A. baumannii*

Tableau 11 : Résumé du nombre d'antibiotiques disponibles par panel pour *A. baumannii*

I/ Introduction

Un antibiogramme permet de tester la sensibilité d'une bactérie sur un panel d'antibiotiques. Il peut être réalisé sous forme solide avec des disques imprégnés d'une charge définie d'antibiotique qui diffuse dans le milieu gélosé. Ou alors il peut être réalisé en milieu liquide. Ce qui signifie que l'antibiotique est présent dans des solutions à des concentrations croissantes dans de petits puits. La bactérie testée est répartie sur l'entièreté de la gélose ou dans chaque puit et incubée aux environs de 24h à 37°C pour laisser le germe se développer. La technique liquide est appelée microdilution en bouillon (MDB).

Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) a pour mission de définir les conditions de réalisation d'un antibiogramme en milieu gélosé (milieu gélosé, taille de l'inoculum, atmosphère, temps et température d'incubation) et de lister les antibiotiques à tester, ceci en fonction du genre voire de l'espèce bactérienne à tester. Le suivi de ces recommandations assure ainsi la qualité et la reproductibilité des antibiogrammes en milieu gélosé.

Au cours des années, les recommandations du CA-SFM ont évolués. Les dernières préconisent de ne plus tester certains antibiotiques en milieu gélosé au profit de la MDB. Ce sont la colistine pour les entérobactéries, *Pseudomonas* spp et *Acinetobacter* spp, les glycopeptides (téicoplanine et vancomycine) et lipoglycopeptides pour *Staphylococcus* spp. De plus le CA-SFM recommande spécifiquement maintenant la MDB pour déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Une CMI correspond à la concentration minimale nécessaire pour inhiber la croissance visible de la bactérie. Cette valeur joue un rôle dans le pronostic de l'infection, puisqu'elle permettra au clinicien d'adapter le traitement et la posologie pour combattre efficacement l'infection.

Ainsi, le CA-SFM préconise pour obtenir une valeur de CMI de réaliser la technique liquide de MBD décrite dans la norme, ISO 20776-1 « *Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes* », plus précisément dans la partie 1 intitulée « *Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses* » (4).

Au Centre Hospitalier de Valenciennes (CHV), le laboratoire de microbiologie a déjà mis en place pour une majorité du volume traité l'antibiogramme en milieu liquide. Cela concerne les entérobactéries, les staphylocoques et les entérocoques en testant les cartes d'antibiogramme adaptées sur Vitek 2. Au regard des préconisations émises par le CA-SFM, le laboratoire souhaite poursuivre la mise en place de méthode type MDB pour réaliser l'antibiogramme, dans un premier temps pour les Bacilles Non Fermentants (BNF).

Les BNF sont un groupe de bactéries réputé pour leurs nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ils peuvent causer des infections gravissimes pour lesquelles le choix thérapeutique devient restreint, voire sans alternatives si la souche résiste à tout l'arsenal disponible.

Nous nous intéressons plus particulièrement à deux pathogènes bien connus des services hospitaliers, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Ces bactéries posent d'énormes problèmes dans le cadre d'infections nosocomiales, c'est-à-dire d'infections contractées lors du séjour à l'hôpital.

Plusieurs fabricants tentent d'automatiser l'antibiogramme en milieu liquide, notamment pour les BNF, et ont mis sur le marché des automates de MBD comme : l'UMIC, le microscan walkaway, le sensititre, le vitek. L'UMIC est une technique manuelle unitaire. Elle répond à un antibiotique à la fois, ce qui ne répond pas à une activité de routine d'un laboratoire. Le microscan walkaway est mal implanté en France, ce qui pose problème dans l'harmonisation des résultats.

Disposant déjà de deux Vitek 2, le laboratoire du CHV réfléchit à l'intérêt d'implanter l'antibiogramme liquide pour les BNF sur le Vitek 2 versus le Sensititre, technique implantée dans de nombreux centres nationaux de référence (CNR). Pour ce faire, après avoir abordé les notions générales sur *P. aeruginosa* et *A. baumannii*, et, les antibiotiques nous avons d'abord analysé avec soin la partie 1 de la norme ISO 20776-1, qui constitue le référentiel pour la bonne réalisation des CMI. Ensuite nous nous sommes proposés de décortiquer les techniques Vitek 2 et Sensititre afin d'en apprécier leur plus ou moins forte proximité aux préconisations définies dans la norme. Enfin nous avons recherché les publications internationales décrivant notamment les performances des antibiogrammes des BNF sur ces automates, pour en faire une lecture critique. Au final, fort ces réflexions, nous nous proposons de conclure par une

argumentation sur le choix le plus judicieux de la technique de BMD à implémenter pour les BNF au CHV.

II/ Présentation des deux agents pathogènes

A) *Pseudomonas aeruginosa*

◆ Épidémiologie & clinique

Selon la Société Française de Microbiologie (SFM) (5), *P. aeruginosa* prend ses racines dans la taxonomie de la façon suivante :

Embranchement : g-Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*

Espèce du groupe : *aeruginosa*

Il est aussi connu sous le nom de « bacille pyocyannique » dû au « pus bleu » des plaies surinfectées des soldats lors de la 1^{ère} Guerre Mondiale. Il devient, dans les années 60-70, l'un des agents majeurs des infections nosocomiales opportunistes grâce à ses facteurs de virulence et au développement des gestes invasifs, notamment l'intubation en service de réanimation (5). Il s'agit d'un agent aquaphile, opportuniste et non exigeant. L'hôpital représente donc un réservoir idéal par ses installations (respirateurs, humidificateurs, endoscopes...) et ses patients à l'immunité fragilisée par les traitements ou la maladie (5). Sa transmission peut être par contact direct avec l'un des réservoirs du pathogène ou par contact indirect avec du matériel médical ou l'équipe soignante (5).

Le tableau clinique lors d'infection à *P. aeruginosa* dépend du foyer plus ou moins profond (6) (7) :

- L'otite externe du nageur est une infection du conduit externe de l'oreille provoquant douleurs, inflammation du conduit et parfois un écoulement de l'oreille. Cette infection peut dégénérer chez les diabétiques, la bactérie, mal contenue, progresse et provoque : douleur plus violente, gonflement jusqu'à boucher totalement le conduit, perte d'audition, fièvre et atteinte neurologique.

- La folliculite des bains chauds est une autre infection externe légère avec inflammation, pus et douleur à la racine du poil.

- L'ecthyma gangrenosum est une ulcération douloureuse survenant chez l'immuno-déprimé (avec neutropénie). Cette lésion est favorisée sur les zones humides du corps (aisselle ou partie génitale), elle donne une plaie au centre violette/noire et des bords rouges.

- L'infection oculaire peut venir de lentilles de contact contaminées ou d'une blessure à l'œil. Une fois infecté, les enzymes de *P. aeruginosa* peuvent endommager la cornée de façon définitive.

- Les infections des tissus mous (muscles, tendons, ligaments, tissu adipeux et peau) peuvent être dues à des actes chirurgicaux, des lésions profondes ou des brûlures.

- Une pneumonie sévère est rencontrée chez des patients hospitalisés, en particulier chez ceux qui sont intubés sous respiration assistée. Ces pneumonies sont aussi observées chez les patients porteurs du VIH.

- L'infection urinaire peut arriver après une chirurgie des voies urinaires ou si le patient est porteur d'une sonde vésicale.

- Une septicémie qui par présence de bactéries vivantes dans le sang (ou bactériémie) peut infecter d'autres organes que celui de son foyer initial. Cette situation arrive en cas d'injection intraveineuse avec du matériel contaminé ou lors d'une diffusion dans le sang à partir d'un organe infecté (otite, infection urinaire devenant un sepsis).

- Les atteintes des os et des articulations sont généralement secondaires à une bactériémie.

- Les infections des valves cardiaques sont rares et se retrouvent surtout chez les toxicomanes utilisant des seringues souillées.

♦ Biologie

Biologiquement, *P. aeruginosa* est un fin bacille gram négatif non fermentant, non exigeant, non sporulé et mobile grâce à une ciliature polaire. Le terme non fermentant vient de la différence avec la grande famille des entérobactéries qui sont eux, des bacilles gram négatif fermentants et donc capables de fermenter le glucose en atmosphère privé d'oxygène. Sa culture est facile, sur milieu ordinaire, sélectif ou chromogène en aérobie stricte, à une température entre 10°C et 42°C. Le résultat de cette incubation se présente sous la forme de colonies soit à morphologie lisse/bombée, soit à morphologie luisante/muqueuse, voire coulantes (figure 1). L'identification des colonies est facilitée par l'odeur « d'acacia » / « mouchoir mouillé » et par la production de pigments : la pyocyanine (bleu) et la pyoverdine (vert) impliqué dans son

métabolisme respiratoire. Son métabolisme oxydatif utilise plusieurs enzymes comme : cytochrome C oxydase, nitrite réductase, nitrate réductase et arginine déiminase. L'identification de l'espèce *aeruginosa* se confirme à partir de colonies grâce à l'analyse de spectres protéiques totaux par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF (5).

P. aeruginosa possède de nombreux facteurs de pathogénicité capables de résister aux agressions de son hôte et à son environnement, lui permettant d'amplifier son pouvoir pathogène (8).

Le biofilm, matrice entourant la bactérie, lui permet d'adhérer à la surface de matériel, la protège contre les défenses immunitaires et les antibiotiques (5).

- Le système de sécrétion de type III (SST3) est un facteur majeur dans les pneumopathies nosocomiales des patients intubés-ventilés, il sécrète l'exotoxine (ExoU, ExoS, ExoY et ExoT).

- Les rhamnolipides sont des glycolipides capables de lyser les érythrocytes et leucocytes par ses propriétés détersives.

- La protéase LasB est une métallo-peptidase ciblant les peptides antimicrobiens et les composés structuraux des tissus de l'hôte (fibronectine, collagène), elle est actrice dans les kératites.

- Le quorum sensing est un système de communication par accumulation de molécules « signal » (homosérines, lactones) dans la bactérie et responsable de la production synchronisée des plusieurs facteurs de virulence sur un site infecté causant des infections aiguës.

Naturellement, cette bactérie possède une faible perméabilité de sa membrane externe, une porine OprF, une céphalosporinase inductible AmpC et des pompes d'efflux actifs. Ces mécanismes innés lui confèrent une résistance naturelle à plusieurs antibiotiques (2) : benzylpénicilline, ampicilline, amoxicilline, céphalosporine de 1^e et 2^e générations, céfotaxime, ceftriaxone, ertapénème, cyclines, macrolides, kanamycine, quinolones anciennes, rifampicine, chloramphénicol, triméthoprim, cotrimoxazole, glycopeptides, acide fusidique.

♦ Phénotypes & mécanismes de résistances

P. aeruginosa est devenue l'une des principales Bactéries Multi-Résistantes (BMR). En effet, en plus de ses mécanismes naturels, cette espèce bactérienne est capable de s'adapter aux antibiotiques normalement efficaces contre elle, grâce aux nombreux facteurs de virulence qu'elle peut acquérir (2) (9) :

- Pompes d'efflux actifs surexprimées responsables de la sortie de l'antibiotique en dehors de la bactérie, le médicament ne peut plus agir sur sa cible rendant la bactérie résistante. Les plus fréquentes sont les pompes MexAB-OprM, MexXY-OprM.

- Perte de la porine OprD, porte d'entrée des carbapénèmes. En cas de déficit celle-ci peut entraîner des CMI plus élevées voire une résistance.

- Surexpression de la céphalosporinase AmpC inductible hydrolysant les β -lactamines mais plus spécifiquement les céphalosporines.

- Acquisition d'autres β -Lactamases comme des pénicillinases (en exemple : PSE-1, TEM-1, OXA restreinte), des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) de type PER-1 ou OXA à spectre étendu, des carbapénémases (IMP, VIM, NDM-1)

- Enzymes plasmidiques capables de modifier les aminosides les rendant inefficaces. Les plus retrouvées sont ANT(2'')-I, AAC(3)-I et AAC(6')-Ib.

Le tableau 1 résume les différents mécanismes de résistances acquis par *P. aeruginosa* ainsi que leurs fréquences d'apparition et leurs conséquences sur les antibiotiques.

Tableau 1 : Phénotypes de *P. aeruginosa* et son impact sur les antibiotiques (2)

Phénotype	Ratio	TIC	PIP	TZP	CAZ	FEP	AZM	IMP	MERO/ DOR	CIP	LVX	TBM	AKM	FOS	COL
MexAB-OprM	20 %	R					R			S/I	I/R				
MexXY-OprM	22 %					S/R				S/I	I/R				
OprD (-)	17 %							S/I	S/I						
AmpC (+)	15 %	R	R	R	S/R	S/R	I/R								
OprD (-) / AmpC (+)	10 %	R	R	R	S/R	S/R	I/R	I/R	I/R						
GyrA / ParC	33 %									I/R	I/R				
LPS															R
Transport G-3-P	70 %													R	
Pase	8 %	R	S/R	S/R		S/R									
BLSE	<1%	R	S/R	S'	R	R	R								
MBL	<0,5%	R	S/R	R	R	R	S/I	I/R	I/R						
Enzymes												S/R	S/R		
Méthylase 16S												R	R		

Figure 1 : Photographies macroscopiques de deux souches de *P. aeruginosa* sur gélose au sang (A) et sur gélose au bromocrésol pourpre (B)

(A)



(B)



B) Acinetobacter baumannii

◆ Épidémiologie & cliniques

Selon la SFM (10), *Acinetobacter baumannii* trouve ses origines dans la taxonomie suivante :

Embranchement des γ -Proteobacteria

Classe de Gammaproteobacteria

Ordre des Pseudomonadales

Famille des Moraxellaceae

Genre *Acinetobacter*

Espèce du complexe *Acinetobacter baumannii* - *calcoaceticus*

Ce complexe regroupe les espèces *baumannii*, *nosocomialis*, *pittii*, *calcoaceticus*.

Parmi les 50 espèces appartenant au genre *Acinetobacter*, la pathogénicité humaine est principalement due à l'espèce *baumannii* (10) (11), celle-ci se détachant du reste du genre par sa capacité à résister aux antibiotiques et à sa mortalité plus importante.

A. baumannii est un pathogène opportuniste qui a su profiter dans les années 60-70 du développement des structures hospitalières pour devenir l'un des agents d'infections nosocomiales. Cette bactérie est ubiquitaire avec une préférence pour les environnements humides (boues, étangs...). Néanmoins, son habitat reste mal connu même s'il paraît être lié à l'anthropisation, *A. baumannii* ne fait pas partie de la flore commensale de l'Homme (10). Sa contamination se fait principalement par contact avec une surface inerte ou avec l'équipe médicale/paramédicale contaminée, il existe aussi des contaminations aériennes à partir des patients porteurs de la bactérie. Son infection en revanche nécessite plusieurs facteurs : une rupture de la barrière cutanée (cathéter, brûlure, coupure, sonde d'intubation...), une faiblesse immunitaire et une exposition à des antibiotiques à large spectre (10).

Si en France, elle ne représentait que 0,6% des infections nosocomiales en 2012 (10), elle pourrait être l'un des principaux pathogènes nosocomiaux dans d'autres pays d'Asie ou d'Amérique du Sud. Sur le territoire français, elle reste cependant redoutée pour ses épidémies intra-hospitalières car une fois incrustée dans un service, elle sera capable de survivre sur les surfaces favorisant les contaminations et peut conduire à la fermeture du service.

A. baumannii provoque principalement des infections respiratoires, et essentiellement des pneumonies chez les patients intubés en réanimation (12). Il est possible de retrouver cette bactérie dans les suppurations de plaies ou abcès profond (poumon, foie, etc) après une bactériémie. Exceptionnellement, elle peut être à l'origine de méningite après une neurochirurgie, endocardite infectieuse, arthrite septique (13).

◆ Biologie

A. baumannii est un bacille à Gram négatif court, immobile, non fermentant, parfois capsulé. Non exigeant, il se cultive sur des milieux ordinaires, sélectifs et chromogènes en aérobie stricte, à une température entre 30°C et 44°C. Après 24h à 48h d'incubation, on observe des colonies bombées, brillantes, pouvant être légèrement jaunâtres et parfois muqueuses (Figure 2). Sa chaîne respiratoire n'utilise pas d'oxydase ce qui permet de la différencier du genre *Pseudomonas* (10).

L'identification de l'espèce *baumannii* peut se faire par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou par technique de biologie moléculaire avec une Polymerase Chain Reaction (PCR). À noter que la PCR peut être utile pour le dépistage des résistances causées par l'expression du gène chromosomique oxacillinase type OXA-51.

