

technique de laboratoire

L'ANTIBIOGRAMME DU BACILLE DE LA TUBERCULOSE EN MILIEU LIQUIDE

Technique, premiers résultats, intérêt de la méthode

B. EPARDEAU, R. LEVAGUERESSE, M. FABRE *

L'ETUDE de la sensibilité du bacille de la tuberculose aux antibiotiques est encore l'une des tâches délicates du laboratoire.

Délicate pour les biologistes parce que la principale méthode actuellement utilisée, qui a fait largement la preuve de sa fiabilité, est techniquement longue à réaliser, un peu fastidieuse et parfois dangereuse pour le technicien. Il s'y ajoute que lorsque le laboratoire en cause ne réalise pas souvent cette technique, des erreurs de manipulation peuvent intervenir. Enfin, elle nécessite la conservation de milieux de culture de Lowenstein avec antibiotique incorporé, donc périssables. D'autre part, les résultats sont longs à obtenir. Nous reviendrons enfin sur le coût d'un antibiogramme.

Or, depuis maintenant plus de dix ans, Bretey et ses collaborateurs (9) ont étudié une nouvelle méthode de mesure de la résistance des mycobactéries.

Cette méthode, utilisée depuis en routine par trois hôpitaux parisiens, est en cours d'adoption à l'H.I.A. Percy; en voici le principe, la technique d'emploi et des résultats comparatifs préliminaires avec la méthode des proportions en milieux solides.

I. — PRINCIPE.

La méthode est basée sur l'étude du métabolisme bactérien par son dégagement d'anhydride carbonique (CO_2). Le dégagement d'anhydride carbonique peut être analysé quantitativement.

Il suffit de comparer le métabolisme du bacille de la tuberculose en présence des antibacillaires à celui de

témoins sans antibiotiques. Il s'agit en somme d'une méthode des proportions étudiées en milieu liquide.

II. — L'APPAREILLAGE.

Le matériel nécessaire pour une telle manipulation est le suivant, avec un montage tel que nous le propose le schéma de Bretey et Vergez (fig. 1 a et b). Il comporte :

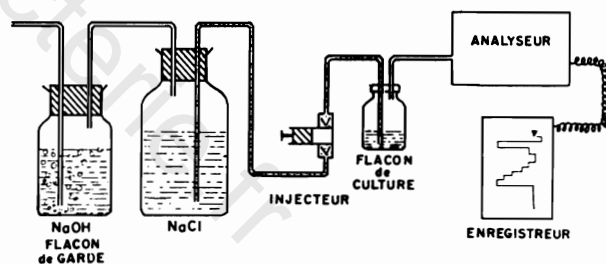


Figure n° 1 a. — Schéma général de l'appareillage selon Bretey et Vergez.

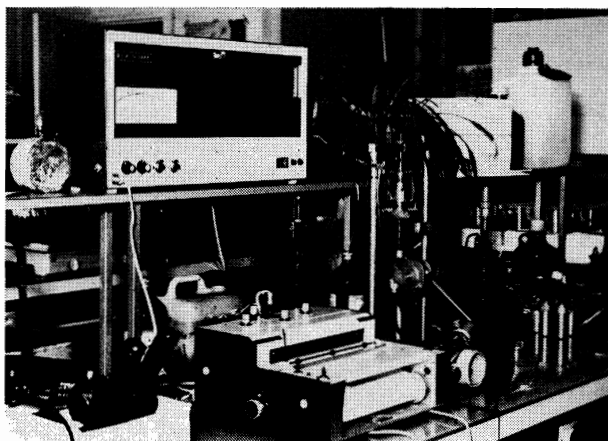


Figure n° 1 b. — Vue de l'analyseur (en haut), de l'enregistreur en bas et du perforateur à droite.

* B. EPARDEAU, médecin en chef, biologiste des hôpitaux — R. LE VAGUERESSE, médecin en chef, biologiste des hôpitaux — M. FABRE.

Tirés à part : B. EPARDEAU, service de biologie, H.I.A. Percy, 92141, Clamart.

Mots clés : Bacille de la tuberculose - Antibiogramme en milieu liquide - Antibiogramme gazométrique.

- un analyseur de CO₂ de 0 à 4 p. 100 ;
- un enregistreur potentiométrique ;
- un perforateur de capsule réalisé artisanalement ;
- un distributeur doseur pouvant injecter 5 ml ;
- une bouteille de CO₂ de concentration connue (inférieure à 2 p. 100) ;
- des seringues rhéomètres avec des aiguilles longues pour permettre la perforation des capsules et réhydrater ou ensemercer les milieux.

