

Evaluation de la résistance aux antibiotiques chez l'animal

Pratique et importance en laboratoire d'analyses vétérinaires



Laboratoire Départemental Vétérinaire
Nicolas Keck

Introduction

- Importance de l'évaluation de la résistance
 - Aider les praticiens pour traitement adapté
 - Alimenter un réseau de surveillance national/local
 - Pour cela il faut :
 - Isoler les bactéries (divers prélèvements)
 - Identifier les bactéries pathogènes
 - Evaluer la sensibilité/résistance en utilisant des méthodes adaptées
 - Détecter des phénotypes particuliers
 - Transmettre ces données aux praticiens et au laboratoire de référence



Ensemencement et identification



Quand y avoir recours?

- L'antibiogramme n'est pas indispensable (au moins dans un premier temps) :
 - si les données épidémiologiques permettent de réaliser une antibiothérapie probabiliste en ciblant les bactéries très souvent impliquées dans le type de pathologie et si ces espèces sont habituellement sensibles au traitement de référence
 - si le traitement est local
- Très utile, voire indispensable en cas de :
 - Echec thérapeutique
 - Suspicion pathologie polymicrobienne
 - Pathologie urinaire
 - Infections profondes ostéoarticulaires, mauvais état général
 - Epanchement, abcès (anaérobies)
 - Infections nosocomiales
 - Recours aux antibiotiques critiques

Prélèvement

- Où prélever : Site de l'infection :
 - Jonction tissu sain et inflammatoire
 - Nettoyer si besoin avec du sérum physiologique
 - Abscesses : éviter le pus (Ok pour pyodermites)
- Quand :
 - le plus tôt possible
 - Suite antibiothérapie variable (prévenir le labo)
 - Abscesses : possible immédiatement
 - Urine, peau : 4 jours
- Comment : prélever de façon aseptique

Choix du specimen

- Pyodermites :
 - Désinfection de la surface cutanée
 - Aspiration du liquide vésiculaire
 - Grattage du plancher des ulcères
 - Ouverture au scalpel et raclage des parois des pustules, profondeurs des plis (labiaux ou caudaux)
- Otites :
 - Nettoyage (retirer le cerumen)
 - Ecouvillonnage profond
- Abscesses :
 - Débrider chirurgicalement
 - Ecouvillonnage parois ou biopsie (pas de pus)

Choix du specimen

- Pus dans les grandes cavités :
 - Nettoyage/désinfection du site de ponction
 - Aspiration à la seringue (sans bulle)
 - Transport rapide au laboratoire
- Affections pulmonaires
 - Lavage broncho-alvéolaire
 - Biopsies pulmonaires
- Affections intestinales
 - Selles fraîches
 - Biopsies
- Affections oculaires :
 - Raclage des sécrétions purulentes de la conjonctive ou cornée
 - Ecouvillonnage conjonctival angle interne de l'oeil

Prélèvement

- Ecouvillon :
 - En surface ou anfractuosités
 - Surfaces sèches : humidifier avec NaCl
 - Recherche anaérobies : inciser et écouvillonner l'intérieur
 - Milieu transport : Stuart ou Amies ± charbon
 - Avantage : facile à transporter
 - Inconvénient : faible volume et risque d'altération bactérienne ou prélèvement flore commensale
- Biopsie :
 - Pilulier stérile
 - Humidifier la biopsie avec du sérum physiologique
 - Avantage : les bactéries restent dans leur milieu
 - Inconvénient : conservation
- Liquide :
 - Volume suffisant (sinon écouvillonner le liquide)
 - Recherche anaérobies : utiliser une seringue purgée et bouchée ou écouvillonner



Prélèvement

- Expédition :
 - UN 3373
 - Triple emballage
 - Responsabilité expéditeur
- Demande d'analyses :
 - Nature prélèvement
 - Date prélèvement
 - Analyses demandées
 - Commémoratifs :
 - Durée maladie
 - Traitement en cours
 - Suspicion clinique



FICHE DE DEMANDE D'ANALYSES SANTE ANIMALE

AUTOPSIE

1 - Autopsie avec descriptif lésionnel sans analyses complémentaires

Cocher la ou les cases

A. Animaux d'élevage

Poussins

Volailles, lapins

Mammifères de taille moyenne

Oiseaux de volière, poisson d'aquarium

Petits animaux (chat, chiot, rongeur domestique,...)

Animaux de taille moyenne (chien,...)

Animaux de taille moyenne (chien,...)

2 - Autopsie avec examens complémentaires (bactériologie et parasitologie)

A. Animaux d'élevage

Poussins

Volailles, lapins

Mammifères de taille moyenne

Poissons

Oiseaux de volière, poisson d'aquarium

Petits animaux (chat, chiot, rongeur,...)

Animaux de taille moyenne (chien,...)