Sa faculté à survivre sur les surfaces inertes et sa compétence particulière à résister aux antibiotiques en ont fait en 40 ans un modèle d'adaptation (3). Son potentiel pathogène et sa capacité à perdurer sur des surfaces proviennent de ses protéines et de sa structure (10):

- Un épaississement de sa paroi et son caractère hydrophobe lui permettant de persister sur les surfaces abiotiques plusieurs mois voire années et de résister à la dessiccation.
- La protéine OmpA de la membrane extérieure peut adhérer aux cellules épithéliales et occasionne un effet cytologique et pro-apoptotique.
- Le lipopolysaccharide (LPS) est une composante de la membrane externe des bactérie Gram négatif, celle-ci peut provoquer chez le patient : hyperthermie, hypotension, choc septique...
- L'exopolysaccharide protège contre les défenses de l'hôte, sa production est retrouvée chez environ 30% des souches.
- Le quorum sensing, système de régulation de la bactérie, est responsable d'une auto-induction de plusieurs facteurs de virulence.

- Le biofilm, matrice entourant la bactérie, lui permet d'adhérer à la surface de matériel, la protège contre les défenses immunitaires et les antibiotiques.

♦ Phénotypes & mécanismes de résistance

Dans les années 70, *A. baumannii* ne présentait aucune résistance à part pour la pénicilline mais au fur des années, elle a acquis des enzymes type β -Lactamase (3) :

- Des pénicillinases d'origine plasmidique, principalement l'enzyme TEM-1, à noter l'oxacillinase à spectre étroit OXA-21 présentant le même type de résistance.

- Des céphalosporinases non-inductibles. Il en existe plusieurs types appelés « ADC » pour Acinetobacter-Derived-Cephalosporinase insensibles aux inhibiteurs de β -lactamase. Dans certains cas elle sera hyperproduite, ce qui entraîne une résistance étendue sur toutes les céphalosporines, y compris la ceftazidime, mais touchera moins la pipéracilline et ticarcilline.

- Des BLSE. L'enzyme la plus répandue pour ce pathogène est la PER-1 inactivant l'ensemble des β -lactamines sauf les carbapénèmes.

- Des carbapénémases avec plusieurs sous-types, comme les sérine β -lactamase (GES-11, KPC...) les métallo- β -lactamase (IMP, VIM, NDM-2...) qui ont la particularité ne pas affecter l'aztréonam et les oxacillinases (OXA-23, OXA-24 like, OXA-51/69 like, OXA-58...).

Le tableau 2 résume les différents mécanismes de résistance acquis par *A. baumannii* ainsi que leurs conséquences sur les antibiotiques.

Tableau 2 : Phénotypes de β -lactamases chez *A. baumannii* (3)

Phénotype	AMP	AMC	TIC	TCC	PIP	TZP	CFX	CAZ	CEP	IMI	MER	AZM
Sauvage	S/I/R	S/I/R										S/I
Pénicillinase	R	S/I/R	R	S/I/R	R	S/I/R						S/I
Céphalosporinase	R	R	S/I	S/I	R	S/I	R	I/R	I/R			R
Pase + Case	R	R	R	R	R	I/R	R	I/R	I/R			R
Carbapénème R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I/R	I/R	I/R
BLSE	R	I/R	R	I/R	R	I/R	R	R	R			R
Métallo- β -lactamase	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

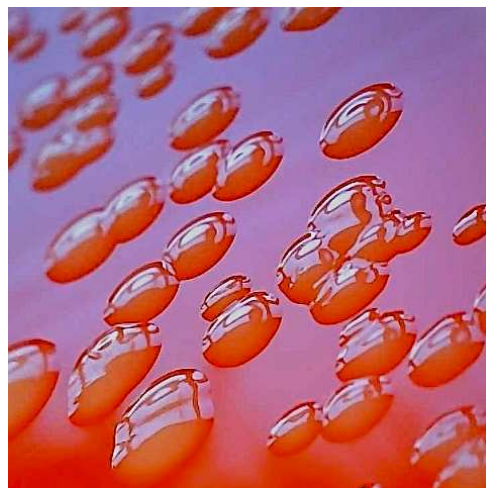
En dehors de ce panel enzymatique, *A. baumannii* possède comme *P. aeruginosa* un nombre diminué de porines par rapport aux entérobactéries, ce qui lui confère une imperméabilité constitutionnelle. Cette imperméabilité associée à d'autres mécanismes comme des pompes à efflux, d'autres enzymes, augmente le niveau des CMI de nombreux antibiotiques et confère des résistances. Pour les associations croisées de mécanisme nous pouvons citer (3) :

- Les différentes pompes d'efflux : Ade/IJK (rendant le chloramphénicol, triméthoprim, ertapénème, fosfomycine, norfloxacine inefficaces), la pompe d'efflux Ade/ABC (diminuant la sensibilité des β -lactamines, aminoglycosides, fluoroquinolones, tétracyclines, tigécycline, chloramphénicol) et la pompe d'efflux Ade/FGH (touchant les fluoroquinolones, tigécycline et clindamycine).

- Les enzymes inactivatrices d'aminosides : 75% des souches ont au moins deux enzymes parmi les adénylases, phosphotransférases, acétylases, méthylases conférant une résistance de haut niveau à tous les aminoglycosides.

- La modification de la cible des antibiotiques : la mutation des gènes *gyrA* et *parC* confère une résistance aux fluoroquinolones.

Figure 2 : Photographies d'une souche d'*A. baumannii* sur gélose au sang



III/ Liste des antibiotiques recommandés par le CA-SFM (2021 V 1.0 avril)

A) *Pseudomonas aeruginosa* & *Acinetobacter baumannii*

Afin d'harmoniser le rendu des antibiogrammes des différents laboratoires, le CA-SFM actualise la liste des antibiotiques à tester pour chaque pathogène et ce, chaque année. Nous avons fait le choix de nous baser sur les recommandations d'avril 2021 (14).

Les panels d'antibiotiques des fabricants sont destinés à être utilisés pour différentes bactéries avec chacune, des antibiotiques spécifiques à tester. Le fabricant doit choisir avec soin les antibiotiques qu'il mettra sur son panel puisque ce panel devra être capable de rendre des antibiogrammes différents en fonction de la bactérie testée. Ensuite, le fabricant doit optimiser les concentrations qu'il veut tester pour chaque antibiotique, l'intervalle de concentrations doit prendre en compte plusieurs cut-off de plusieurs bactéries. Il ne peut pas tester toutes les concentrations puisqu'il est limité par le nombre de concentrations que sa technique offre, dans notre cas, le Vitek (Biomérieux) possède 64 puits donc 64 concentrations et le Sensititre (ThermoFischer) 96 puits donc 96 concentrations. Ces contraintes représentent un défi d'optimisation et de conception.

C'est dans cette logique que nous avons rassemblé les antibiotiques recommandés par le CA-SFM 2021 V 1.0 communs aux deux pathogènes étudiés, ceux spécifiques à *P. aeruginosa* et ceux spécifiques à *A. baumannii* dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3 : Antibiotiques recommandés en 1^e intention pour *P. aeruginosa* & *A. baumannii*

Antibiotiques	β-Lactamines				Aminosides	Fluoroquinolones
	Pénicillines	Céphalosporines	Monobactams	Carbapénèmes		
Communs aux 2 agents	Ticarcilline +/- acide clavulanique Pipéracilline +/- tazobactam	Ceftazidime Céfépime		Imipénème	Amikacine Gentamicine Tobramycine	Ciprofloxacine
Propres à <i>P. aeruginosa</i>		Ceftozolane + tazobactam	Aztréonam	Méropénème		
Propres à <i>A. baumannii</i>		Céfotaxime ou Ceftriaxone				Lévofloxacine

Tableau 4 : Antibiotiques recommandés en complément pour *P. aeruginosa* & *A. baumannii*

Antibiotiques	β-Lactamines				Aminosides	Fluoroquino- lones	Autres
	Pénicil- lines	Céphalosporines	Mono- bactams	Carbapénèmes			
Communs aux 2 agents		Céfiderocol			Nétilmicine		Colistine
Propres à <i>P. aeruginosa</i>		Ceftazidime + avibactam		Méropénème + vaborbactam		Lévofoxacine	Fosfomycine
Propres à <i>A. baumannii</i>				Méropénème			Cotrimoxazole Tétracycline ou minocycline ou doxycycline

IV/ Mécanismes des antibiotiques étudiés

Nous étudierons à travers ce sujet un large panel d'antibiotiques (15) (16).

♦ Les β -lactamines

Les pénicillines (**ticarcilline, pipéracilline**), céphalosporines (**ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, céfépime, ceftozolane**), carbapénèmes (**imipénème, méropénème**) et monobactam (**aztréonam**) forment la super-famille des β -lactamines et partagent des caractéristiques communes comme leur mécanisme d'action. Les β -lactamines pénètrent la bactérie par diffusion passive à travers la membrane des grams positifs et par transport passif en passant par les « porines » pour les grams négatifs. Une fois dans la bactérie, la β -lactamine se fixe aux transpeptidases et carboxypeptidases aussi appelés « PLP » qui sont les enzymes responsables de la synthèse de la paroi bactérienne. Cette fixation entraîne une inhibition compétitive des PLP par agonisme du motif peptidique « D-Alanine-D-Alanine » provoquant l'arrêt de la synthèse de la paroi. Les β -lactamines ont en commun une action bactéricide, une activité temps-dépendant, ils diminuent aussi l'inoculum (sauf les carbapénèmes).

Cependant chacun garde des spécificités : les pénicillines avec les Aminosides auront une action synergique, les céphalosporines offrent une meilleure diffusion tissulaire, les carbapénèmes agissent sur un spectre plus large (7).

Le **céfidérol** nécessite une remarque particulière. C'est en effet une céphalosporine conjuguée à un sidérophore (chélateur de fer). Cette particularité lui confère le pouvoir de se lier au fer libre extracellulaire. Une fois lié au fer, il devient un véritable cheval de Troie puisque le fer est nécessaire à la bactérie. Cette dernière capte le fer extracellulaire mais aussi le céfidérol lié. Cette molécule utilise donc un système supplémentaire afin de pénétrer la bactérie et exercer son activité antibiotique particulièrement intéressante contre certains mécanismes d'antibiorésistance (18).

On compte aussi les **inhibiteurs de β -lactamases** que sont l'acide clavulanique, le tazobactam, le subactam, l'avibactam et le relebactam. Ils s'utilisent en association avec les β -lactamines afin d'améliorer leur efficacité ou prévenir des résistances enzymatiques bactériennes.

♦ Les aminosides

Les **gentamicine, tobramycine, amikacine, nétilmicine** forment une famille d'antibiotiques qui inhibe la synthèse protéique. Après passage actif par la chaîne respiratoire aérobie de la bactérie, ils fixent la sous-unité 30S du ribosome, l'empêchant de produire les protéines bactériennes.

Cette famille est bactéricide, son activité dépend de la concentration, possède une action post-antibiotique et sera synergique avec de nombreux antibiotiques (sauf avec les cyclines et sulfamides) (15).

♦ Les cyclines

La **tigécycline**, Omadacycline et Eravacycline font partie des antibiotiques inhibant la synthèse protéique. Pour agir, ils sollicitent le transport actif Mg^{2+} afin de fixer la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Cette fixation empêche le ribosome de jouer son rôle dans la synthèse des protéines bloquant la croissance bactérienne. Les cyclines ont une action bactériostatique.

♦ Les quinolones

Lévofloxacine, Ciprofloxacine forment une famille d'antibiotiques agissant plus en profondeur dans la bactérie, puisqu'ils empêchent la synthèse et la réplication de l'ADN bactérien en se fixant sur les enzymes responsables : la topoisomérase II chez les Grams négatifs et la topoisomérase IV en plus chez les Grams positifs. Ils auront une action bactéricide rapide, une activité dépendante de la concentration et un effet post-antibiotique (15).

♦ Les sulfamides

Le **sulfaméthoxazole** et **sulfisoxazole** appartiennent à une famille d'antibiotiques bloquant la synthèse de l'ADN des bactéries. Ils sont utilisés en association avec la famille des 2,4-diaminopyridines (triméthopime) pour une action synergique bactéricide, car indépendamment, les deux familles sont bactériostatiques. Les sulfamides sont des agonistes de la PABA (acide para-aminobenzoïque) se fixant donc sur la DHPS (DiHydroPtéroase Synthétase) empêchant l'approvisionnement des bases puriques pour la synthèse d'ADN. Mécanisme similaire pour les 2,4-diaminopyridines se fixant eux sur la DHFR (DiHydroFolate Reductase).

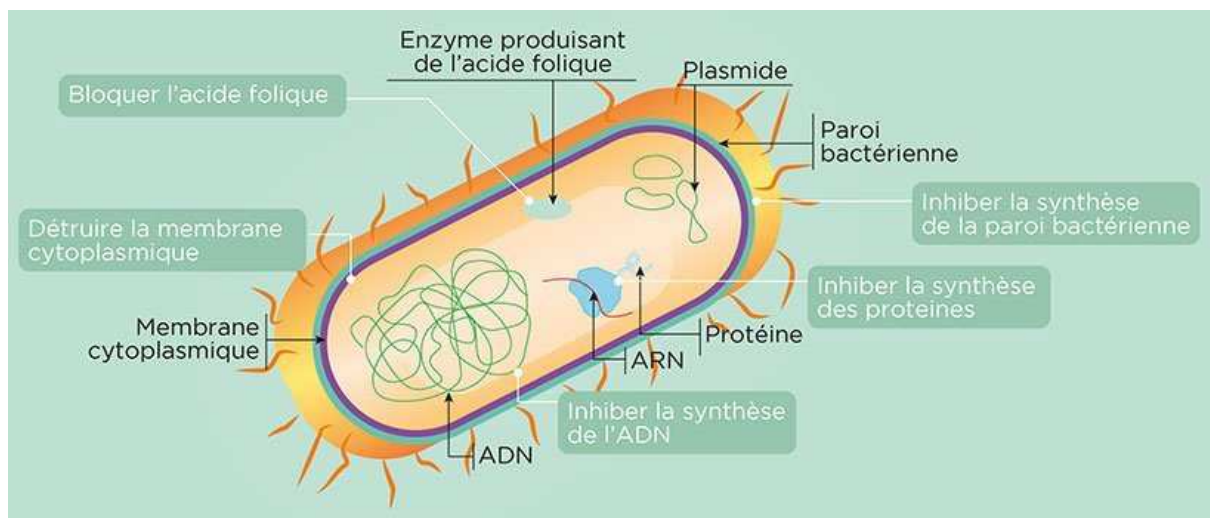
♦ Les polymyxines

La **colistine** est un polypeptide polycationique. Cette particularité structurale provoque la fuite du contenu de la bactérie à travers sa membrane.

♦ Acide phosphonique

La **fosfomycine** inhibe la synthèse des enzymes nécessaires à la production du peptidoglycane, composant indispensable de la paroi bactérienne, occasionnant un effet bactéricide (19).

Figure 3 : Cibles bactériennes des principales classes antibiotiques (1)



V/ Préconisation de la norme 20776 partie 1 : « Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à crois- sance rapide impliquées dans les maladies infec- tieuses »

A) Préparation de microplaques de microdilution

Les microplaques sont constituées de cupules en polystyrène d'un volume de 200 µL. Y sont distribués soit 50 µL d'agents antimicrobiens + 50 µL d'inoculum, soit 100 µL d'agents antimicrobiens + 10 µL d'inoculum.

Il convient d'inclure au moins deux cupules qui serviront de témoin de croissance positive et croissance négative. Le témoin négatif est représenté par 100 µL dépourvu d'agent antimicrobien non ensemencé, le témoin positif par 100 µL dépourvu d'agent antimicrobien ensemencé. La plage de concentrations d'agents antimicrobiens testées diminue par dilution ½. La concentration maximale testée est de 512 mg/L. La concentration minimale testée est de 0.125 mg/L. Cette distribution représente au total 12 dilutions.

Dilutions des agents antimicrobiens utilisés lors des essais													
En mg/L	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
En Log²	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	-1	-2	-3

B) Préparation de l'inoculum

L'inoculum final doit être d'environ 5.10^5 UFC/mL.

Pour ce faire, on commence par mettre en suspension, en bouillon Mueller-Hinton, à l'aide d'une anse stérile ou d'un écouvillon, plusieurs colonies à la morphologie similaire (si possible) issues d'une culture après une nuit sur un milieu gélosé non sélectif.