III. — LES MILIEUX DE CULTURE.

Les flacons de culture sont de type flacon de pénicilline. Il s'agit d'un milieu de Youmans lyophilisé avec reconstitution au moment de l'emploi. Les antibiotiques sont incorporés dans le milieu Youmans avant la lyophilisation.

L'institut Pasteur production assure la fabrication et la distribution des flacons.

Concentration d'antibiotique contenue dans chaque flacon :

- Isoniazide : 0,1 γ - 0,2 γ - 0,5 γ
- Streptomycine : 2 γ - 5 γ - 10 γ
- Ethambutol : 7 γ - 12 γ - 16 γ
- Ethionamide : 1,5 γ - 2,5 γ - 4 γ
- Rifampicine : 1 γ - 2 γ - 4 γ

Un autre milieu est utilisé pour la préparation des dilutions : l'eau glycinée à 2 p. 100.

IV. — TECHNIQUE.

L'ensemble de la technique est résumée par la figure n° 2. L'ensemencement d'un milieu de Youmans (environ 5 ml) à partir d'un milieu de Lowenstein permet d'obtenir une culture en phase exponentielle.

1^{er} temps de la technique.

On prélève environ 1 mg de culture de la même façon que pour l'antibiogramme en milieu solide. Ce prélèvement est transféré dans le flacon de milieu de Youmans. On essaie de dissocier les colonies sur la paroi du flacon ; il peut persister de petits agglomérats. La mise en culture est de 3 à 4 jours.

2^e temps.

Au bout de cette durée d'incubation, il y a lieu d'obtenir une densité égale à environ 0,1 mg par ml de culture, ce qui correspond, macroscopiquement à une suspension bactérienne légèrement opalescente.

De toute façon, cela a peu d'importance, l'important étant que tous les tubes soient ensemencés à partir de la même solution mère ajustée : la différence portera sur le délai de lecture.

3^e temps.

On ensemence 1 ml de cette solution mère ajustée, dans un 1^{er} tube de milieu contenant 1,5 ml d'eau glycinée.

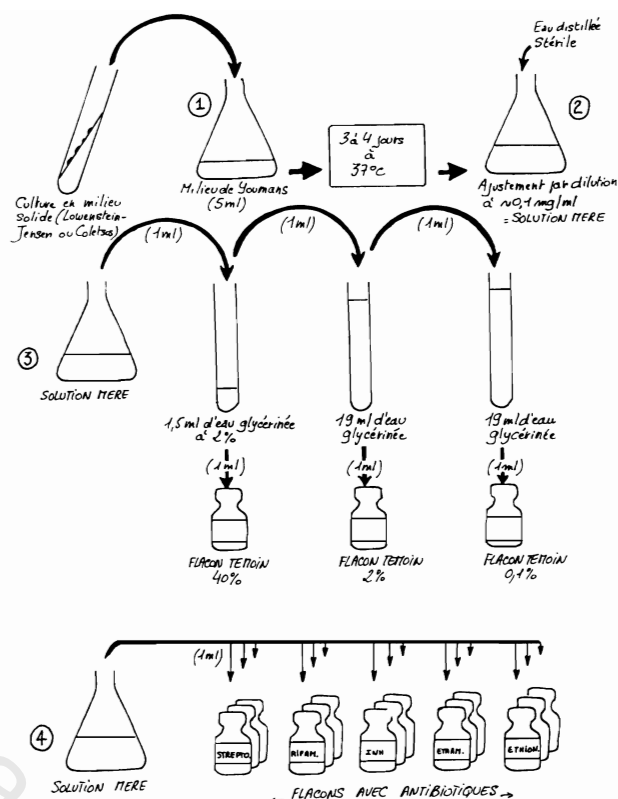


Figure n° 2. — Résumé de la technique.

Après mélange soigneux de cette suspension au rhéomètre (la pipette à bouche est à prescrire formellement, en raison des dangers de contamination) ; on prélève 1 ml de cette 1^{re} suspension que l'on transfère dans 19 ml d'eau glycinée qui constituera la dilution à 2 p. 100.

De même, on fera un 3^e « passage », vers un 3^e tube contenant lui aussi 19 ml d'eau glycinée, ceci constituera notre dilution à 0,1 p. 100.