Animaux de taille moyenne (chien,...)

BACTERIOLOGIE

Prélèvements courants (bactériologie aérobie + antibiogramme)

Coproculture (bactériologie aérobie + équilibre de la flore + salmonelles)

Uroculture (bactériologie aérobie + dénombrement + examen du culot)

Recherche et identification de bactéries anaérobies

Bactériologie aérobie sur plusieurs organes d'un même animal (+antibiogramme)

Recherche de maladies abortives

Bactéries spécifiques (préciser le ou les germes) :

SEROLOGIE

Leishmaniose par Immunofluorescence et Electrosynérèse

Leishmaniose canine et féline par Immunofluorescence

Ehrlichiose par Immunofluorescence indirecte

MYCOLOGIE

Examen direct

Mise en culture après examen direct

PARASITOLOGIE

Examen direct sur organes

Recherche de protozoaires (examen direct + coloration)

Coproculture parasitaire quantitative

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Leishmaniose (sang sur EDTA)

Herpesvirose et/ou vibriose des mollusques (entourer : mélange ou individuel)

Mycobactéries atypiques (organes)

Schmallenberg (organes)

Pseudoloma (organes)

AUTRES ANALYSES

Merci de détailler votre demande (maladie et méthode) :

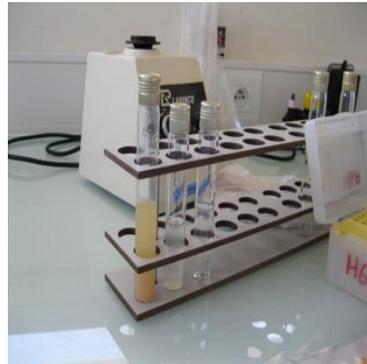
Consignes pour les prélèvements

GESTION DES PRÉLÈVEMENTS

Tous les prélèvements présentant un risque biologique doivent être acheminés en emballage UN 3373.

Type d'analyse	Echantillons	Emballage / Transport	Délai de dépôt maximum recommandé	Recommandations / Commémoratifs	Délai moyen de résultat
Bactériologie aérobie	Ecouvillons	Ecouvillons avec milieu de transport courant	48 h	Signaler un éventuel traitement. En cas de suspicion de pasteurellose éviter la réfrigération	3-5 j.
Bactériologie aérobie	Biopsies, raclages...	Pot solide, vissé, hermétique Acheminement en réfrigéré	48 h	Signaler un éventuel traitement. En cas de suspicion de pasteurellose éviter la réfrigération	3-5 j.
Bactériologie aérobie	Urine	1 ml souhaitable Pot solide, vissé, hermétique	24 h max souhaitable	Ne pas congeler. Signaler un éventuel traitement	3-5 j.
Bactériologie anaérobie	Ecouvillons	Ecouvillons avec milieu de transport charbon	24 h	Signaler un éventuel traitement	3-7 j.
Bactériologie anaérobie	Biopsies, ponctions, anses intestinales ligaturées	Préciser si dénombrement souhaité Acheminement en réfrigéré	24 h	Ne pas congeler. Signaler un éventuel traitement	3-7 j.
Mycologie (examen direct, culture)	Poils entiers, raclages cutanés, tissus	Pot solide	72 h	Prélever une bonne quantité de poils et squames sur le pourtour de la lésion	21 j.
Coprocopie parasitaire	Matières fécales	Emballage solide et hermétique, 5 g minimum	72 h	Préciser si recherche de larves par technique Baermann	2 j.
Recherche de protozoaires	Matières fécales	Emballage solide et hermétique	24 h	Acheminer les prélèvements le plus rapidement possible	2 j.
Sérologie animaux d'élevage (diagnostic)	Sang	Tube sec avec ou sans gel (bouchon rouge)	72 h	Identifier chaque tube	2-5 j.
Sérologie animaux de compagnie (diagnostic)	Sang, sérum	Microtube, tube sec avec ou sans gel (bouchon rouge)	72 h	Eviter hémolyse	3 j.
PCR (diagnostic)	Sang	Tube EDTA (bouchon violet)	48 h	Eviter hémolyse	5 j.
PCR (diagnostic)	Tissus frais ou congelés	Pot solide, vissé, hermétique Acheminement en réfrigéré ou congelé	48 h		5 j.