La suspension doit atteindre une turbidité équivalente à 0.5 Mc Farland. Cet étalon équivaut approximativement à une suspension de 1.10^8 à 2.10^8 UFC/mL. Une dilution au 1/100^{ème} est nécessaire pour avoisiner les 1.10^6 UFC/mL. Une fois cette dilution effectuée, 50 µL sont ensemencés dans les cupules contenant déjà 50 µL d'agents antimicrobiens pour un volume final de 100 µL. L'inoculum final est donc de 5.10^5 UFC/mL. Concernant les cupules avec un

volume de 100 µL d'agent antimicrobien, il sera nécessaire d'adapter la dilution afin d'atteindre aussi un inoculum final de 5.10^5 UFC/mL.

La plaque devra être ensemencée dans les 30 minutes après la normalisation de l'inoculum.

C) Incubation des plaques de microdilution

Il convient d'enfermer les plaques de microdilution dans un sachet ou avec un couvercle étanche afin d'éviter le dessèchement. De plus, il ne faut pas empiler plus de quatre plaques pour empêcher un chauffage irrégulier

Sauf condition particulière, l'incubation se fait à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 ± 2 heures.

D) Résultats des lectures

La lecture ne peut être faite qu'une fois le témoin positif marqué par une turbidité définie ou d'un bouton évident et l'absence de croissance dans le témoin négatif. La lecture des cupules sera comparée au témoin positif, la CMI enregistrée sera la cupule à la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien avec une absence de croissance bactérienne visible.

Il existe des exceptions à cette règle comme pour les sulfonamides et autres agents bactériostatiques présentant une inhibition partielle.

La norme ISO 20776 précise dans le paragraphe intitulé « Situations particulières pour lesquelles le résultat de CMI peut donner des résultats peu fiables » que certains mécanismes de résistance ne peuvent pas toujours être exprimés en utilisant la méthode de référence normalisée par exemple l'expression de certaines β -lactamases, pompes d'efflux ou modifications de la cible du médicament.

E) Exigences relatives au bouillon de Muller-Hinton

La normalisation du bouillon de suspension Mueller-Hinton est importante pour assurer la reproductibilité des essais. Ainsi, la Norme ISO 20776 répertorie les ingrédients nécessaires à la pousse des micro-organismes non exigeants : infusion de 300 g de boeuf déshydraté, 17,5 g de digestat acide caséine, 1,5 g d'amidon de maïs, QSP 1 000 mL d'eau distillé, pH 7,2 - 7,4, et, ajout de cations divalents pour une concentration finale en Calcium entre 20 - 25 mg/L, et, en Magnésium entre 10 - 12,5 mg/L

F) Ajustement du milieu au milieu de microdilution en bouillon Muller-Hinton de référence pour l'essai d'espèces bactériennes particulières et d'autres agents microbiens

La norme identifie que certains antimicrobiens présentent des contraintes pour assurer les bonnes conditions de l'essai, notamment :

- Les sulfonamides et triméthoprimine nécessitent un milieu avec une concentration en thymidine inférieure à 0,03 mg/L.
- Le céfidérol est une céphalosporine sidérophore, le bouillon Mueller-Hinton devra être appauvri en fer par un chélateur de fer, néanmoins le milieu devra respecter le reste des concentrations en cations.
- L'imipénème et le méropénème ont besoin d'une concentration en zinc inférieure à 3 mg/L, élément nécessaire à l'activité de ces carbapénèmes.
- Contrairement aux pratiques courantes par le passé, la colistine n'a pas besoin d'être associée à des agents tensioactifs tel que le polysorbate 80.

VI/ Outils analytiques selon la norme ISO 20776-2

partie 2 :

« Évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes » (20)

La performance d'une technique commerciale est évaluée à l'aide de plusieurs critères définis par le Clinical and laboratory standards institute (CLSI), par la Food and Drug Administration (FDA) et la norme 20776 (Tableau 5).

Tableau 5 : Critères d'acceptabilité des outils analytiques

Paramètres	Formule	Définition	Critères d'acceptabilité		
			Selon FDA	Selon CLSI	Selon norme 20776
Accord essentiel (AE)	$(N_{EA}/NT) \times 100$	N_{EA} = nombre d'isolats testés en méthode directe présentant une valeur de CMI identique ou inférieure à une dilution de 2 en 2 avec la méthode de référence NT = nombre d'isolats testés	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$
Accord catégorique (AC)	$(N_{CA}/NT) \times 100$	N_{CA} = nombre d'isolats testés en méthode directe ayant la même catégorie de susceptibilité qu'en méthode standard NT = nombre d'isolats testés	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$	
Erreur mineure (mE)	$(N_{me}/NT) \times 100$	N_{me} = nombre d'isolats présentant des erreurs mineures* NT = nombre d'isolats testés	/	$\leq 10\%$	
Erreur majeure (ME)	$(N_{ME}/N_{RefS}) \times 100$	N_{ME} = nombre d'isolats rendus faussement résistants N_{RefS} = nombre d'isolats rendus sensibles par la méthode de référence	$\leq 3\%$	$< 3\%$	
Erreur très majeure (VME)	$(N_{VMe}/N_{RefR}) \times 100$	N_{VMe} = nombre d'isolats rendus faussement sensibles N_{RefR} = nombre d'isolats rendus résistants par la méthode de référence	$\leq 1.5\%$	$< 3\%$	
Le biais	$\%CMI_{sup} - \%CMI_{inf}$	Différence entre le pourcentage de CMI rendue supérieure à la CMI de référence et le pourcentage de CMI rendue inférieure à la CMI de référence. CMI_{sup} = CMI étudiée supérieure à la CMI en méthode de référence CMI_{inf} = CMI étudiée inférieure à la CMI en méthode de référence			+/- 30%

*L'erreur mineure (me) renvoie à une souche résistante ou sensible en méthode de référence répondue à tort intermédiaire en méthode à évaluer, ou, une souche intermédiaire en méthode de référence répondue à tort résistante ou sensible en méthode à évaluer.

Ces critères sont ardues d'abord et méritent quelques explications pour que l'utilisation et la signification de ces outils soient claires pour tous.

- **Accord catégorique** : La CMI étudiée est différente de la méthode de référence mais la catégorie de susceptibilité reste la même : Sensible, Intermédiaire ou Résistant.

- **Accord essentiel** : La CMI étudiée est égale ou différente de moins d'un log2 à la valeur de référence.

- **Erreur mineure (mE)** : L'antibiotique est rendu faussement intermédiaire quand la méthode de référence rend sensible ou résistant ou inversement (rendu sensible ou résistant sur une souche intermédiaire).

- **Erreur majeure (ME)** : L'antibiotique est rendu faussement résistant quand la méthode de référence rend sensible pour la souche testée.

- **Erreur très majeure (VME)** : L'antibiotique est rendu faussement sensible quand la méthode de référence rend résistance pour la souche testée.

- **Le biais** : Différence entre le pourcentage de CMI rendu supérieur à la CMI de référence et le pourcentage de CMI rendu inférieur à la CMI de référence.

Ces critères sont connus par les fabricants qui souhaiteraient mettre au point une technique de rendu d'antibiogramme en milieu liquide et la commercialiser. Cela permet d'harmoniser les résultats afin que les laboratoires puissent choisir plus facilement l'automate qui correspond à leur activité et leurs exigences.

VII/ Techniques disponibles pour réaliser un antibiogramme en milieu liquide

À ce jour, deux techniques sont commercialisées en France pour dispenser un antibiogramme en milieu liquide pour les espèces non fermentantes, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* : Le Sensititre, Le Vitek. Leurs différences portent sur leur principe technique, les panels et valeurs des antibiotiques testés.

A) Le Sensititre

Figure 4 : l'automate ARIS 2X Sensititre (A) & ses plaques de microdilution (B)



ThermoFischer commercialise la technique Sensititre depuis quelques années. Il l'annonce comme l'automatisation de la méthode de référence. Pour savoir s'ils y sont parvenus, nous avons lu attentivement la brochure descriptive du fabricant, et l'avons comparée à celle décrite dans la norme ISO 20776-1 précédemment détaillée. Au regard des informations disponibles, nous avons pu noter deux différences relativement mineures entre le Sensititre et le protocole normatif que sont l'inoculum final et le volume utilisé par cupule.

L'inoculum final de la méthode de référence est d'environ 5.10^5 UFC/mL. Pour le Sensititre, le fabricant nous demande de mettre 3-5 colonies dans de l'eau stérile afin d'atteindre une suspension de 0.5 McF par turbidimétrie. Il faut ensuite mélanger 10 μ L de cette suspension dans un tube contenant 5mL de bouillon de Muller Hinton. C'est ensuite cette suspension qui est distribuée sur la plaque. Sachant qu'un 0,5 McF équivaut à $1,0 - 2,0 \times 10^8$ UFC/mL, les 10 μ L pipetés représentent un inoculum de 10^6 introduits dans 5 mL.

Au final la suspension préparée correspond à $2,0 - 4,0 \times 10^5$ UFC/mL. Elle est ensuite distribuée sur la plaque sans aucune dilution.

Pour ce qui concerne le volume utilisé par cupule, rappelons que les cupules décrites par la norme et par ThermoFischer peuvent accueillir un volume maximal de 200 µL. La norme ISO 20776 utilise dans la majorité des cas 100 µL par puit et 110 µL en cas de contrainte technique tandis que le Sensititre n'utilise que 50 µL.

Mais certaines informations n'étant pas accessibles, il n'est pas possible d'identifier l'existence de différences avec la norme, en particulier sur le milieu liquide.

B) Le Vitek 2

Figure 5 : L'automate Vitek 2 (A) & ses cassettes d'antibiogramme (B)

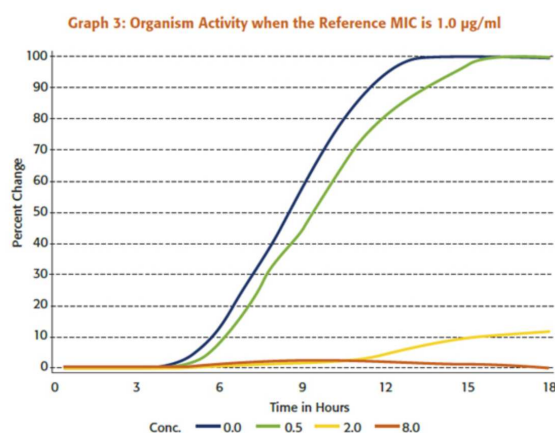


Le Vitek est un automate présent depuis plus de 20 ans dans les laboratoires de bactériologie. Malgré son ancienneté, sa technologie pour déterminer des CMI reste novatrice. Biomérieux s'affranchit de la norme ISO 20776 et explique : « comment le vitek génère-t-il des valeurs de CMI ? » sans toujours tester les concentrations qu'il rend sur l'antibiogramme (21). Les panels d'antibiotiques sont testés au travers de cassettes contenant 64 microcuvettes (Figure 5B). Chaque cassette contient un contrôle positif de croissance du germe sans antibiotique et le reste des microcuvettes contiennent un antibiotique à une concentration connue. À la croissance de la bactérie le puits se trouble, cette turbidité est mesurée en unité de transmittances brutes, toutes les 15 minutes, pour chaque microcuvette (21). Le logiciel AES (Advanced Expert System) du Vitek rassemble ces cinétiques de turbidité pour établir une courbe de croissance en fonction du temps pour chaque puits.

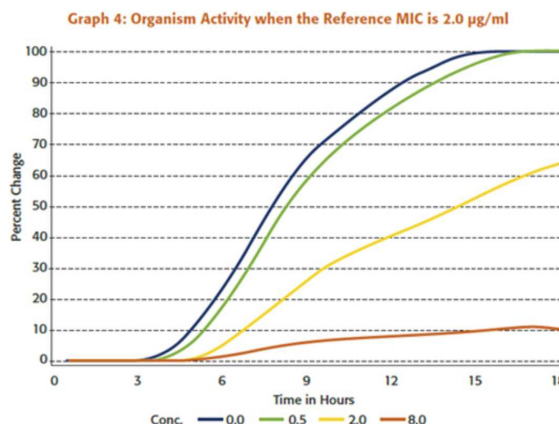
Évidemment chaque germe possède une cinétique de croissance unique et réagit différemment au contact d'un antibiotique. C'est le contrôle positif dépourvu d'antibiotique qui donne la cinétique de pousse de la bactérie sans perturbation. Chaque courbe obtenue en présence d'antibiotique est comparée à celle du contrôle positif. Plus la concentration d'antibiotique est élevée, moins la bactérie pousse. Enfin, le logiciel AES du Vitek rassemble pour un même antibiotique les différentes concentrations testées et leurs courbes correspondantes pour établir la valeur de la CMI. Cette valeur est soit réellement celle mesurée (Figure 6B), soit extrapolée (Figure 6A) par modélisation (Figure 6C).

Figure 6 : Cinétiques de croissance bactérienne à différentes concentrations (21)

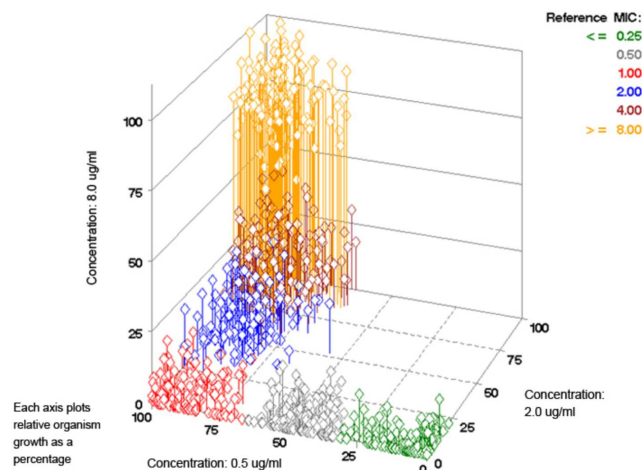
A) CMI à 1,0 µg/mL extrapolé



B) CMI à 2,0 µg/mL testé



C) Répartition 3D de trois CMI testés pour une espèce bactérienne



Au regard de ces informations, on comprend mieux l'annonce de Biomérieux qui affirme que le Vitek est plus efficace (21) que la microdilution de référence puisque celui-ci ne mesure pas la croissance bactérienne une fois après 18-24h de pousse mais bien de façon régulière tout au long de la pousse du germe. Dans tous les cas, il est clair que cette technologie s'affranchit de la norme 20776 pour établir des CMI en milieu liquide : taille de l'inoculum, volume des cupules, délai d'incubation et autres originalités.

Grâce au système Advanced Expert System™ (AES), chaque résultat de CMI est vérifié par rapport à une base de données de plus de 3500 phénotypes et 30 000 distributions de CMI pour assurer la cohérence avec les phénotypes sauvages ou résistants définis précédemment. (22)

La figure 5C est une représentation en trois dimensions des données contenues dans l'automate (Système AES), c'est la répartition des niveaux de résistance d'une population bactérienne dont les CMI sont connus et dont la croissance a été observée/étudiée sur trois CMI. Notre pathogène testé sur ces trois CMI donnera trois cinétiques de pousse qui seront superposées à cette base de données pour en déduire la CMI, même si celle-ci n'est pas testée.

Maintenant que nous avons étudié le fonctionnement interne des automates qui nous intéressent, nous pouvons nous intéresser aux panels d'antibiotiques que chacun propose. Ces panels peuvent être déterminants dans la décision d'un laboratoire, puisque ces derniers doivent aussi respecter de multiples contraintes. Chaque panel est destiné à plusieurs entités de bactéries, dans notre cas cela concerne les bacilles gram négatif. Ces différents groupes sont soumis aux recommandations CA-SFM, n'ont toujours les mêmes antibiotiques à tester (Exemple : Tableau 3 & 4) et n'ont pas non plus les mêmes cut-off, ce qui rajoute une contrainte sur des techniques où le nombre de puits est limité.

VIII/ Panels et valeurs des antibiotiques testés

A) *P. aeruginosa*

Les tableaux ci-dessous réunissent pour *P. aeruginosa* les panels et concentrations testés mis à disposition par les fabricants Biomérieux et Thermo-Fischer qui sont recommandées par le CA-SFM 2021 V1.0. Pour simplifier notre travail, nous avons séparé sur deux tableaux les panels de 1^e intention (Tableau 6) et les panels en complément (Tableau 7) recommandés par la CA-SFM 2021 V1.0. Les comparaisons ont porté sur la plaque Sensititre FRAM2GN (23) et la carte Vitek 2 N240 (24), réactifs annoncés par les fournisseurs comme les plus adaptés pour *P. aeruginosa*.