Chacune de ces trois dilutions après une agitation soignée et prolongée permettra d'inoculer les trois flacons témoins à raison de 1 ml par flacon : on disposera ainsi des trois témoins, 40 p. 100, 2 p. 100 et 0,1 p. 100.

4^e temps.

Les 15 flacons des différents antibiotiques seront inoculés à partir de la solution-mère ajustée, à raison de 1 ml par flacon.

La dernière manipulation consiste à introduire de l'air filtré dans chaque flacon pour équilibrer la pression interne avec la pression atmosphérique.

Ce détail est particulièrement important pour la lecture de l'antibiogramme.

Les flacons sont placés à l'étuve à 37° avec si possible brasseur d'air intérieur.

V. — LECTURE DE L'ANTIBIOGRAMME.

Le moment favorable pour la lecture est celui où le témoin 0,1 p. 100 est bien visible macroscopiquement, soit après 8 à 12 jours d'étuve à 37°.

A ce moment de la culture, de petits flocons se mettent en suspension lorsqu'on agite le flacon : en cas de doute, l'examen à la loupe favorise l'interprétation.

La mesure se fait en perforant le flacon avec un trocard à double canal :

— Le premier canal permet d'inoculer en profondeur du flacon 5 ml de liquide de déplacement.

— Le deuxième, situé près de la garde, permet l'évacuation du gaz dégagé par la culture.

Ainsi, un volume constant est évacué et transféré dans l'analyseur qui a été étalonné préalablement sur une concentration connue d'anhydride carbonique. Dans le même temps, l'enregistreur est mis en route, ce qui permet de conserver sur document les déviations de l'analyseur.

Ainsi, lors du passage des différents témoins, l'enregistreur va permettre d'ajuster l'aiguille de l'enregistreur sur l'échelle du papier semi-logarithmique : cette aiguille sera ramenée à :

- 0,1 pour le témoin à 0,1 p. 100 ;
- 2 pour le témoin à 2 p. 100 ;
- 40 pour le témoin à 40 p. 100.

La lecture des cultures pourra être réalisée et l'enregistrement des sensibilités et des résistances sera pratiqué. Il y aura lieu de noter le nom de chaque antibiotique sur le document au moment des passages de façon à les repérer correctement pour l'interprétation (fig. 3).

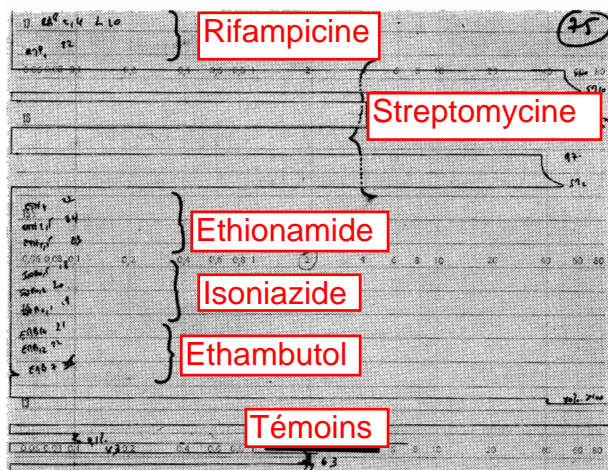


Figure n° 3. — Exemple d'enregistrement.

VI. — L'INTERPRETATION DES DONNEES DE L'ENREGISTREMENT.

Point capital de cet examen, l'interprétation des résultats suppose la connaissance préalable des seuils de résistance clinique pour chaque antibiotique. De même que pour le milieu solide où les concentrations critiques ont été fixées expérimentalement, le seuil critique décidé expérimentalement par les protagonistes de la méthode est de 2 p. 100 pour l'ensemble des antibiotiques actuellement étudiés.

VII. — RESULTATS.

L'étude de la sensibilité de 78 souches de bacilles de la tuberculose a été réalisée à la fois par la méthode en milieu liquide et en milieu solide.

La méthode traditionnelle des proportions en milieu solide a servi de référence.

Sur ces 78 antibiogrammes, la concordance a été totale (tableau I).

Seuls ont pu être comparés les antibiotiques suivants : Isoniazide (R), Rifampicine (R), Streptomycine (R), Ethambutol (R).

L'ethionamide a été testé en milieu liquide, mais n'a pu être comparé en milieu solide, car cette dernière méthode ne teste plus l'ethionamide.