Isolement des bactéries



Pré-
traitement
/dilutions

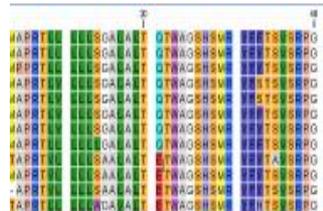
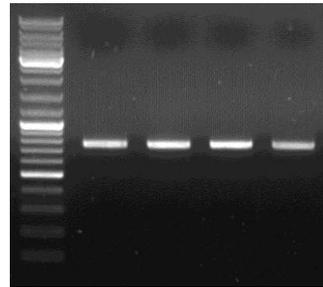
Ensemencement
direct/enrichisse-
ment

Milieux
sélectifs/non
sélectifs

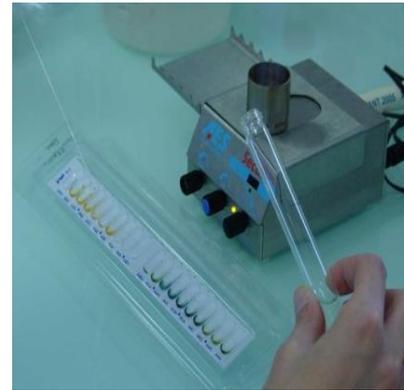
Identification bactérienne



Identification protéomique (MALDI-TOF)



Biologie moléculaire



Systèmes d'identification miniaturisés (automatisés ou non)



Tests d'identification biochimiques simples



Evaluation de la sensibilité



Activité bactéricide/bactériostatique

Activité bactériostatique

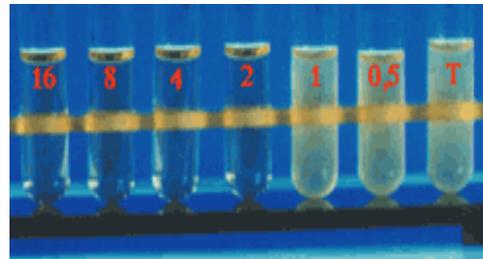
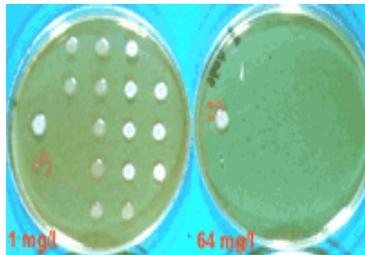
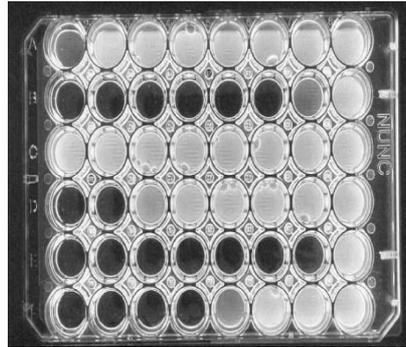
- Evaluation in vitro
- Détermination d'une CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)
- Pas de culture
- Méthodes standardisées
 - Liquide/solide
 - Dilution antibiotique dans milieu
 - Inoculum standardisé

Activité bactéricide

- Evaluation in vitro
- Détermination de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide)
- Mort de la plupart (>99,9%) des micro-organismes au bout d'un certain temps d'exposition
 - Bactéricide : CMI=CMB
 - Bactériostatique : CMI<<CMB