Tableau 6 : Panels disponibles avec les antibiotiques de 1^e intention pour *P. aeruginosa*

Automate (Fabricant)	Sensititre (ThermoFischer)	Vitek (Biomérieux)
Nom des panels	FRAM2GN	N240 (BNF)
<u>PÉNICILLINE</u>		
Témocilline	4 - 8 - 16 - 32	
Ticarcilline		? - 16 - 32 - 64 - ?
Ticarcilline/Ac. clavulanique		8/2 - ? - 32/2 - 64/2 - ?
Pipéracilline		4 - ? - 16 - 32 - 64 - ?
Pipéracilline/Tazobactam	2/4 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64	2/4 - 8/4 - 24/4 - 32/4 - 32/8 - 48/8
<u>CÉPHALOSPORINE</u>		
Ceftazidime	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	1 - 2 - ? - 8 - ? - 32 - ?
Ceftazidime/Avibactam	0,5/4 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	
Céfépime	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	? - 2 - ? - 8 - 16 - 32 - ?
Ceftolozane/Tazobactam	0,5/4 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	
<u>MONOBACTAM</u>		
Aztréonam	1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	? - 2 - ? - 8 - ? - 32 - ?
<u>CARBAPÉNÈME</u>		
Imipénème	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	? - ? - 1 - 2 - 6 - 12 - ?
Méropénème	0,12 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	? - 0,5 - ? - 2 - 6 - 12 - ?
Ertapénème	0.06 - 0.12 - 0.25 - 0.5 - 1	
<u>AMINOSIDE</u>		
Amikacine	1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	? - ? - 8 - 16 - ? - 64
Gentamicine	1 - 2 - 4 - 8	? - ? - 4 - ? - 16 - 32
Tobramycine		? - ? - ? - 8 - 16 - 64
<u>QUINOLONES</u>		

Ciprofloxacine	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	? – 0,5 - ? - 2 - 4
Lévofloxacine		? – 0,25 – 0,5 - ? - 2 - ? - 8
<u>CYLCLINES</u>		
Tigécycline	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4	
<u>SULFAMIDES</u>		
Sulfaméthoxazole/Triméthoprim	1/19 - 2/38 - 4/76 - 8/152	1/19 - ? - 4/76 - ? - 16/304
<u>AUTRES</u>		
Colistine*	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	? - ? - ? - 4 - ? - 16 - 32
Rifampicine		2 - 4 - 16
Témoin positif	1	1

Les antibiotiques en gris ne sont pas recommandés par la CA-SFM. Les valeurs en vert, orange et rouge correspondent respectivement aux valeurs sensibles, sensibles à forte posologie et résistantes. Les CMI extrapolées par le Vitek sont signalées par un point d'interrogation.

* : Antibiotiques recommandés en complémentaire et non en 1^e intention

Nous avons dans ce second tableau le fabricant ThermoFischer en bleu avec ses trois panels d'intérêt en 2^e intention « ESB1F » (25), « MDRGNX2F » (26) et « EUMDROXF » (27) et Biomérieux en vert avec son panel « XN12 » (28) pour les bacilles non fermentants (Tableau 7).

Tableau 7 : Panels disponibles avec les antibiotiques complémentaires pour *P. aeruginosa*

Automate (Fabricant)	Sensititre (ThermoFischer)			Vitek (Biomérieux)
Nom des panels	ESB1F	MDRGNX2F	EUMDROXF	XN12 (BMR)
<u>PÉNICILLINE</u>				
BLSE				6 puits
Témocilline				4 - 8 - 24 - ?
Ampicilline	8 - 16			
Ticarcilline/Ac. clavulanique*				8 - ? - 32 - 64 - ?
Pipéracilline*				? - ? - 16 - 32 - 64 - ?
Pipéracilline/Tazo-bactam*	4/4 - 8 - 16 - 32 - 64		4/4 - 8 - 16 - 32	
<u>CÉPHALOSPORINE</u>				
Céfazoline	8 - 16			
Céfuroxime				? - 2 - ? - 8 - ? - 32 - ?
Céfoxitine	4 - 8 - 16 - 32 - 64			
Ceftriaxone	1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64 - 128			0,12 – 0,25 - ? - 1 - ? - 4 - ? - 16 - ? - ?
Céfotaxime	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64			

Céfotaxime/Ac. clavulanique	0,12/4 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64			
Cefpodoxime	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32			
Céfixime*				0,25 - ? - 1 - 2 - ?
Ceftazidime*	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64 - 128			
Ceftazidime/Avibactam		0,12/4 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	0,25/4 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	0,06 - ? – 0,25 - ? - 1 - ? - 4 - ? - 16
Ceftazidime/Ac. clavulanique	0,12/4 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64			
Ceftolozane/Tazobactam*		0,06/4 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	0,25/4 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	0,5 - 1 - ? - 4 - 8 - ? - 32
Cefazoline	8 - 16			
Céfépime*	1 - 2 - 4 - 8 - 16		1 - 2 - 4 - 8 - 16	? – 0,25 - ? - 1 - ? - 4 - ? - 16 - 32
Céfidérol		0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	
<u>MONOBACTAM</u>				
Aztréonam*			1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	? - 2 - ? - 8 - ? - 32 - ?
<u>CARBAPÉNÈME</u>				
Imipénème*	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	2 - 4 - 8 - 16	1 - 2 - 4 - 8	
Imipénème/Relebactam		0,03/4 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	0,06/4 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	
Méropénème*	1 - 2 - 4 - 8	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	? – 0,5 - ? - 2 - 6 - 12 - ?
Méropénème/Vaborbactam		0,008/8 – 0,015 – 0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	0,06/8 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	
<u>AMINOSIDE</u>				
Amikacine*			2 - 4 - 8 - 16 - 32	
Gentamicine*	4 - 8 - 16			
Tobramycine*			0,5 - 1 - 2 - 4	
Plazomicine		0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4		
<u>QUINOLONES</u>				
Ciprofloxacine*	1 - 2			
Lévofloxacine*				? – 0,25 – 0,5 - ? - 2 - ? - 8
Delafloxacine			0,12 – 0,25 – 0,5 - 1	
<u>CYLCLINES</u>				
Tigécycline				? - 1 - ? - 5 - 8
Omadacycline		0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8		

Eravacycline		0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	0,008 – 0,015 – 0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5	
<u>SULFAMIDES</u>				
Triméthoprim				0,5 - ? - 2 - ? - 8 - ?
<u>AUTRES</u>				
Fosfomycine/Glu- cose-6-phosphate		64 - 128	16 - 32 - 64	
Chloramphénicol				? - 4 - ? - 16 - 32 - ?
Colisistine		0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	
Témoin positif	3			
Témoin négatif	NEG			

Les antibiotiques en gris ne sont pas recommandés par la CA-SFM. Les valeurs en vert, orange et rouge correspondent respectivement aux valeurs sensibles, sensibles à forte posologie et résistantes. Les CMI extrapolées par le Vitek sont signalées par un point d'interrogation.

* : Antibiotiques recommandés en 1^e intention et non en complément

Pour résumer le nombre d'antibiotiques d'intérêt sur les différents panels pour *P. aeruginosa*, nous avons établi le tableau suivant (Tableau 8).

Tableau 8 : Résumé du nombre d'antibiotiques disponibles par panel pour *P. aeruginosa*

Nombres d'antibiotiques	CA-SFM	FRAM2GN	N240	ESB1F	MDRGNX2F	EUMDROXF	XN12
Total	22	16	17	16	12	16	16
1 ^{ère} intention	14	10	14	6	6	8	6
2 ^{ème} intention	8	1	1	0	3	6	2
Nombre de concentrations testées (+ extrapolées)		66	51 (89)	32	67	82	31 (57)

En termes de panel d'antibiotiques à tester, il est évident que la carte Vitek N240 répond mieux aux recommandations du CA-SFM que la plaque Sensititre FRAM2GN en 1^{ère} intention. Néanmoins, cette dernière évalue le plus souvent entre 6 et 8 charges pour chaque antibiotique et intègre les nouvelles molécules (la ceftazidime-avibactam et le ceftolozone-tazobactam), qui ont tout leur intérêt en cas de souche de *P. aeruginosa* multi-résistant. La carte Vitek ne teste le plus souvent que 3 à 4 valeurs d'antibiotiques et utilise son système AES pour en extrapoler 2 à 4 de plus.

Concernant les panels de seconde intention, la plaque Sensititre EUMDROXF répond à plus d'antibiotiques recommandés avec plus de concentrations testées que le Vitek 2 et sa carte XN12.

B) A. baumannii

Les tableaux ci-dessous réunissent pour *A. baumannii* les panels et concentrations testés mis à disposition par les fabricants Biomérieux et Thermo-Fischer qui sont recommandées par le CA-SFM 2021 V1.0. Pour simplifier notre travail, nous avons séparé sur deux tableaux les panels de 1^e intention (Tableau 9) et les panels en complément (Tableau 10) recommandés par la CA-SFM 2021 V1.0. Les comparaisons ont porté sur la plaque Sensititre FRAM2GN (23) et la carte Vitek 2 N240 (24), réactifs annoncés par les fournisseurs comme les plus adaptés pour *A. baumannii*.

Tableau 9 : Panels disponibles avec les antibiotiques de 1^e intention pour *A. baumannii*

Automate (Fabricant)	Sensititre (ThermoFischer)	Vitek (Biomérieux)
Nom des panels	FRAM2GN	N240 (BNF)
<u>PÉNICILLINE</u>		
Témocilline	4 - 8 - 16 - 32	
Ticarcilline		? - 16 - 32 - 64 - ?
Ticarcilline/Ac. clavulanique		8/2 - ? - 32/2 - 64/2 - ?
Pipéracilline		4 - ? - 16 - 32 - 64 - ?
Pipéracilline/Tazobactam	2/4 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64	2/4 - 8/4 - 24/4 - 32/4 - 32/8 - 48/8
<u>CÉPHALOSPORINE</u>		
Ceftazidime	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	1 - 2 - ? - 8 - ? - 32 - ?
Ceftazidime/Avibactam	0,5/4 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	
Céfépime	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	? - 2 - ? - 8 - 16 - 32 - ?
Ceftolozane/Tazobactam	0,5/4 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	
<u>MONOBACTAM</u>		
Aztréonam	1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	? - 2 - ? - 8 - ? - 32 - ?
<u>CARBAPÉNÈME</u>		
Imipénème	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	? - ? - 1 - 2 - 6 - 12 - ?
Méropénème	0,12 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	? - 0,5 - ? - 2 - 6 - 12 - ?
Ertapénème	0,06 - 0,12 - 0,25 - 0,5 - 1	
<u>AMINOSIDE</u>		
Amikacine	1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	? - ? - 8 - 16 - ? - 64
Gentamicine	1 - 2 - 4 - 8	? - ? - 4 - ? - 16 - 32
Tobramycine		? - ? - ? - 8 - 16 - 64
<u>QUINOLONES</u>		
Ciprofloxacine	0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	? - 0,5 - ? - 2 - 4
Lévofloxacine		? - 0,25 - 0,5 - ? - 2 - ? - 8

<u>CYLCLINES</u>		
Tigécycline	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4	
<u>SULFAMIDES</u>		
Sulfaméthoxazole/Triméthoprine	1/19 - 2/38 - 4/76 - 8/152	1/19 - ? - 4/76 - ? - 16/304
<u>AUTRES</u>		
Colistine*	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	? - ? - ? - 4 - ? - 16 - 32
Rifampicine		2 - 4 - 16
Témoin positif	1	1

Les antibiotiques en gris ne sont pas recommandés par la CA-SFM. Les valeurs en vert, orange et rouge correspondent respectivement aux valeurs sensibles, sensibles à forte posologie et résistantes. Les CMI extrapolées par le Vitek sont signalées par un point d'interrogation.

* : Antibiotiques recommandés en complémentaire et non en 1^e intention

Nous avons dans ce second tableau le fabricant ThermoFischer en bleu avec ses trois panels d'intérêt en 2^e intention « ESB1F » (25), « MDRGNX2F » (26) et « EUMDROXF » (27) et Biomérieux en vert avec son panel « XN12 » (28) pour les bacilles non fermentants. (Tableau 10)

Tableau 10 : Panels disponibles avec les antibiotiques complémentaires pour *A. baumannii*

Automate (Fabricant)	Sensititre (ThermoFischer)			Vitek (Biomérieux)
Nom des panels	ESB1F	MDRGNX2F	EUMDROXF	XN12 (BMR)
<u>PÉNICILLINE</u>				
BLSE				6 puits
Témocilline				4 - 8 - 24 - ?
Ampicilline	8 - 16			
Ticarcilline/Ac. clavulanique*				8 - ? - 32 - 64 - ?
Pipéracilline*				? - ? - 16 - 32 - 64 - ?
Pipéracilline/Tazobactam*	4/4 - 8 - 16 - 32 - 64		4/4 - 8 - 16 - 32	
<u>CÉPHALOSPORINE</u>				
Céfazoline	8 - 16			
Céfuoxime				? - 2 - ? - 8 - ? - 32 - ?
Céfoxitine	4 - 8 - 16 - 32 - 64			
Ceftriaxone	1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64 - 128			0,12 – 0,25 - ? - 1 - ? - 4 - ? - 16 - ? - ?
Céfotaxime	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64			
Céfotaxime/Ac. clavulanique	0,12/4 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64			

Cefpodoxime	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32			
Céfixime*				0,25 - ? - 1 - 2 - ?
Ceftazidime*	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64 - 128			
Ceftazidime/Avibactam		0,12/4 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	0,25/4 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	0,06 - ? – 0,25 - ? - 1 - ? - 4 - ? - 16
Ceftazidime/Ac. clavulanique	0,12/4 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64			
Ceftolozane/Tazobactam*		0,06/4 – 0,12 – 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	0,25/4 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	0,5 - 1 - ? - 4 - 8 - ? - 32
Cefazoline	8 - 16			
Céfépime*	1 - 2 - 4 - 8 - 16		1 - 2 - 4 - 8 - 16	? – 0,25 - ? - 1 - ? - 4 - ? - 16 - 32
Céfiderocol		0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	
<u>MONOBACTAM</u>				
Aztréonam*			1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32	? - 2 - ? - 8 - ? - 32 - ?
<u>CARBAPÉNÈME</u>				
Imipénème*	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	2 - 4 - 8 - 16	1 - 2 - 4 - 8	
Imipénème/Relebactam		0,03/4 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	0,06/4 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	
Méropénème*	1 - 2 - 4 - 8	0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	? – 0,5 - ? - 2 - 6 - 12 - ?
Méropénème/Vaborbactam		0,008/8 – 0,015 – 0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	0,06/8 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	
<u>AMINOSIDE</u>				
Amikacine*			2 - 4 - 8 - 16 - 32	
Gentamicine*	4 - 8 - 16			
Tobramycine*			0,5 - 1 - 2 - 4	
Plazomicine		0,12 – 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4		
<u>QUINOLONES</u>				
Ciprofloxacine*	1 - 2			
Lévofloxacine*				? – 0,25 – 0,5 - ? - 2 - ? - 8
Delafloxacine			0,12 – 0,25 – 0,5 - 1	
<u>CYLCLINES</u>				
Tigécycline				? - 1 - ? - 5 - 8
Omadacycline		0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8		

Eravacycline		0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8	0,008 – 0,015 – 0,03 – 0,06 – 0,12 – 0,25 – 0,5	
SULFAMIDES				
Triméthoprim				0,5 - ? - 2 - ? - 8 - ?
AUTRES				
Fosfomycine/Glu- cose-6-phosphate		64 - 128	16 - 32 - 64	
Chloramphénicol				? - 4 - ? - 16 - 32 - ?
Colisistine		0,25 – 0,5 - 1 - 2 - 4	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16	
Témoin positif	3			
Témoin négatif	NEG			

Les antibiotiques en gris ne sont pas recommandés par la CA-SFM. Les valeurs en vert, orange et rouge correspondent respectivement aux valeurs sensibles, sensibles à forte posologie et résistantes. Les CMI extrapolées par le Vitek sont signalées par un point d'interrogation.

* : Antibiotiques recommandés en 1^e intention et non en complément

Pour résumer le nombre d'antibiotiques d'intérêt sur les différents panels pour *A. baumannii*, nous avons établi le tableau suivant. (Tableau 11)

Tableau 11 : Résumé du nombre d'antibiotiques disponibles par panel pour *A. baumannii*

Nombres d'antibiotiques	CA-SFM	FRAM2GN	N240	ESB1F	MDRGNX2F	EUMDROXF	XN12
Total	19	16	17	16	12	16	16
1 ^{ère} intention	13	10	12	6	6	8	6
2 ^{ème} intention	6	1	3	0	3	6	2
Nombre de concentrations testés (+ extrapolés)		66	54 (89)	32	65	75	35 (43)

Ici encore, les conclusions sont identiques à celles constatées pour *P. aeruginosa*. La carte Vitek N240 répond mieux que la plaque Sensititre FRAM2GN aux recommandations du CA-SFM, pour la liste des antibiotiques à tester en 1^{ère} intention. Les constats sur les concentrations d'antibiotiques testées et extrapolées sont évidemment identiques à celles établies pour *P. aeruginosa*.

Concernant les panels de seconde intention, le constat est aussi identique à celui de *P. aeruginosa*.

IX/ Présentation des articles majeurs

Biomérieux nous fournit les résultats officiels du Vitek 2 dans leur brochure « AST-N240 » et « AST-XN12 » (24) & (28). Ces résultats sont intéressants puisqu'ils nous ont permis une première évaluation des performances du Vitek 2 selon les cut-off de l'EUCAST. À noter que ces résultats sont globaux aux bactéries testées : Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* sauf la colistine qui concerne aussi *Acinetobacter*. L'AE annoncé s'étend de la lévofloxacine (99,4%) suivi la tobramycine (98,9%) jusqu'à des performances plus faibles pour la pipéracilline (93,9%) et la céfépime (93,3%). L'AC le plus haut est retrouvé pour cotrimoxazole (99,5%), la ceftolozane/tazobactam (99,1%), ceftazidime/avibactam (98,9%) et des résultats plus faibles sont retrouvés pour la pipéracilline (88,5%) et ticarcilline/acide clavulanique (87%). Les VME, ME, mE sont inférieures à 3% sauf pour la colistine avec un VME à 4,7%.

Les données fournisseur sont bien sûr à confronter à la bibliographie. Cette dernière est florissante ; l'association des trois mots clefs *P. aeruginosa* + susceptibility + Vitek 2 sur Pubmed recense 168 articles, 158 en remplaçant *P. aeruginosa* par *A. baumannii*. Pour *P. aeruginosa*, certains articles traitent du sujet ne sont pas présentés par la suite. À la lecture complète, ils s'éloignaient trop de notre problématique ou étaient trop anciens. (29–36)

Deux études ont attiré tout particulièrement notre attention, l'une de 2017 (37), l'autre de 2021 (38).

La première, écrite par Bobenchik et al. porte sur *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (37). 99 *P. aeruginosa* et 26 *A. baumannii* sont testés sur Vitek avec les cartes AST-GN69 et AST-XN06 en les comparant à la MDB. Notons que ces cartes ne sont pas celles utilisées dans notre routine. 8 souches de *P. aeruginosa* étaient mucoïdes. Elles ont dû être retirées de l'étude en l'absence répétée de pousse sur le contrôle, problème connu sur le Vitek (24).

Pour *P. aeruginosa*, 11 antibiotiques sont testés dont 10 sont attendus par le CA-SFM 2021 : pipéracilline-tazobactam, céfépime, ceftazidime, imipénème, méropénème, amikacine, gentamicine, tobramycine, ciprofloxacine, lévofloxacine. Si on se concentre sur les 9 antibiotiques d'intérêt, l'accord catégorique est compris entre 100% pour l'amikacine et 86,8% pour la gentamicine. L'accord essentiel est de 100% pour 7 antibiotiques, et, 98,9% pour la pipéracilline-tazobactam et la gentamicine.

Des repassages ont été effectués au vu d'erreurs majeurs (ME), résolvant 4 des 16 erreurs majeures initialement constatées, sans préciser la nature des 4 ME résolues. Sur les 12 ME restantes, 3 sont dues à une CMI surestimée pour la pipéracilline-tazobactam : 128 mg/mL en Vitek contre 64 mg/mL en microdilution.

Concernant *A. baumannii*, ils ont testé 14 antibiotiques, 12 sont d'intérêt : pipéracilline-tazobactam, céfépime, céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, imipénème, méropénème, gentamicine, tobramycine, ciprofloxacine, lévofloxacine, cotrimoxazole. L'accord catégorique varie entre 100% (imipénème, gentamicine, fluoroquinolones et cotrimoxazole) et 76,9% (ceftriaxone). L'accord essentiel est de 100% sauf pour la ceftazidime, ceftriaxone et tobramycine avec 96,2%. Les auteurs précisent que 5 des 6 erreurs très majeures (VME) et 1 erreur majeure (ME) initialement détectées ont été corrigées après repasse. Ils n'intègrent donc qu'une VME pour la tobramycine qui est attribuée à la différence de cut-off du Vitek et du CLSI.

La seconde étude (38) compare la ceftazidime/avibactam (CZA) et ceftolozane/tazobactam (C/T) sur E-test, Diffusion en disque, Vitek 2 avec la carte « AST-XN12 ceftazidime/avibactam » et la MDB fourni par ThermoFischer.

Elle sélectionne 200 souches de *P. aeruginosa* avec une répartition large des niveaux de CMI pour ces 2 molécules avec un taux de résistance à 17% pour l'association CZA et 20% pour la C/T. Le passage des souches sur les 4 techniques est réalisé le même jour avec le même inoculum en respectant les différentes recommandations des fabricants (Solution 0,45% NaCl pour le Vitek, 0,9% pour le Sensititre).

L'évaluation de la performance de la MDB de ThermoFischer a été réalisé sur des tests répétés à distance. La MDB relève 2,5% de VME pour C/T et 2,9% pour CZA. Pour le Vitek 2 les critères CLSI ne sont pas respectés avec une VME à 12,5% pour la C/T et des taux d'AE à 89%, d'AC à 83,5%, de VME à 8,8% et de mE à 18,1% pour la CZA. Dans la discussion, les auteurs indiquent une répartition des souches proche des cut-off notamment pour la CZA. Cette répartition proche du cut-off peut constituer un biais et défavoriser les résultats de l'étude. Conscients de ce biais, les auteurs proposent d'ajuster les résultats en utilisant la méthode de limitation des taux d'erreurs développée par Humphries (39). Après réajustement, les performances du Vitek 2 apparaissent acceptables selon les critères CLSI avec des taux globaux d'AC à 93,4%, VME à 0,12% et un mE à 0,5%.

Néanmoins, les auteurs concluent que le rendu de la C/T est plus précis que la CZA sur le Vitek 2 et qu'il est préférable de vérifier les résultats sur microdilution quand le Vitek 2 rend la CZA résistante ou quand les CMI sont proches du cut-off pour les deux antimicrobiens.

L'étude de Humphries (39) compare la ceftazidime/avibactam sur le Vitek 2 avec la carte « AST-GN ceftazidime/avibactam » et la MDB. Elle intègre 1073 souches dont 207 *P. aeruginosa*. Elle est plus complète dans sa description. Ainsi, il est précisé que l'éventail des dilutions de la MDB s'étend de 0.015 et 64 µg/mL. Pour le Vitek 2 elle s'étend de ≤ 0.025 et ≥ 16 µg/mL avec une concentration d'avibactam à 4 µg/mL pour les deux méthodes. Les inoculums utilisés dans l'étude sont les mêmes utilisés pour le Vitek et la microdilution. Les 207 souches de *P. aeruginosa* étaient réparties en 161 cliniques (151 sensibles et 10 résistantes), et, 46 « challenge » (18 souches sensibles et 28 résistantes). Trois souches n'ont pas poussé dans le Vitek 2. Les auteurs décrivent 7 ME, c'est-à-dire que 7 *P. aeruginosa* ont été rendus résistants sur Vitek, sensibles avec la MDB. 5 des 7 ME étaient dans l'AE, c'est-à-dire avec une CMI différente de moins d'un log2 avec la CMI en MDB autour du cut-off de 8 µg/mL. Fort de ce constat, les auteurs proposent un ajustement en diminuant le nombre de ME à 2. En cela, ils approchent le concept de la norme 20776 qui n'intègre pas l'AC dans ces critères de performance. Au final, l'AE est de 95,7% sur 198/207 souches et l'AC de 96.6% sur 200/207 souches.

Dans l'étude de Mazzariol et al. (40), une réflexion supplémentaire est apportée en évaluant la performance du Vitek 2 selon les phénotypes de *P. aeruginosa*. Ainsi, 78 souches cliniques de *P. aeruginosa* sont divisées selon la sensibilité à l'imipénème et ceftazidime en 4 groupes d'études : groupe 1 : déficit en porine OprD, groupe 2 : gène AmpC surexprimé, groupe 3 : carbapénémase VIM-1, groupe 4 : sensible aux β-lactamines. La précision du Vitek 2 est comparée à la technique E-test en testant : la pipéracilline-tazobactam (PTZ), ceftazidime (CAZ), imipénème (IMI), méropénème (MER), aztréonam (AZM), gentamicine (GTM), ciprofloxacine (CIP).

Les AE et AC globaux sont de 87% et 83.6%. Ils sont très critiques pour la pipéracilline / tazobactam (74,3 et 80.7%) et l'aztréonam (74.3% et 60.2%), tout comme les 10.2 % de ME pour la pipéracilline / tazobactam.

Dans l'étude de Joyanes et *al.* publiée en 2001 (41), 146 *P. aeruginosa* et 25 *A. baumannii* sont testés sur la carte AST-N011 du Vitek 2 en comparaison à la MBD selon les lignes directrices du NCCLS (ancienne appellation du CLSI).

Les 146 *P. aeruginosa* ont été classés en 7 phénotypes selon leurs sensibilités aux antibiotiques et *A. baumannii* en 16 clones selon une électrophorèse sur gel de l'ADN total. Le panel d'antibiotiques est : céfépime, céfotaxime, ceftazidime, ciprofloxacine, gentamicine, imipénème, méropénème, pipéracilline, tobramycine et spécifiquement la lévofloxacine pour *P. aeruginosa*, et, l'ampicilline-sulbactam et tétracycline pour *A. baumannii*.

Concernant *P. aeruginosa*, le Vitek 2 est considéré comme fiable pour le rendu global de CMI. Néanmoins, ils ont relevé un taux VME inacceptable pour la lévofloxacine et une VME pour la gentamicine avec les souches de *P. aeruginosa* ayant des résistances à la ceftazidime et à l'imipénème. Il a été aussi observé des taux mE inacceptables pour les bactéries présentant des résistances à la ciprofloxacine toujours plus fiable que la lévofloxacine. Ces écarts sont fortement liés aux phénotypes plus résistants sans pour autant identifier le mécanisme impliqué car *P. aeruginosa* possède une diversité importante de mécanismes comme la perte de porine, l'expression de pompes d'efflux ou de β -lactamases. Pour les céphalosporines, les meilleurs résultats sont obtenus pour la ceftazidime, les autres n'étant pas couramment utilisés en clinique, ils ont considéré que l'impact clinique était faible. Les critères du CLSI ne sont pas respectés pour la céfépime (AE 89%, AC 82.9% et mE 14.4%), le céfotaxime (AC 76.7% et mE 22.6%), la gentamicine (EA 88.4%, AC 88.4% et mE 10.9%), la lévofloxacine (AE 86.3%), le méropénème (AE 85%) et la pipéracilline (AE 84.2% et ME à 3.4%). À noter des VME élevées mais acceptables à 2.7% pour la lévofloxacine et la pipéracilline.

Enfin, concernant *A. baumannii* l'étude n'a pas mis en relief des écarts entre le système Vitek 2 et la MDB sauf pour l'imipénème avec un taux de VME de 4% et de nombreuses erreurs mineures avec des CMI très proche du cut-off intermédiaire. La limitation de l'étude des phénotypes de *A. baumannii* est soulignée comme pouvant altérer la qualité des résultats pour cette bactérie. Les critères CLSI sont inacceptables pour l'ampicilline/sulbactam (AE 88%, AC 88% et mE 16%), le céfépime (AE 88%, AC 80% et mE 20%), l'imipénème (AC 88%), le méropénème (AE 88%, AC 88% et mE 12%), la pipéracilline (AC 88% et mE 12%) et la tobramycine (AE 88%, AC 88% et mE 12%).

Juretschko et *al.* (42) ont comparé de nombreuses méthodes automatiques (BD Phoenix, Walkaway, vitek, vitek 2) et manuelles (MDB, E-test, DD) avec 30 *P. aeruginosa* sur 6 antibiotiques : pipéracilline, pipéracilline/tazobactam, céfépime, ceftazidime, imipénème et aztréonam.

Ils présentent les VME, ME et mE de chacun des automates versus la MDB, notamment. Certains antibiotiques sont jugés inacceptables selon le CLSI avec une tendance du Vitek 2 à rendre de fausse sensibilité pour la ceftazidime, l'imipénème, la pipéracilline et la pipéracilline-tazobactam avec un taux VME > 3%. Sont aussi inacceptables l'aztréonam et la céfépime avec un taux mE > 10%. Enfin, il est relevé une tendance du Vitek 2 à rendre de fausses résistances pour l'aztréonam.

L'étude de Torres et *al.*, publiée en 2009 (43), teste 101 souches cliniques de *P. aeruginosa* sur la carte AST-N022 du Vitek 2 et la compare à des méthodes définies comme de référence : la diffusion en disque, l'E-test et la MBD conformément au CLSI. Nous nous focalisons à la comparaison Vitek 2 / MBD et les 6 antibiotiques rendus : pipéracilline, pipéracilline/tazobactam, aztréonam, ceftazidime, céfépime et imipénème.

Les critères du CLSI ne sont pas respectés pour l'imipénème (VME à 8,9 % et AC à 89,1%), pour la céfépime (AE à 71,3% et mE à 58,4%), pour la ceftazidime (AE 89,1% et mE à 39,6%), pour la pipéracilline/tazobactam (AE à 84,2% et ME à 11.9%), la pipéracilline (AE à 79,2%) et l'aztréonam (mE à 36,6%). Ces auteurs proposent de revoir le système expert AES pour mieux interpréter des mécanismes de résistance et associer la technique de diffusion au Vitek 2. D'après l'étude, le logiciel AES n'a pas de règle spécifique de correction pour certains phénotypes (interaction entre l'hyperproduction d'AmpC, plusieurs systèmes d'efflux et la production *d'oprD*) résistants aux β -lactamines.

Dans cette étude de 2006 menée par Sader et *al.* (44), 100 souches *P. aeruginosa* provenant de prélèvements cliniques récents sont testées sur différentes méthodes : Microscan Walkaway, Vitek, Vitek 2 avec la carte GN09, et comparées à des méthodes définies comme de référence : MBD et E-test et diffusion en disque en respectant le CLSI.

Les antibiotiques testés font partie des β -lactamines avec la pipéracilline-tazobactam, la céfépime, la ceftazidime, l'aztréonam et l'imipénème.

Dans cette étude, seuls les taux de VME, ME et mE sont disponibles, sur les critères du CLSI, des antibiotiques sont jugés comme inacceptables avec des taux supérieurs à la norme : l'aztréonam (mE à 31%), la céfépime (mE à 18%) et la pipéracilline/tazobactam (VME à 27%).

Ils ont remarqué que le Vitek avait tendance à surestimer les CMI de l'imipénème conduisant à des ME et sous-estimer les CMI de l'aztréonam et la céfépime.

L'étude de Grandesso et *al.* (45) compare les CMI de tigécycline du Vitek 2 (carte AST-N097), d'E-test et du Sensititre (plaques plates ITNF1F) pour 84 *A. baumannii* (dont 10 MDR & 74 XDR).

Les auteurs précisent dans leur matériel et méthode que le VITEK 2 et le Sensititre évaluent 6 et 7 valeurs différentes de tigécycline respectivement. Pour assurer une comparaison des 3 techniques, les résultats ont été incrémentés vers le niveau supérieur le plus proche pour comparer des dilutions identiques. Par exemple, 0.016 et 0.023 mg/L en E-test devient 0.03 mg/L. Sur les 84 souches testées, 71 sont rendues résistantes en E-test et sensibles en Sensititre. De la même façon, 27 sont rendues résistantes sur Vitek 2, sensibles sur Sensititre. En moyenne les CMI rendus est de 0,25mg/L pour le Vitek 2, 0,50mg/L pour le Sensititre et 13,9mg/L pour l'E-test. Le Vitek 2 et encore plus l'E-test surestiment la CMI. C'est pourquoi les auteurs insistent sur la nécessité de vérifier les résultats obtenus avec ces 2 méthodes par une technique en microdilution.