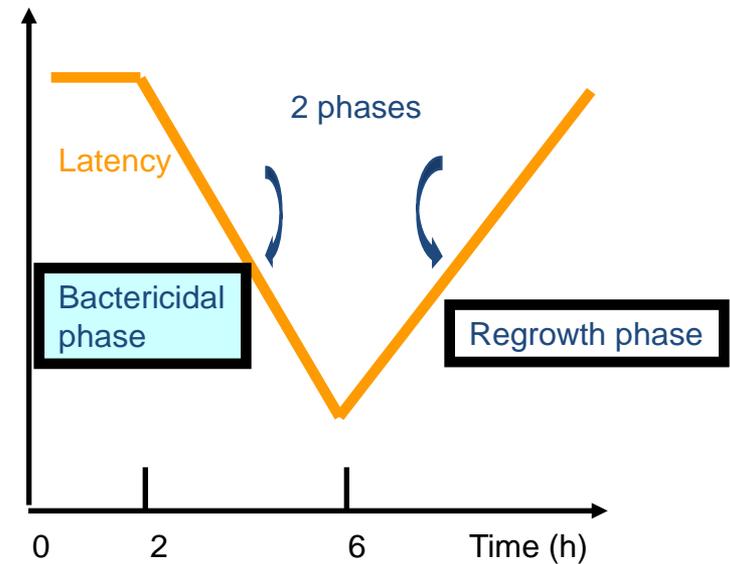
Activité bactéricide/bactériostatique

Activité bactériostatique



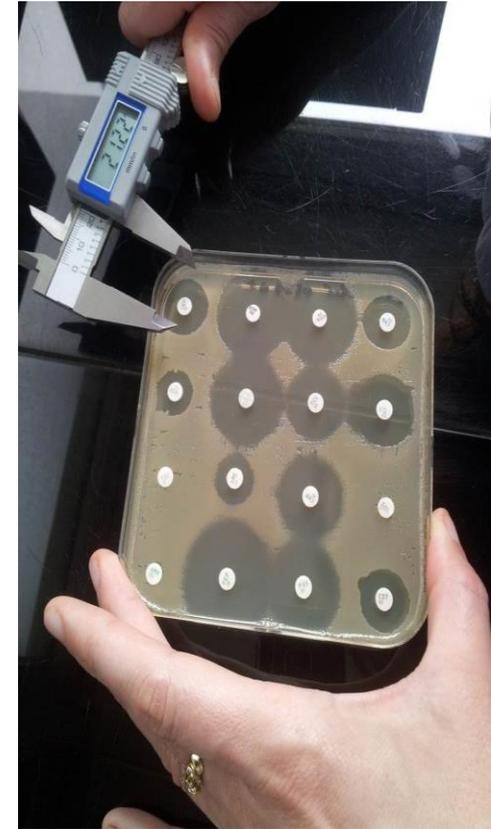
Activité bactéricide

Log C.F.U. / ml (10^5)

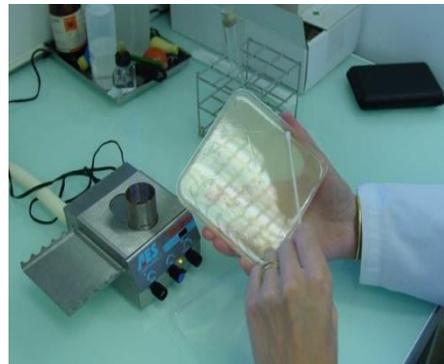
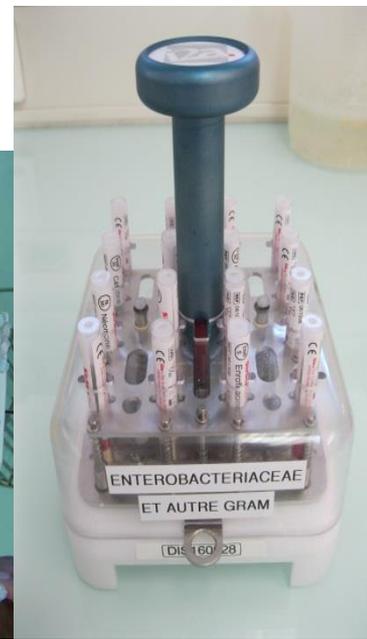
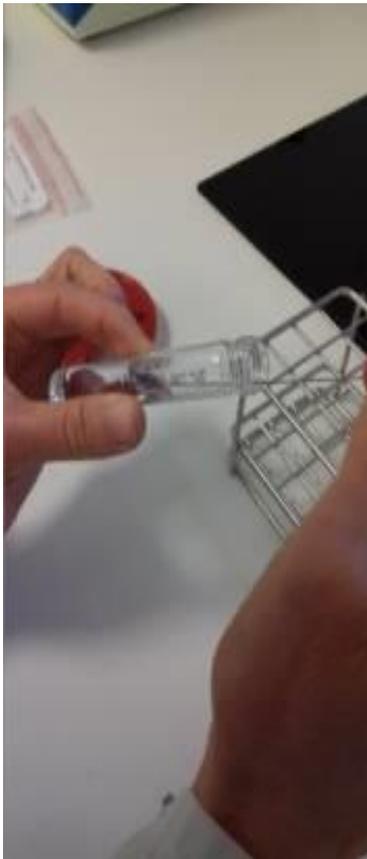


Antibiogramme

- Facile et rapide à mettre en oeuvre
- Test de plusieurs antibiotiques en une seule fois
- Permet de détecter
 - Des synergies ou antagonismes entre antibiotiques
 - Des phénotypes particuliers de résistance (ESBL, MLSb)



Méthode



Inoculum calibration

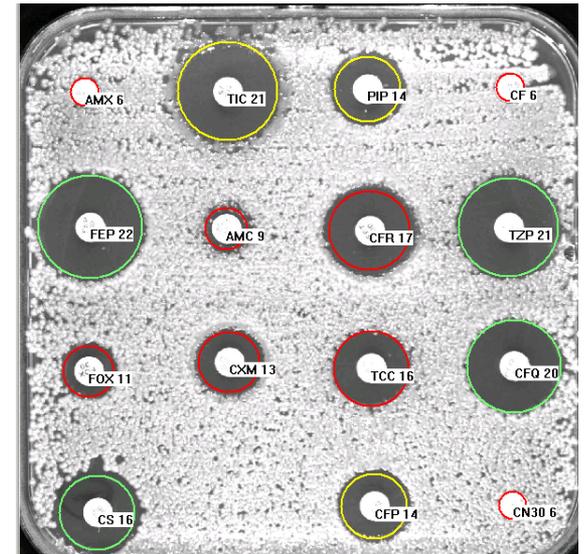
- Phase critique



Densitomètre	Standard interne	Calibré visuellement	Pas calibré
--------------	------------------	----------------------	-------------