Dans une étude de 2012 menée par Sapino et *al.* (46) 4 méthodes, 2 automatiques (VITEK 2 et Sensititre) et 2 manuelles (Kirby-Bauer et E-test), sont comparées. 77 souches cliniques de *P. aeruginosa* prises au hasard dans l'activité de routine du laboratoire entre octobre 2008 et juillet 2009 ont été testées. Les auteurs se sont concentrés sur les β -lactamines qu'ils savent problématiques pour les méthodes automatisées : Aztréonam, Pipéracilline-tazobactam, imipénème, méropénème, ceftazidime. En prenant la méthode E-test comme méthode de référence, ils comparent les techniques en utilisant les notions de valeurs moyennes et de coefficients de corrélation. Ainsi, ils observent des valeurs moyennes respectivement de 89% pour la méthode Kirby-Bauer, 87.0% pour le Sensititre et de 82.8% pour le Vitek 2, et, une bonne corrélation pour 4 antibiotiques que sont l'aztréonam, la pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime et le méropénème.

Ces mêmes auteurs présentent aussi les comparaisons avec les outils préconisés par le CLSI, avec néanmoins toujours l'E-test comme référence. Les 5 antibiotiques sont retrouvés inacceptables avec une ou plusieurs méthodes. L'aztréonam sur le Vitek 2 avec 20,8% de mE. La ceftazidime sur le kirby-bauer avec 18,2% mE et 3,9% ME sur le Sensititre et 11,7% mE sur le Vitek 2. L'imipénème et le kirby-bauer (20,8% mE), Sensititre (22,1% mE), Vitek 2 (29,9% mE) ; le méropénème et le Vitek 2 (7,8% VME), Sensititre (5,2% VME) ; pipéracilline-tazobactam et Vitek 2 (9,1% VME), Sensititre (5,2% VME).

Cette récente étude de 2021 menée par Sacco *et al.* (47) s'applique à tester la colistine sur 51 souches d'*A. baumannii* provenant de 32 patients, toutes sélectionnées pour leurs multirésistances. Cela pose un biais de sélection car nous ne savons pas s'il s'agit de souches différentes. La colistine est testée sur plusieurs méthodes : le Vitek 2, l'E-test et comparé à la MBD conforme au CLSI. Le Vitek 2 a rendu 6 souches résistantes à la colistine et l'E-test 12. La MBD a testé 12 *A. baumannii* comme résistants, dont 9 sont communs à l'E-test et 6 au Vitek 2. Le Vitek se retrouve donc à sous-estimer les CMI de la colistine ; 6 VME soit 11,8%. L'hétérorésistance de cette bactérie semble poser problème pour le Vitek 2 et l'E-test.

Les auteurs réaffirment l'inadaptation à rendre la colistine sur des méthodes de diffusion à cause de la mauvaise diffusion de la colistine, le gradient de concentration n'est pas fiable.

Dans cette étude menée par Kulah *et al.* en 2009 (48), 112 *A. baumannii* sont testés à l'imipénème, 78% (87/112) des souches sont résistantes.

Les souches sont passées sur différentes techniques : diffusion en disque, E-test, BD phoenix, Walkaway, Vitek 2 et comparées à la MDB provenant d'une préparation conforme au CLSI. Les résultats du Vitek 2 sont bons avec des critères CLSI respectés sans VME, sans ME mais 7,2% de mE (<10% selon le CLSI).

Le Vitek 2 est décrit comme fiable pour le rendu de l'imipénème pour *A. baumannii*.

Dans un second temps, les auteurs ont interchangé les inoculums des automates pour étudier s'il y avait un impact sur les résultats en modifiant l'inoculum, aucune modification ou amélioration n'a été observée.

Cette étude de Fadana *et al.* en 2010 (49), compare 410 souches d'*A. baumannii* sur Vitek 2 et MDB. 73 souches n'ont pas pu être incluses dans les calculs puisqu'il est possible que ces dernières n'ont

pas donné de résultats sur Vitek 2 (défaut de pousse). Au total, c'est 337 *A. baumannii* dont 20 sont résistants à la colistine. Les résultats de l'étude sont un AC à 89% (300/337), un AE à 56% (190/330), VME à 55% (11/20) et ME à 8% (26/317). Ces résultats ne sont pas acceptables selon les critères CLSI. Les auteurs concluent qu'il n'est pas possible de rendre la colistine de manière fiable sur le Vitek 2.

Cette étude récente de 2021 menée par Yin et al. (50) s'intéresse au rendu de la tigécycline pour *A. baumannii* sur différentes techniques : Vitek 2, E-test, diffusion en disque en les comparant à la MDB. 346 souches résistantes aux carbapénèmes sont étudiées mais n'ayant pas de cut-off, les auteurs ont utilisé les cut-off des entérobactéries de la FDA ($S \leq 12$ mm et $R \geq 16$ mm) afin de pouvoir obtenir des résultats. Le Vitek 2 obtient un AC de 54,3%, un mE à 43,9% et une ME à 1,9%. Selon le CLSI le Vitek 2 ne semble pas fiable pour le rendu de la tigécycline pour *A. baumannii*.

Une étude récente de Wattal et al. publiée en 2019 (51), s'intéresse à la colistine sur Vitek 2 et E-test afin de les comparer à la MDB conforme à la norme ISO 20776-1 selon les auteurs. Ils ont étudié 52 *P. aeruginosa* (73% sensible) et 42 *A. baumannii* (100% sensible). Selon les critères du CLSI, la colistine ne peut pas être rendue par le Vitek 2 pour *P. aeruginosa* (AE à 79% et ME à 10,5%) et pour *A. baumannii* (AE à 26,2%).

L'étude de Singhal publiée en 2018 (52), compare 42 souches d'*A. baumannii* pour la colistine (100% sensible). Elle compare la MDB sur support en verre, la MDB sur support en polystyrène, l'E-test, le Vitek et la diffusion en disque. Les techniques E-test, Vitek 2 présentent 100% AC en prenant la MBD sur verre comme référence mais les AE sont inacceptables selon le CLSI (<90%).

Les plaques MBD sur polystyrène présentent un AC à 92,8% avec 3 souches retrouvées résistantes (CMI à 4mg/mL). Les auteurs confirment l'inquiétude d'une interaction entre la colistine et le polystyrène due à la structure du médicament qui adhère aux parois des cupules en polystyrène. Celui-ci peut fausser les résultats d'une CMI de la colistine en MBD.

X/ Analyse des articles majeurs

Commençons notre discussion sur l'antibiogramme de *P. aeruginosa* en Vitek 2. Biomérieux affiche des résultats globalement acceptables selon les critères du CLSI et de la FDA. Néanmoins, les performances des entérobactéries se mêlent à celles de *P. aeruginosa*. Cependant, à la lecture de la bibliographie, certains antibiotiques semblent problématiques de façon récurrente. Dans un souci de synthèse pour la suite de notre analyse, les AE, AC, VME, ME et mE publiés dans la majorité des études rapportées ci-dessus ont été compulsés sous forme de tableaux en annexes 3 et 4.

A) *P. aeruginosa* & Vitek 2

Nous allons ainsi analyser un à un les antibiotiques.

La **pipéracilline** ne respecte pas l'AC recommandé (> 90%) avec une valeur de 88.5% dans la fiche fournisseur et dans la plupart des publications (28-30). Biomérieux nuance cette donnée par un AE à 93.9%. Néanmoins, là encore, elle n'est pas corroborée dans plusieurs publications : 84.2% (41) et 79.2% (43). Ces auteurs ont différencié des groupes de phénotypes. Ils ont remarqué que les meilleurs résultats étaient observés sur les souches sensibles. Torres et *al.* (30) précisent à juste titre dans leur matériel et méthode que l'AES n'a pas de règle spécifique de correction pour certains phénotypes (interaction entre l'hyperproduction d'AmpC, plusieurs systèmes d'efflux et la production d'*oprD*) résistants aux β -lactamines. Notons de notre côté que le logiciel AES a été mis à jour notamment en 2012 (25). Enfin, cette molécule étant peu prescrite dans le traitement des infections pyocyaniques, ces différents constats sont globalement associés à un faible impact clinique.

L'association **pipéracilline/tazobactam** semble poser un problème (37) (32-34) (44). Ces premières études relèvent un point problématique avec des taux très importants de VME. Les auteurs (40) (41) constatent une différence significative favorable sur les souches sensibles. Cette analyse est à pondérer puisque ces publications assez anciennes ont été réalisées avant la mise à jour du logiciel AES en 2012. Biomérieux annonce des taux d'AE et d'AC acceptables selon le CLSI. Mais une précision est inscrite dans la fiche fournisseur actualisée de 2018, qui spécifie « d'utiliser une méthode de test alternative avant de rapporter les résultats lorsqu'un résultat

résistant est obtenu avec les association(s) antibiotique/germe suivante(s) : pipéracilline/Tazobactam (tzp03n) : *Pseudomonas aeruginosa* » (24). Ceci signifie qu'il y a un risque de rendre une fausse résistance. Une étude récente de 2017 (37) présente de bons résultats finaux sans VME (0%) et un faible pourcentage de ME (4,3%) pour la pipéracilline/tazobactam. De notre point de vue, les auteurs ont créé un biais en réalisant des repassages en cas de mauvais résultats. Il n'y a pas de détails sur les résultats initiaux. Les auteurs ne justifient pas leur repassage par la préconisation inscrite dans la fiche fournisseur. Enfin, les auteurs déclarent dans cette étude un conflit d'intérêt avec un financement par Biomérieux.

Si on se focalise maintenant sur les céphalosporines, la **ceftazidime** semble fiable dans l'étude de Bobenchik et *al.* (37). Les chiffres d'AE et d'AC coïncident avec ceux de Biomérieux et sont conformes aux critères du CLSI. Néanmoins, pour le reste des études nous retrouvons des taux inférieurs aux critères CLSI soit pour l'AE (43), soit pour l'AC (40). La plupart de ces études sont anciennes et ont été publiées avant la mise à jour du logiciel AES de 2012.

Le manque d'articles sur les dernières années nous empêche d'apprécier la performance actuelle du Vitek 2 pour cette molécule.

La **céfépime** présente les plus mauvais résultats dans les céphalosporines. À travers les études, aucune n'a accepté la céfépime selon les critères du CLSI : AC à 89% (37), mE à 13,3% (42), AE à 71,3% (43), mE à 18% (44). Nous sommes surpris de cette discordance entre les publications et les données fournisseurs. Biomérieux affiche des résultats acceptables. Cependant, une lecture scrupuleuse de la fiche fournisseur fait apparaître un pourcentage de 9% de VME sur des entérobactéries et *P. aeruginosa*.

La molécule **ceftazidime/avibactam** a été évaluée dans des études (38)(39)(53), qui nous ont paru solides compte tenu de la méthode parfaitement détaillée et adaptée et du nombre conséquent de souches testées. Les taux AE, AC sont respectés (39)(53) ainsi que les taux de ME (réajusté (39) (38)). Il paraît quand même préférable de vérifier la CMI en cas de résistance rendu par le Vitek 2.

Le rendu **ceftolozane/tazobactam** paraît plus précis aux travers de plusieurs études (38)(39)(53). Le Vitek 2 semble fiable pour rendre la CMI de cette association céphalosporine/inhibiteur de β -lactamase.

Concernant le **méropénème/vaborbactam**, nous n'avons trouvé qu'une étude (54) traitant de cette association. Elle n'est pas listée dans le chapitre précédent. Simplement elle porte sur 77 souches de *P. aeruginosa*. L'antimicrobien respecte les critères CLSI avec uniquement un taux limite de 3% d'ME, ce qui reste acceptable. Cela nous laisse penser que le Vitek 2 est précis pour rentre cette association.

Pour l'**aztréonam**, les résultats de biomérieux respectent les critères CLSI. Cependant au travers de la bibliographie, les études présentent un taux d'mE supérieur à 10% : 30,7% (40), 28,3% (42), 31% (44) et 20,8% (46). Néanmoins trois des études (40,42,44) constatent une surestimation de la CMI par le Vitek 2 produisant une fausse résistance. Le Vitek 2 ne semble pas adapté à rendre l'aztréonam de façon fiable mais cela n'a pas un gros impact clinique puisque cet antibiotique est peu utilisé dans les services hospitaliers.

L'**imipénème** et le **méropénème**, ne semblent pas poser problème au Vitek 2 néanmoins, nous retrouvons de mauvais résultats dans 2 études : (40) (41). Dans ces articles, les auteurs étudient l'impact du phénotype sur la fiabilité des résultats. Dans la première étude (40) l'AE moyen est de 88,4% pour l'imipénème et de 83,3% pour le méropénème, dans les deux cas l'AE est impacté par les mauvais résultats du groupe 1 dont le phénotype « Efflux MexAB OprM surexprimé / OprD déficient » a été vérifié par WesternBlot avec des anticorps anti-Mex, électrophorèse des protéines pour le déficit en porine D. À noter que le groupe 3 porteur de carbapénémase confirmé par PCR blaVIM et blaIMP a un AE de 100% pour les deux molécules. La cause de la résistance a l'air importante pour connaître la fiabilité du Vitek 2.

Dans la seconde étude Joyanes (41), l'AE est de 87% pour l'imipénème et de 85% pour le méropénème, encore une fois les auteurs se questionnent sur l'impact du phénotype et ont calculé les résultats pour les 5 groupes différents. Les plus mauvais résultats sont trouvés pour les groupes 4 et 5, résistant à la CIP avec un AE de 80,8% pour le premier groupe et résistant à la CAZ et IMI un AE de 80,9% pour l'autre groupe. À noter que la détermination du phénotype s'est faite par des « tests phénotypiques conventionnels » sans en préciser plus. Nous retrouvons pour le groupe 4 (R. CIP) un AE de 88,5% pour l'IMI et le MER, pour le groupe 5 (R. IMI/MER) un AE de 90,5% pour l'IMI et un AE de 76,2% pour le MER.

Nous pouvons aussi citer Sader et al. (44) qui présente un AE de 64% pour l'IMI mais ce dernier a volontairement sélectionné des souches de *P. aeruginosa* dont les CMI sont proches des cut-

off, créant une difficulté supplémentaire afin de tester les limites de l'automate. Cela n'est pas représentatif de l'activité de routine.

Au final, les mauvais résultats sont pour la plupart dûs à un biais de sélection avec des proportions de phénotypes résistants non représentatifs de la réalité ou des souches dont le cut-off est ambigu.

Concernant les aminosides (**amikacine, gentamicine, tobramycine**), les résultats de biomérieux semblent similaires aux études de Bobenchik, Mazzariol et Joyanes (37,40,41). Néanmoins nous retrouvons certaines subtilités concernant la gentamicine qui présente régulièrement des mauvais résultats AC (%), selon le CA-SFM il est nécessaire de se référer aux données épidémiologiques « EPI ». Cela ne permet pas d'avoir un cut-off de référence pour cette molécule. Il est donc difficile de juger des valeurs : mE, ME, VME et AC qui reposent sur les cut-off. Pour ce qui concerne l'AE, elle apprécie la précision de la dilution et les résultats sont assez bons et constants pour la gentamicine sauf dans l'étude de Joyanes qui retrouve pour le groupe sauvage un AE à 83,3% et dans le groupe 3 résistant à la ciprofloxacine, un AE à 84,6% pour la gentamicine et un AE à 88,5% pour la tobramycine (seul mauvais résultat pour la tobramycine). L'imperméabilité/perde de porine responsable de la résistance isolée à la CIP semble encore poser problème au Vitek 2.

Les Fluoroquinolones (**ciprofloxacine, lévofloxacine**) ont de bons résultats dans les études et chez Biomérieux avec un AE et AC proches des 100%. Il ressort quand même dans les études de meilleurs résultats pour la ciprofloxacine que la lévofloxacine avec une étude dans laquelle l'AE n'est pas respecté, il s'agit de l'étude de Joyanes (41). En effet, dans l'étude de Joyanes, la lévofloxacine obtient un AE de 86,3%. Cette moyenne est abaissée par le groupe 2 résistant à la CAZ (AE = 84,2%) et le groupe 4 résistant à la CIP (AE = 88,5%, AC = 76,9% et mE = 23,1%).

En revanche, l'étude Mazzariol (40) retrouve pour la ciprofloxacine un AC global acceptable sauf pour le groupe sensible à l'IMI et la CAZ avec un AC à 88,2%

Au final, les résultats sont globalement très bons avec des exceptions pour certains phénotypes mais ils ne sont pas constants dans les études qui différenciant les phénotypes puisque les résultats inacceptables sont liés à des phénotypes différents.

Il ressort encore que le phénotype peut avoir un impact sur la fiabilité des résultats.

B) *A. baumannii* & Vitek 2

Concernant *A. baumannii* et le Vitek 2, bien que cette espèce fasse partie de la liste des « Germes à Gram négatif préconisés pour AST-GN » dans la brochure AST-N240 et AST-XN12, seule la colistine présente des résultats pour *A. baumannii*. Des études se sont penchées aux performances du Vitek 2 sur les autres antibiotiques d'intérêt.

Sur les 158 articles recensés pour *A. baumannii*, la majorité traite de l'identification du germe par le Vitek 2. Les études restantes qui concernent la susceptibilité s'intéressent surtout à la colistine et seulement deux études explorent le rendu du Vitek 2 sur le reste du panel d'antibiotiques recommandés par le CA-SFM.

Commençons donc par la **colistine**, Biomérieux affiche un AE à 96,3%, un AC à 97,8% mais un taux de VME à 4,7% inacceptable selon les critères CLSI. Deux publications retrouvent respectivement une VME à 55% et 50% ce qui montre une tendance à rendre des fausses sensibilités (47,49). L'équipe de Sacco (47) tente de donner une explication ; le Vitek se base sur la cinétique de croissance de la bactérie et la colistine pose un problème puisqu'elle ralentirait la croissance d'*A. baumannii*. À 4h de pousse la souche d'*A. baumannii* n'est pas toujours détectable ce qui veut dire que la durée d'incubation devient limitante et empêche la standardisation par le système AES pour rendre une CMI de la colistine fiable. Le différentiel des pourcentages de VME entre les publications (~50%) versus les données Biomérieux (~5%) s'explique par la sélection des souches testées ; d'un côté une dizaine de souches d'*A. baumannii* résistantes à la colistine, de l'autre une collection de souches d'entérobactéries, de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii* sans autre précision de la répartition de chaque genre. De même, l'AE n'est pas respecté avec 56% dans l'étude de Fadana et al. (49) et 26,2% dans l'étude de Wattal et al. (51). L'explication de ces données versus celles de Biomérieux peut être analysées de la même façon que pour la VME.

Nous n'avons trouvé qu'une étude faisant part de la **pipéracilline** (41). Cette dernière produit bien un AE à 96% mais est en défaut sur l'AC (88%) et le taux de mE (12%) selon les critères du CLSI (> 90% et <10%). Sachant que cette étude date de 2001, le système AES a subi plusieurs mises à jour depuis mais aucune étude récente ne fait part de résultat pour cette molécule.

Concernant la **pipéracilline/tazobactam**, l'étude de Bobenchik et *al.* (37) retrouve un AE à 100% mais un AC (88,5%) et un taux de mE (11,5%) en défaut selon les critères du CLSI. Cette dernière est assez récente (2017), le logiciel AES ne semble pas encore capable d'interpréter la catégorisation de façon fiable pour cette association antibiotique.

Il existe 3 études qui comparent le Vitek 2 à la microdilution pour la **tigécycline** et des souches d'*A. baumannii* (41,45,50). Le rendu de cette molécule est très hétérogène selon l'étude. La première (41) retrouve un AC et un AE à 100%. La 2^{ème} (45) recommande une vérification de la CMI. Quant au 3^{ème} travail (49), les auteurs déconseillent le rendu de la tigécycline sur Vitek pour *A. baumannii*.

Seules les études de Bobenchik et *al.* (37) et de Joyanes et *al.* (41) s'intéressent au reste des antibiotiques recommandés par le CA-SFM. Nous avons choisi de regrouper les antibiotiques selon l'acceptabilité des critères CLSI et de la date de publication des articles. Chronologiquement l'étude de Joyanes (41) a été publiée en 2001 avant l'étude de Bobenchik (37) en 2017. Le système AES a subi des mises à jour entre 2001 et 2017, il se peut que ces mises à jour aient influencé les performances du Vitek 2.

Pour les **C3G (ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime)**, les taux d'AE sont bons pour les 3 antibiotiques sur les 2 études. Néanmoins, la catégorisation semble poser un problème dans l'étude la plus récente (37) avec des taux d'AC inacceptables tandis que l'étude la plus ancienne (41) retrouve des taux de catégorisation acceptables.

Pour l'**imipénème** et le **méropénème**, l'étude la plus ancienne (41), n'accepte pas le Vitek 2 comme un automate fiable avec des AC $\leq 90\%$ et un AE inacceptable pour l'imipénème. Dans l'étude plus récente (37) les taux sont proches des 100% et ce qui laisse penser que le système AES a évolué entre temps et est devenu plus performance pour les carbapénèmes.

La **tobramycine** présente des résultats mitigés avec des taux inacceptables selon les critères du CLSI dans les deux études (37,41). Le Vitek 2 ne semble pas fiable pour rendre cet aminoside.

Pour la **céfépime**, les deux études produisent des taux de catégorisation inacceptables selon les critères du CLSI. L'étude la plus récente (37) produit un AE à 100% à contrario de l'étude ancienne (41) ce qui laisse penser à une amélioration du système AES mais ne permet pas de considérer le rendu comme fiable.

Concernant les fluoroquinolones (**lévofloxacin**e, **ciprofloxacine**), **sulfaméthoxazole-triméthoprime**, **gentamicine**, ces antibiotiques sont acceptés selon les études (37,41) et ont de meilleurs résultats que la colistine sur le Vitek 2. Le rendu apparaît possible pour le Vitek 2 pourtant *A. baumannii* n'est pas pris en compte dans les résultats de biomérieux pour ces antibiotiques.

Au total, la plupart des données trouvées pour *A. baumannii* sont limitées à deux études (37, 41) avec un échantillonnage restreint (26 souches dans chaque étude). Fort de ce recrutement limité en souches testées, il se dégage une impression d'avoir des résultats assez précis avec des AE proches des 100%. Cependant les taux de catégorisation (AC, VME, ME, mE) ne répondent pas aux critères CLSI. La 1^{ère} hypothèse pour expliquer cette discordance est que les souches testées étaient proches des cut-off. Une 2^{ème} hypothèse cette fois-ci assez contre-intuitive serait que le logiciel AES peine encore à catégoriser correctement les données brutes (les valeurs de CMI) obtenues avec les souches d'*A. baumannii*.

C) Sensititre

Concernant le Sensititre, il paraît, en théorie, idéal pour rendre une CMI en milieu liquide puisqu'il automatise la norme ISO 20776-1 à quelques détails près. D'ailleurs toutes les publications sauf une (46) prennent le Sensititre comme technique de référence, et basent leurs calculs de performance selon les résultats du Sensititre.

En pratique, le Sensititre est déjà déployé dans de nombreux CNR : staphylocoques, streptocoques, entérobactéries et BNF.

Les limites du Sensititre ne sont pas liées à sa performance théorique mais semblent plus relever de son application pratique.

À titre d'information, lors d'un appel téléphonique, le CNR de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*, reconnaît le Sensititre comme technique de référence mais ne le déploie pas en 1^{er} intention car certaines plaques sont compliquées à lire. L'EUCAST répond à cette difficulté en codifiant la lecture des résultats (55), ceci dans un souci d'harmonisation de la lecture des plaques. À noter que cette difficulté n'est relevée dans aucun article.

La lisibilité des plaques demande une formation approfondie et un temps technique des équipes qui travailleront dessus.

Le temps technique est aussi à prendre en compte puisque qu'il faut ensemer les 96 puits soit manuellement de façon unitaire, soit à l'aide d'une pipette multicanaux, qui peut alléger ce travail laborieux. Cette étape manuelle expose à des erreurs humaines (puits non ensemençé, contamination ...).

Le fournisseur propose une étape de semi-automatisation avec 2 automates. L'automate Sensititre AIM (Annexe 4) pour répartir l'inoculum sur la plaque, et le VIZION (Annexe 5) pour intégrer la lecture manuelle. Là encore, le fabricant ThermoFischer essaye d'apporter une solution à ce problème avec un automate complet l'ARIS (Figure 4A) qui permet d'incuber, de « lire et d'enregistrer avec précision et efficacité les mesures de concentration minimale inhibitrice (CMI) » (56).

L'équipe de Singhal (52) étudie une limite de la MDB pour la colistine qui interagit avec le polystyrène des plaques, ce qui conduit à une diminution de la performance de la MDB. A ce jour ThermoFischer propose uniquement des plaques de MDB en polystyrène ce qui ne permet pas une performance optimale pour cette molécule.

Outre les coûts des automates que nous n'aborderons pas ici, il faut aussi compter le coût des réactifs (cartes Vitek ou plaques Sensititre). Le coût non négocié d'une plaque Sensititre est d'environ 16€. A titre comparatif au CHV l'antibiogramme actuellement réalisé en diffusion sur milieu gélosé coute environ entre 2 et 3€, les cartes Vitek approximativement entre 5 et 10€. La viabilité financière du Sensititre paraît compliquée pour des laboratoires spécialisés avec un gros volume d'activité. À contrario, pour les laboratoires de ville, l'intérêt est discutable puisqu'ils sont confrontés à moins de phénotypes multirésistants.

XI/ Conclusion

Au regard des préconisations du CA-SFM, le laboratoire du CHV souhaite déployer l'antibiogramme en milieu liquide sur des genres bactériens supplémentaires, notamment les BNF.

Le choix se porte sur la technique Vitek, déjà disponible au laboratoire, versus, la technique Sensititre. Pour les BNF, Biomérieux commercialise la carte d'antibiogramme N240, Thermo-Fisher la plaque FRAM2GN. Le CA-SFM préconise une liste de première intention d'antibiotiques à tester pour chaque genre bactérien. La carte d'antibiogramme N240 répond de façon plus complète que la plaque Sensititre aux recommandations aussi bien pour *Pseudomonas* spp que pour *Acinetobacter* spp, répondant en cela plus à la demande des antibiotiques dans un cadre de routine. À l'inverse la technique Sensititre avec la plaque EUMDROXF répond mieux à la liste complémentaire.

Le CA-SFM fait référence à la norme ISO 20776, pour la bonne réalisation des CMI de quasiment tous les antibiotiques. Cette norme comporte deux parties. La partie 1 « Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses » déploie le mode opératoire. La partie 2 « Évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes » présente les critères pour comparer les réactifs commercialisés à la technique de référence. Le préalable était donc de décortiquer cette norme, pour ensuite apprécier en quoi le Vitek et le Sensititre se rapprochent des préconisations du référentiel. Il est clair que la technique Sensititre est très proche de la norme, autant pour la réalisation proprement dite, que pour le nombre de valeurs testées.

Notre démarche s'est poursuivie par une lecture détaillée de la bibliographie sur ce domaine, qui porte principalement *de facto* sur la technique Vitek. La lecture en a été ardue : complexité des résultats, parfois obtention de résultats contradictoires, existence de biais. Nous avons fait le choix de les présenter successivement pour ensuite essayer de synthétiser les résultats par antibiotique.

Il en ressort plusieurs constats, plus complexes pour *P. aeruginosa* que pour *A. baumannii*. Commençons par le plus simple, avec *A. baumannii*. Sur un panel de 15 antibiotiques évalués, 4 apparaissent fiables sur Vitek : la gentamicine, le sulfaméthoxazole-triméthoprine, la ciprofloxacine et la lévofloxacine.

Ensuite pour *P. aeruginosa*, une majorité des antibiotiques étudiés donnent des résultats tout à fait acceptables sur Vitek, en se limitant à des souches sensibles. Les antibiotiques concernés

sont la ceftazidime, le ceftolozane/tazobactam, l'imipénème, le méropénème/vaborbactam, l'amikacine, la tobramycine, la ciprofloxacine et la lévofloxacine.

Au total, il apparaît que la performance globale du Vitek est bonne néanmoins, il persiste une difficulté pour le système AES à catégoriser la susceptibilité des BNF probablement en raison de leurs diversités de mécanisme de résistance.

Les études qui ont travaillé à l'impact des phénotypes sur la performance laissent apparaître que les mécanismes d'antibiorésistance de type imperméabilité, perte de porine sont moins bien intégrés au système AES que les résistances enzymatiques.

Après ce travail analytique, je souhaite finir en présentant mes convictions plus personnelles.

Le Vitek 2 est un automate simple à prendre en main, demandant peu de temps technique. Bien qu'il apparaisse moins performant que la MDB classique, sa technologie ancienne n'en reste pas moins novatrice. Son logiciel AES lui permet d'évoluer en intégrant de nouvelles données afin d'améliorer le rendu des phénotypes et des CMI.

Une validation biologique vigilante doit être appliquée sur les susceptibilités de certaines β -lactamines (pipéracilline, céfépime et ceftazidime/avibactam) et pour les phénotypes multirésistants.

En terme d'activité, il peut répondre à un gros volume avec une bonne performance pour les souches sensibles. Il est l'outil adapté pour des laboratoires de villes, ou des hôpitaux si l'épidémiologie est majoritairement représentée par des souches sensibles.

Le Sensititre quant à lui représente la meilleure technique d'automatisation de la MDB. Pourtant en pratique il révèle quelques limites. Le risque d'erreurs humaines et le temps technique sont à considérer en l'absence d'automatisation proposée par ThermoFischer.

La lecture de ces résultats est codifiée par l'EUCAST et nécessite une formation supplémentaire des équipes qui seront amenées à travailler dessus.

La plaque de MDB est environ trois fois plus chère que la cassette Vitek 2, ce qui n'est pas possible pour tous les laboratoires. Le Sensititre semble donc adapté aux structures spécialisées comme les CNR ou à des hôpitaux avec des services à risque (réanimation, infectiologie...)

Finalement, si le laboratoire dispose des 2 automates il pourrait être judicieux de les associer de façon complémentaire.

Pour *P. aeruginosa*, utilisé en première ligne, le Vitek 2 pour le rendu de la majorité des antibiogrammes et pour les cas les plus compliqués d'utiliser le Sensititre (infectiologie, réanimation, souches multirésistantes).

Pour *A. baumannii*, le Vitek 2 semble encore manquer de standardisation pour assurer son rendu. Étant souvent multirésistant le Sensititre semble être adapté pour rendre avec précision des CMI.

Annexes

Annexe 1 : Réalisation des solutions mères des antimicrobiens

Antimicrobien	Solvant	Diluant
Amikacine	Eau	Eau
Avibactam	Eau	Eau
Aztréonam	Solution saturée en bicarbonate de sodium	Eau
Céfazoline	Tampon phosphate 0.1 mol/L, pH 6.0	Tampon phosphate 0.1 mol/L, pH 6.0
Céfépime	Tampon phosphate 0.1 mol/L, pH 6.0	Tampon phosphate 0.1 mol/L, pH 6.0
Céfidérol	Solution saline	Eau
Céfotaxime	Eau	Eau
Céfoxitine	Eau	Eau
Ceftazidime	Solution saturée en bicarbonate de sodium	Eau
Ceftozolane	Eau ou solution saline	Eau ou solution saline
Ceftriaxone	Eau	Eau
Ciprofloxacine	Eau	Eau
Colistine	Eau	Eau
Doxycycline	Eau	Eau
Fosfomycine	Eau	Eau
Gentamicine	Eau	Eau
Imipénème	Tampon phosphate 0.1 mol/L, pH 7.2	Tampon phosphate 0.1 mol/L, pH 7.2
Lévofloxacine	1/2 volume d'eau, volume minimal 1 mol/L de NaOH pour la dissolution, puis reconstituer le volume total avec de l'eau	Eau
Méropénème	Eau	Eau
Nétilmicine	Eau	Eau
Pipéracilline	Eau	Eau
Rélébactam	Eau	Eau
Sulfaméthoxazole	1/2 volume d'eau, volume minimal 2.5 mol/L de NaOH pour la dissolution, puis reconstituer le volume total avec de l'eau	Eau
Tazobactam	Eau	Eau
Tétracycline	Eau	Eau
Ticarilline	Tampon phosphate 0.1 mol/L, pH 6.0	Tampon phosphate 0.1 mol/L, pH 6.0
Tigécycline	Eau	Eau
Tobramycine	Eau	Eau
Triméthoprim	Eau	Eau
Vaborbactam	DMSO	Eau