Diagnostic

- Antibiogramme standardisé
 - Norme AFNOR NF U47-107
 - Recommandations CA-SFM
 - Souches de référence
 - Personnel qualifié
 - Essai Inter-Laboratoires annuel



Fiabilisation des données

Choix des antibiotiques testés

- La résistance intrinsèque doit être prise en compte pour :
 - Définition des panels
 - Vérifier la conformité de l'antibiogramme avec l'identification

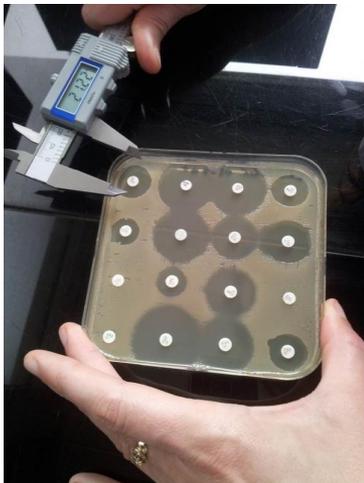
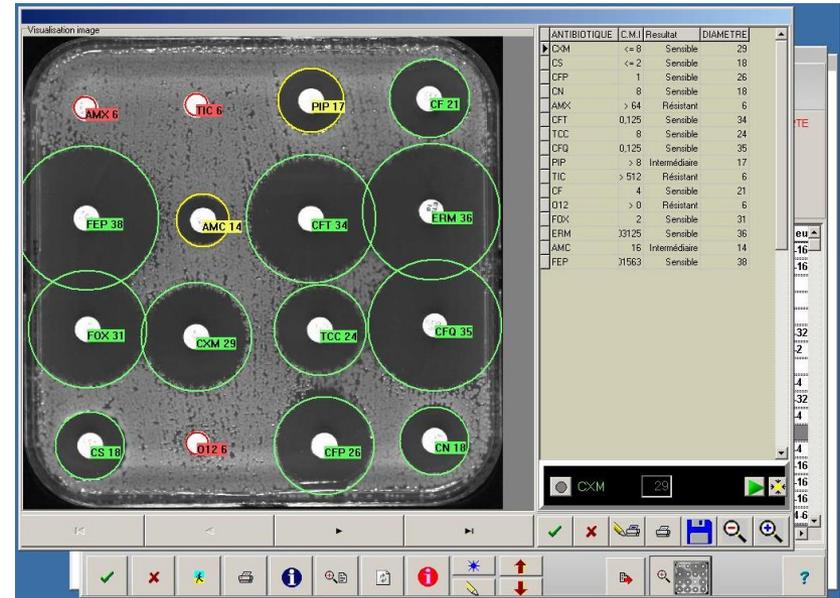
- Les espèces animales et la pathologie doivent également être pris en compte

Germe identifié : Pasteurella spp

Antibiotiques	Interp. (*)			Diamètres mesurés (mm)
	S	I	R	
* Aminosides				
Gentamicine	X			25
Néomycine	X			20
Streptomycine	X			22
* Bêta-Lactamines				
Amoxicilline	X			44
Amoxicilline + Acide clavulanique	X			34
Céfalexine (C1G)	X			28
Ceftiofur (C3G)	X			40
Cefquinome (C4G)	X			33
* Phénicolés				
Florfenicol	X			40
* Polypeptides				
Colistine	X			25
* Quinolones				
Acide Nalidixique			X	6
Enrofloxacin	X			27
Marbofloxacin	X			26
* Sulfamides				
Sulfamides + Triméthoprim	X			40
* Tétracyclines				
Tétracycline	X			32
* Macrolides				
Erythromycine			X	15
* Divers				
Métronidazole			X	6

(* S : sensible - I : intermédiaire - R:résistant)

Interprétation de résultats



Interprétation des résultats

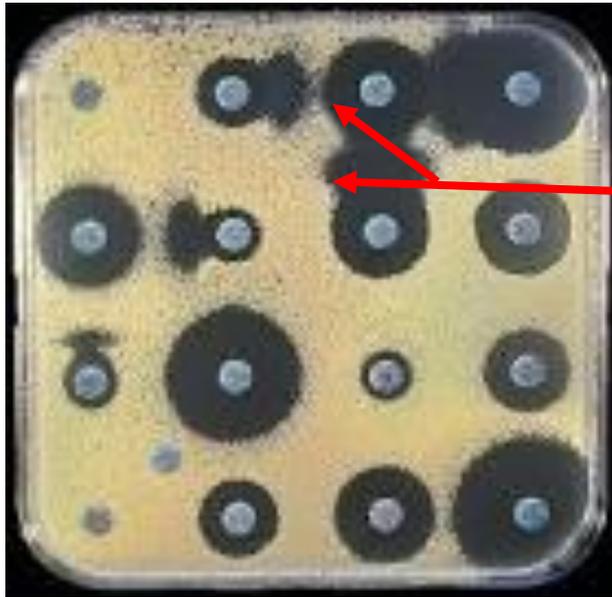


ANTIBIOGRAMME VETERINAIRE
DU COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME
DE LA
SOCIETE FRANCAISE DE
MICROBIOLOGIE