**Annexe 2 : Taux des β -lactamines dans des articles majeurs sur
P. aeruginosa et le Vitek 2**

	Taux	Joyanes	Juretschko	Sader	Mazzariol	Torres	Sapino	Bobenchik	Biomérieux
Année		2001	2006	2006	2008	2009	2012	2017	2018-2019
Pipéracilline	AE (%)					79,2			93,9
	AC (%)					99			88,5
	VME (%)		5			0			4,3
	ME (%)		0			1			0
	mE (%)		NA			NA			3,9
Pipéracilline/ Tazobactam	AE (%)				74,3	84,2		98,9	96,2
	AC (%)				80,7	98		96,7	94,8
	VME (%)		21,7	27	10,2	0	9,1	0	1,2
	ME (%)		1,7	0	0	11,9	0	4,3	1,5
	mE (%)		NA		8,9	NA	NA	0	3,8
Ceftadizime	AE (%)				93,5	89,1		100	96,7
	AC (%)				83,3	95		91,2	97,9
	VME (%)		3,3	1	0	1	1,3	0	3
	ME (%)		0	1	0	0	1,3	0	1
	mE (%)		23,3	9	16,6	39,6	11,7	8,8	4,5
Céfépime	AE (%)					71,3		100	97
	AC (%)					94		89	93,9
	VME (%)		0	0		1		0	9
	ME (%)		0	1		0		0	2,6
	mE (%)		13,3	18		58,4		11	2,4
Imipénème	AE (%)	87			88,4	92,1		100	95,8
	AC (%)	91			88,4	89,1		96,7	92,2
	VME (%)	1,4	6,7	1	0	8,9	0	0	1
	ME (%)	0	0	2	1,3	0	0	0	0,4
	mE (%)	6,8	25	8	10,2	9,9	29,9	3,3	7,3
Méropénème	AE (%)	85			83,3			100	97,6
	AC (%)	90,4			88,4			97,8	95,9
	VME (%)	0			3,8		7,8	0	0,5
	ME (%)	0			0		0	0	0
	mE (%)	9,6			7,6		2,6	2,2	3,9
Aztréonam	AE (%)				74,3	97			98,1
	AC (%)				60,2	91,1			97,4
	VME (%)		1,7	0	0	0			0
	ME (%)		0	1	8,9	0			0,9
	mE (%)		28,3	31	30,7	36,6			1,9

Annexe 3 : Résumé des taux d'autres antibiotiques dans les articles
sur *P. aeruginosa* et le Vitek 2

	Taux	Mazzariol	Bobenchik	Biomérieux
Année		2008	2017	2018-2019
Amikacine	AE (%)		100	98,5
	AC (%)		100	96,7
	VME (%)		0	0
	ME (%)		0	0
	mE (%)		0	3,3
Gentamicine	AE (%)	97,4	98,9	98,3
	AC (%)	87,1	86,8	96,8
	VME (%)	0	0	0
	ME (%)	0	0	0
	mE (%)	12,8	13,2	3,2
Tobramycine	AE (%)		100	98,9
	AC (%)		98,9	94,7
	VME (%)		0	0
	ME (%)		0	0,8
	mE (%)		1,1	4,6
Ciprofloxacin	AE (%)	97,4	100	98,1
	AC (%)	96,1	96,7	95,3
	VME (%)	0	0	0
	ME (%)	1,3	0	0,3
	mE (%)	2,5	3,3	4,5
Lévoﬂoxacin	AE (%)		100	99,4
	AC (%)		96,7	96,7
	VME (%)		0	0
	ME (%)		0	0,7
	mE (%)		3,3	2,9

Annexe 4 : Automate Sensititre AIM



Annexe 5 : Automate Sensititre Vizion



Bibliographie

1. Résistance aux antibiotiques · Inserm, La science pour la santé [Internet]. [cité 24 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/>
2. Masson E. EM-Consulte. [cité 4 janv 2023]. Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/757794/article/phenotypes-de-resistance-aux-antibiotiques-de-c-c->
3. Masson E. EM-Consulte. [cité 25 janv 2023]. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/706281/article/-et-resistance-aux-antibiotiques-un-modele-dadapt>
4. 14:00-17:00. ISO. [cité 31 déc 2022]. ISO 20776-1:2019. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/standard/70464.html>
5. BACTERIE_Pseudomonas.pdf [Internet]. [cité 26 déc 2022]. Disponible sur: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE_Pseudomonas.pdf
6. Infections à Pseudomonas - Infections - Manuels MSD pour le grand public [Internet]. [cité 15 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-bact%C3%A9riennes-bact%C3%A9ries-gram-n%C3%A9gatives/infections-%C3%A0-pseudomonas>
7. E. pilly. PILLY Etudiant P332-335 [Internet]. [cité 7 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.infectiologie.com/fr/pilly-etudiant-2021-uniquement-en-ligne-pilly-etudiant-2023-disponible-a-la-vente-et-en-ligne.html>
8. FRENEY Jean , RENAUD François. Eska. [cité 7 juin 2023]. Précis de Bactériologie Clinique - 3e édition P1259-1283. Disponible sur: <https://eska-publishing.com/fr/medecine/1132901-precis-de-bacteriologie-clinique-3e-edition-9782747228060.html>
9. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):177-92.
10. BACTERIE_Acinetobacter.pdf [Internet]. [cité 15 déc 2022]. Disponible sur: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE_Acinetobacter.pdf
11. FRENEY Jean , RENAUD François. Eska. [cité 7 juin 2023]. Précis de Bactériologie Clinique - 3e édition P1239-1256. Disponible sur: <https://eska-publishing.com/fr/medecine/1132901-precis-de-bacteriologie-clinique-3e-edition-9782747228060.html>

12. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev. janv 2017;30(1):409-47.
13. Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. [cité 26 janv 2023]. Infections par Acinetobacter - Maladies infectieuses. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/cocci-et-coccobacilles-%C3%A0-gram-n%C3%A9gatif/infections-par-acinetobacter>
14. Vong O. CASFM / EUCAST AVRIL 2021 V1.0 [Internet]. Société Française de Microbiologie. 2021 [cité 26 déc 2022]. Disponible sur: <https://www.sfm-microbiologie.org/2021/04/23/casfm-avril-2021-v1-0/>
15. Courvalin P, Leclercq R, Bingen É. AntibioGramme. 2e éd. ESKA; 2006. 693 p.
16. E. pilly. PILLY Etudiant P28-34 [Internet]. [cité 7 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.infectiologie.com/fr/pilly-etudiant-2021-uniquement-en-ligne-pilly-etudiant-2023-disponible-a-la-vente-et-en-ligne.html>
17. Patrice Courvalin, Roland Leclercq. Unithèque. [cité 31 déc 2022]. AntibioGramme. Disponible sur: <https://www.unitheque.com/antibiogramme/eska/Livre/49602>
18. Résumé des Caractéristiques du Produit céfidérol [Internet]. [cité 8 avr 2023]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0362378.htm>
19. Résumé des Caractéristiques du Produit fosfomycine [Internet]. [cité 31 déc 2022]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0188136.htm>
20. 14:00-17:00. ISO. [cité 2 août 2023]. ISO 20776-2:2007. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/standard/41631.html>
21. Michalik S. Comment VITEK® 2 génère-t-il des valeurs de CMI ? [Internet]. BIOMÉRIEUX iNEWS. 2017 [cité 18 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.biomerieux-microbio.com/fr/comment-vitek-2-genere-t-il-des-valeurs-de-cmi/>
22. bioMérieux France [Internet]. [cité 18 mai 2023]. VITEK® 2 Advanced Expert System - Outil automatisé conçu pour valider les résultats d'antibiogramme. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/vitekr-2-advanced-expert-system-outil-automatise-concu-pour-valider-les>
23. ThermoFischer. Plaque FRAM2GN.
24. Biomérieux. Biomérieux 2018, réf 413205, vitek N240.
25. ThermoFischer. Plaque ESB1F.
26. ThermoFischer. Plaque MDRGNX2F.
27. ThermoFischer. Plaque EUMDROXF.

28. Biomérieux. Biomérieux 2019, réf 423590, vitek XN12.
29. Saegeman V, Huynen P, Colaert J, Melin P, Verhaegen J. Susceptibility Testing of *Pseudomonas Aeruginosa* by the Vitek 2 System: A Comparison with Etest Results. *Acta Clinica Belgica*. 1 févr 2005;60(1):3-9.
30. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect*. mai 2007;13(5):541-4.
31. Papadomanolaki A, Siopi M, Karakosta P, Vourli S, Pournaras S. Comparative Evaluation of Vitek 2 and Etest versus Broth Microdilution for Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam Susceptibility Testing of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*. 27 juin 2022;11(7):865.
32. Simoons-Smit AM, Maclaren DM. Comparison of Vitek and Cobas Micro systems with a semiautomated conventional microsystem for identification and susceptibility testing of gram negative bacilli. *J Clin Pathol*. janv 1994;47(1):71-5.
33. Staneck JL, Glenn S, DiPersio JR, Leist PA. Wide variability in *Pseudomonas aeruginosa* aminoglycoside results among seven susceptibility testing procedures. *J Clin Microbiol*. oct 1989;27(10):2277-85.
34. Doern GV, Brueggemann AB, Perla R, Daly J, Halkias D, Jones RN, et al. Multicenter laboratory evaluation of the bioMérieux Vitek antimicrobial susceptibility testing system with 11 antimicrobial agents versus members of the family Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. août 1997;35(8):2115-9.
35. Jones RN, Biedenbach DJ, Marshall SA, Pfaller MA, Doern GV. Evaluation of the Vitek System to accurately test the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against cefepime. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 oct 1998;32(2):107-10.
36. Gómez-Garcés JL, Aracil B, Gil Y. Comparación entre dilución en agar y otras 3 técnicas para la determinación de la sensibilidad de 228 aislamientos clínicos de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009;27(6):331-7.
37. Bobenchik AM, Deak E, Hindler JA, Charlton CL, Humphries RM. Performance of Vitek 2 for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia* with Vitek 2 (2009 FDA) and CLSI M100S 26th Edition Breakpoints. *J Clin Microbiol*. févr 2017;55(2):450-6.
38. Daragon B, Fournier D, Plésiat P, Jeannot K. Performance of disc diffusion, MIC gradient tests and Vitek 2 for ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 15 sept 2021;76(10):2586-92.

39. Humphries R, Campeau S, Davis TE, Nagaro KJ, LaBombardi VJ, Franklin S, et al. Multicenter Evaluation of Ceftazidime-Avibactam Susceptibility Testing of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* on the Vitek 2 System. *J Clin Microbiol.* 18 févr 2021;59(3):e01870-20.
40. Mazzariol A, Aldegheri M, Ligozzi M, Lo Cascio G, Koncan R, Fontana R. Performance of Vitek 2 in antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with different mechanisms of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol.* juin 2008;46(6):2095-8.
41. Joyanes P, del Carmen Conejo M, Martínez-Martínez L, Perea EJ. Evaluation of the VITEK 2 System for the Identification and Susceptibility Testing of Three Species of Nonfermenting Gram-Negative Rods Frequently Isolated from Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* sept 2001;39(9):3247-53.
42. Juretschko S, LaBombardi VJ, Lerner SA, Schreckenberger PC. Accuracies of β -Lactam Susceptibility Test Results for *Pseudomonas aeruginosa* with Four Automated Systems (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek, and Vitek 2). *J Clin Microbiol.* avr 2007;45(4):1339-42.
43. Torres E, Villanueva R, Bou G. Comparison of different methods of determining β -lactam susceptibility in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology.* 2009;58(5):625-9.
44. Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Accuracy of Three Automated Systems (MicroScan WalkAway, VITEK, and VITEK 2) for Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* against Five Broad-Spectrum Beta-Lactam Agents. *J Clin Microbiol.* mars 2006;44(3):1101-4.
45. Grandesso S, Sapino B, Amici G, Mazzucato S, Solinas M, Gion M. Are E-test and Vitek2 good choices for tigecycline susceptibility testing when comparing broth microdilution for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii*? *New Microbiol.* oct 2014;37(4):503-8.
46. Sapino B, Mazzuccato S, Solinas M, Gion M, Grandesso S. Comparison of different methods for determining beta-lactam susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *New Microbiol.* oct 2012;35(4):491-4.
47. Sacco F, Visca P, Runci F, Antonelli G, Raponi G. Susceptibility Testing of Colistin for *Acinetobacter baumannii*: How Far Are We from the Truth? *Antibiotics (Basel).* 5 janv 2021;10(1):48.
48. Kulah C, Aktas E, Comert F, Ozlu N, Akyar I, Ankarali H. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. *BMC Infect Dis.* 16 mars 2009;9:30.
49. Fadana V, Thomas T, von Knorring N. Retrospective analysis of Vitek®2 performance compared to manual broth micro-dilution for colistin susceptibility testing of *Acinetobacter baumannii* complex isolates in South Africa. *Afr J Lab Med.* 2022;11(1):1597.

50. Yin D, Guo Y, Li M, Wu W, Tang J, Liu Y, et al. Performance of VITEK 2, E-test, Kirby-Bauer disk diffusion, and modified Kirby-Bauer disk diffusion compared to reference broth microdilution for testing tigecycline susceptibility of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and *A. baumannii* in a multicenter study in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. juin 2021;40(6):1149-54.
51. Performance of three commercial assays for colistin susceptibility in clinical isolates and Mcr-1 carrying reference strain - PubMed [Internet]. [cité 22 juin 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32436869/>
52. Singhal L, Sharma M, Verma S, Kaur R, Britto XB, Kumar SM, et al. Comparative Evaluation of Broth Microdilution with Polystyrene and Glass-Coated Plates, Agar Dilution, E-Test, Vitek, and Disk Diffusion for Susceptibility Testing of Colistin and Polymyxin B on Carbapenem-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist*. oct 2018;24(8):1082-8.
53. Cortazzo V, Posteraro B, Menchinelli G, Liotti FM, D’Inzeo T, Fiori B, et al. Susceptibility of Meropenem-Resistant and/or Carbapenemase-Producing Clinical Isolates of Enterobacterales (Enterobacteriaceae) and *Pseudomonas aeruginosa* to Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam as Assessed by In Vitro Testing Methods. *Antibiotics (Basel)*. 29 juill 2022;11(8):1023.
54. Multicenter Clinical Evaluation of Vitek 2 Meropenem-Vaborbactam for Susceptibility Testing of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* - PubMed [Internet]. [cité 12 août 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34705536/>
55. Protocole lecture MDB.
56. Système Sensititre Vizion pour affichage numérique de la valeur CMI - FR [Internet]. [cité 5 août 2023]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/clinical/clinical-microbiology/antimicrobial-susceptibility-testing/sensititre-ast/vizion.html>

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2022/2023

Nom : Sohier
Prénom : Thomas

Titre de la thèse : TECHNIQUES DISPONIBLES POUR RÉALISER LES ANTIBIOGRAMMES EN MILIEU LIQUIDE POUR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* & *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, Vitek 2, microdilution, CMI

Résumé : Au courant des nouvelles recommandations du CA-SFM, le laboratoire du Centre Hospitalier de Valenciennes se questionne sur la mise en place d'un antibiogramme en milieu liquide pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

La microdilution est définie par la 1^{ère} partie de la norme ISO 20776, la seconde partie décrit les outils pour évaluer la performance de la technique commercialisée versus la technique de référence. Deux automates sont comparés : le Vitek 2 et le Sensititre. Le Sensititre s'annonce comme l'automatisation de la norme 20776 tandis que le Vitek 2 s'en s'affranchit pour rendre des CMI en milieu liquide. Nous avons d'abord comparé les panels disponibles pour les bacilles non fermentant des fabricants. La carte Vitek 2 N240 répond de manière plus complète aux panels recommandés en 1^{ère} intention. En revanche, la plaque Sensititre EUMDROXF répond mieux à la liste complémentaire. La lecture des articles comparant ces 2 techniques s'est montrée ardue : biais de sélection, résultats contradictoires, échantillonnage faible.

Pour *A. baumannii*, 4 antibiotiques sur 15 apparaissent fiables sur Vitek 2 : la gentamicine, le sulfaméthoxazole-triméthoprime, la ciprofloxacine et la lévofloxacine.

Pour *P. aeruginosa*, une majorité des antibiotiques sont acceptables sur Vitek 2, plus performants sur les souches sensibles. Une validation biologique vigilante doit être appliquée sur certaines β -lactamines (pipéracilline, céfépime et ceftazidime/avibactam) et pour les phénotypes multirésistants.

Les performances globales du Vitek 2 sont bonnes, néanmoins il persiste une difficulté pour le logiciel AES à catégoriser la susceptibilité des BNF probablement en raison de leurs diversités de mécanismes de résistance.

Le Sensititre quant à lui représente la meilleure technique d'automatisation de la microdilution. Pourtant en pratique il révèle quelques limites : risque d'erreurs humaines, temps technique, lecture de ces résultats, coût d'automates complémentaires et des plaques.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Goffard Anne, PU-PH, CHU de Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Madame le Docteur Mazars Edith, PH, CH de Valenciennes

Assesseur(s) :

Madame le Docteur Dewulf Gisèle, PH, CH de Valenciennes

Monsieur le Docteur Wallet Frédéric, PH, CHU de Lille