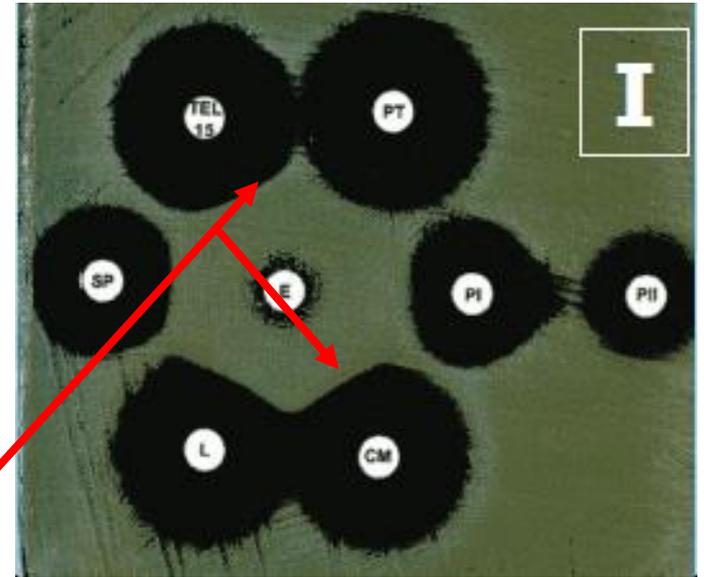
Tableau 4 – Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative en médecine vétérinaire pour *Streptococcus* spp..

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Pénicilline G	-	≤ 0,25	> 16	-	-	<p>La sensibilité des streptocoques autres que <i>S. uberis</i> à la pénicilline G est évaluée avec un disque d'oxacilline à 5 µg (OXA-5) selon les critères suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - diamètre OXA-5 ≥ 21 mm - souche sensible à pénicilline G. Cette interprétation est prédictive de l'activité des autres β-lactamines incluant les streptocoques dans leur spectre. - diamètre OXA-5 < 21 mm - souche I ou R à pénicilline G. <p>Devant toute souche de sensibilité diminuée (OXA-5 < 21 mm), il y a lieu de déterminer la CMI de l'ampicilline et de l'amoxicilline (sauf pour <i>S. suis</i>, voir ci-dessous).</p> <p><u><i>Streptococcus uberis</i></u> La sensibilité à la pénicilline G est évaluée selon les diamètres critiques suivants pour l'oxacilline (mm) : S ≥ 21 et R < 14. Pour des raisons de suivi épidémiologique, les <i>S. uberis</i> dont la zone d'inhibition se situe entre ces 2 diamètres sont catégorisés «intermédiaire» au laboratoire mais rendus «sensibles» au vétérinaire.</p> <p><u><i>Streptococcus suis</i></u> La sensibilité à l'amoxicilline est évaluée avec le disque contenant cet antibiotique (25µg) et les diamètres critiques suivants (mm) : S ≥ 21 et R < 14.</p>
Ampicilline	-	≤ 0,5	> 16	-	-	
Amoxicilline	-	≤ 0,5	> 16	-	-	
Oxacilline	5 µg	≤ 2	> 2	≥ 21	< 21	
Céfalaxine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12	
Streptomycine	500 µg	≤ 250	> 500	≥ 14	< 12	<p>Les streptocoques présentent une résistance naturelle de bas niveau (BNR) à tous les aminoglycosides qui n'empêche pas d'obtenir un effet synergique bactéricide entre un aminoglycoside et une pénicilline.</p> <p>L'acquisition d'une résistance de haut niveau (HNR) aux aminoglycosides, détectée grâce à des disques fortement chargés en streptomycine (S : 500 µg), kanamycine (K : 1000 µg) et gentamicine (G : 500 µg), abolit cet effet synergique bactéricide pour le(s) aminoglycoside(s) concerné(s). En outre, HNR à la gentamicine implique HNR à la kanamycine.</p> <p>Toutefois, en cas de HNR :</p> <ul style="list-style-type: none"> • les autres aminosides que la gentamicine, la kanamycine et la streptomycine restent utilisables en association. • La combinaison S^{HNR} + K^{HNR} est possible. <p>Pour les valeurs « intermédiaires » des diamètres, le niveau de résistance devra être confirmé par dilution en agar ou en bouillon contenant 500 µg/ml de S, K ou G. (HNR : CMI > 500 µg/ml).</p>
Kanamycine	1000 µg	≤ 250	> 500	≥ 14	< 10	
Gentamicine	500 µg	≤ 250	> 500	≥ 17	< 11	
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 22	< 19	Interdit chez les animaux producteurs de denrée alimentaire.

Phénotypes de résistance



ESBL



MLSB



Contrôles qualité et transmission de données



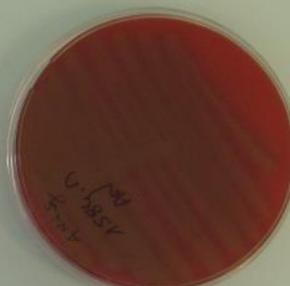
Traçabilité

L29-05-17
Rev. 8 du 13/05/2016

Feuille de passasse SAB organes et prélèvements courants
1584.01

Dossier: **1584.01**
 Espèce animale: **CN** Nature du prélèvement: **Ecouillon orille**
 Date de mise en culture: **14.03.17** Technicien: **Cf**

Après enrichissement ou OUI	Columbia	Chapman	Origaoki	AVC	Columbia + sang (anaérobiose)	Autre milieu
Date / Technicien	Hé hé hé b ⊙ c ⊙	Cobain man nld ⊙	LO b ⊙ c ⊙	Hé hé hé hé hé hé c ⊙ a ⊙ c ⊙ a ⊙		
Aspect colonies, coloration						
Identification Antibiogramme	Date / Technicien: 15/03 P. aeruginosa → 20µg fusid - Galvix Ap zone + AB + Soude - ONPG + EFT + Soude + AB - 16/03 SL → ONPG + kan qilin +) Staph pseudintermedius Nitrofurane - B. hydrolyse → C+					
Résultat	Code organisme: K.1816 Staphylococcus pseudintermedius R.375 Pseudomonas aeruginosa					
Autres						
Commentaires	Informations importantes pour le retour					





1584.01 Blm

Souches de référence

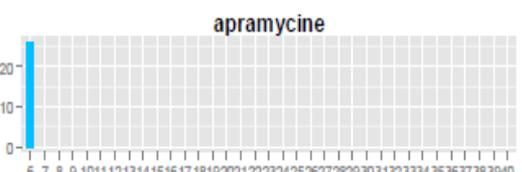
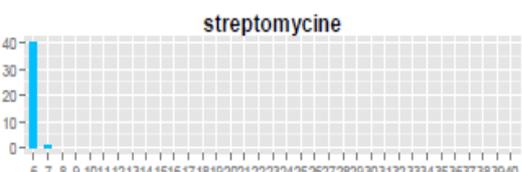
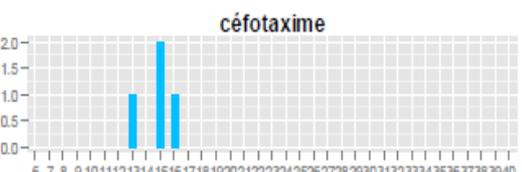
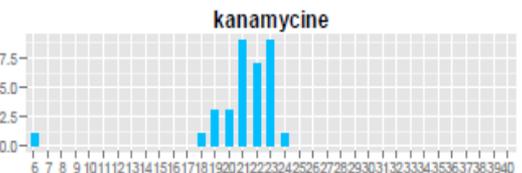
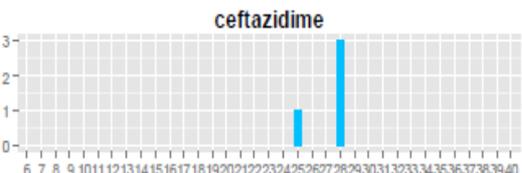
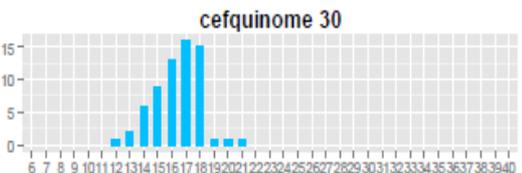
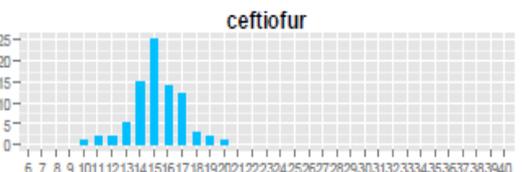
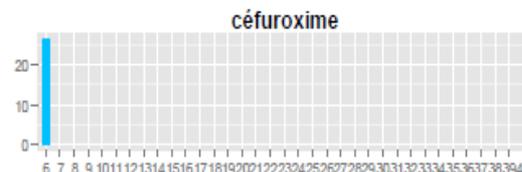
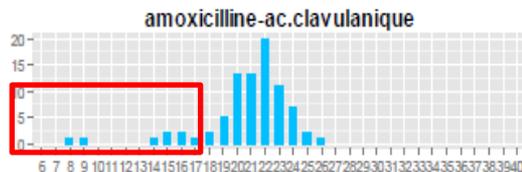
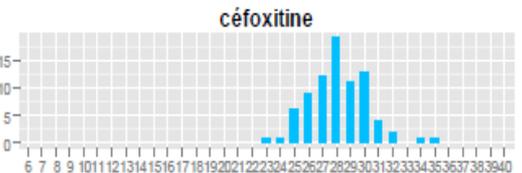
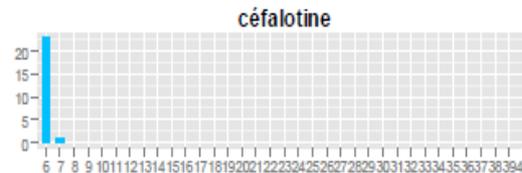
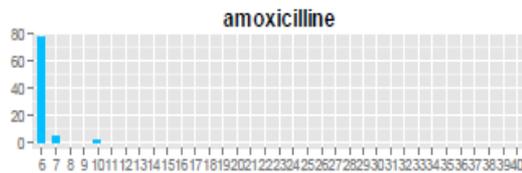


Fiche de contrôle qualité des antibiotiques

Antibiotiques	Charge du disque	Staphylococcus aureus CIP 76.25	Escherichia coli CIP 76.24	Streptococcus uberis CIP 103219
Pénicilline G	6 µg (10 UI)	35 - 40		35 - 40
Oxacilline	5 µg			30 - 38
Amoxicilline	25 µg		22 - 27	
Amoxicilline + Ac. clavulanique	20/10 µg		22 - 26	
Céfalotine	30 µg		18 - 22	
Céfoxitine	30 µg	28 - 33	25 - 31	
Ceftiofur	30 µg		27 - 32	35 - 40
Céfuroxime	30 µg		24 - 28	
Céfopérazone	30 µg			
Céfélexine	30 µg			31 - 37
Gentamicine	500 µg			23 - 29
Gentamicine	15 µg (10 UI)	26 - 31	23 - 29	
Kanamycine	30 UI	23 - 27	19 - 25	
Néomycine	30 UI	24 - 28	19 - 25	
Acide nalidixique	30 µg		24 - 29	
Acide oxolinique	10 µg			
Enrofloxacin	5 µg		30 - 37	
Marbofloxacin	5 µg	26 - 31		
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	26 - 32	24 - 31	20 - 25
Erythromycine	15 UI	26 - 31		28 - 34
Spiramycine	100 µg	23 - 28		28 - 33
Tylosine	30 µg	21 - 25		22 - 27
Tilmicosine	15 µg			
Lincomycine	15 µg	27 - 32		30 - 37
Florfenicol	30 µg		22 - 26	
Tétracycline	30 UI	27 - 32		25 - 31

Réf souche : MVPSA1 Genre bactérien : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			N° lot Mueller Hinton 1 Date de rec. 25/10/16 Pdl lot: 251016 Par: SL	N° lot Mueller Hinton 2 Date de rec. 25/10/16 Pdl lot: 251016 Par: SL	N° lot Mueller Hinton 3 Date de rec. 25/10/16 Pdl lot: 251016 Par: SL
FAMILLE	ANTIBIOTIQUE	CHARGE	DIAMETRE OBSERVE	DIAMETRE OBSERVE	DIAMETRE OBSERVE
AMINOSIDES	1. GENTAMICINE	15 µg (10 UI)	17	18	17
	2. CEFTIOFUR	30 µg	15	16	16
BETALACTAMINES	3. CEFQUINOME	30 µg	21	23	20
	4. COLISTINE	50 µg (300 UI)	19	20	20
QUINOLONES	5. ENROFLOXACINE	5 µg	20	18	18
	6. MARBOFLOXACINE	5 µg	22	21	22
Mesure de la hauteur de gélose (Hauteur attendue 4mm +/- 1mm):			5 mm	4 mm	4 mm
Lot de Mueller Hinton validé le et visa :			SL 11/2/16	SL 25/10/16	SL 25/10/16

Essais inter-laboratoires



Stockage des souches



Critères de stockage	Souches pathogènes, zoonotiques, ou BMR	Demande du client ou vétérinaire	Etudes spécifiques	Stockage systématique	Jamais
Modalités de stockage	Tubes de conservation en gélose	-20°C	-80°C	Lyophilisées	Quelques jours sur gélose

Conclusion

- Diagnostic de laboratoire important pour :
 - Identification de l'étiologie
 - Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques
 - Investigations plus poussée
 - Alimenter la surveillance
- Grand intérêt de la communication entre les praticiens et les biologistes