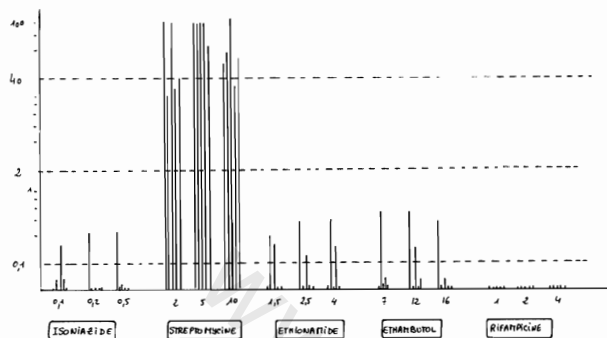
Il a été procédé à des essais de reproductibilité des résultats. Ces essais ont été malheureusement limités. Ils ont porté sur l'étude d'une souche de bacille de la tuberculose résistant à plusieurs antibiotiques.

Les résultats des relevés d'enregistrement figurent au tableau II.

TABLEAU I. — Etude de la sensibilité de 78 souches de bacilles de la tuberculose.

Antibiotiques	Accord	
	Sensibles	Résistants
Streptomycine	64	14
Isoniazide	79	01
Ethambutol	78 (100 p. 100)	0
Rifampicine	78 (100 p. 100)	0

TABEAU II. — Enregistrement de cinq dosages (souche N° 2515 59).



VIII. — DISCUSSION.

1) Discussion de nos résultats.

Sur quatre antibiotiques la concordance avec la méthode de référence est totale. Cela paraît spécialement important à souligner, d'autant que du point de vue clinique, les résultats n'ont montré également aucune discordance.

2) Discussion de la méthode.

Les points de discussion les plus importants concernant cette méthode ont porté sur les points critères de résistance.

Dans un premier temps, Bretey, Vergez, Mme Jahan et Brouet avaient fixé dans un tableau complexe lors de leur publication de 1973, les différents pourcentages retenus comme seuil de résistance. Ces chiffres étaient généralement bas et ont posé des problèmes d'interprétation.

Actuellement, les différents utilisateurs de cette méthode, retiennent un seuil plus élevé qui se situe à la hauteur

du témoin à 2 p. 100 pour le flacon de concentration moyenne.

Il faut dire qu'en pratique, la résistance se manifeste le plus souvent pour les trois flacons (concentration d'antibiotique faible, moyenne et forte).

Mais l'interprétation est beaucoup plus difficile lorsque les niveaux sont dissociés. On retient généralement en pratique, la position du flacon de concentration moyenne : s'il dépasse ou égale le 2 p. 100 la souche est considérée comme résistante.

Les réserves qu'ont faites les auteurs à propos des souches qui avaient une activité comprise ou égale à 0,1 p. 100 ne paraissent plus justifiées.

Une critique relativement sévère a été faite à propos des concentrations trop élevées dans les flacons (tableau III).

Cette critique n'est pas fondée, car la concentration présente dans les flacons est plus voisine de la concentration sérique que celle du milieu solide.

Ainsi, pour certains antibiotiques comme l'Ethambutol (R), les concentrations des flacons sont très différentes du milieu solide. De plus, pour la Streptomycine (R), 4 ug/ml en solide donnent 5 ug/ml en liquide (tableau III). Inversement pour la Rifampicine (R), on a 1, 2 et 4 gammas en liquide contre 40 gammas en solide.

C'est pour cela que certains ont pu dire que les deux méthodes ne sont pas comparables, car elles « jugent » le métabolisme du bacille sur des concentrations différentes des mêmes antibiotiques.

En pratique, il n'en reste rien et d'autres auteurs (Mme Offredo et coll., communication orale au symposium sur les mycobactéries Institut Pasteur, février 1981) ont montré la bonne concordance de la méthode sur une beaucoup plus grande série.

TABEAU III. — Concentration en microgramme par ml.

Antibacillaires	Faible		Moyenne		Forte		Pic sérique	Demi-vie
	Solide	Liquide	S	L	S	L		
Isoniazide	0,1	0,1	0,2	0,2	1 10	0,5	2,5 - 5	1 à 1,3 h à acétyleur rapide 3 à 4 h à acétyleur lent
Streptomycine		2	4	5		10	15 à 20	6 à 8 h
Ethionamide		1,5		2,5		4	1 à 4	3 h
Ethambutol		7	2	12		16	15	3 h
Rifampicine		1		2	40	4	10 à 15	3 h

TABLEAU IV. — Avantages et inconvénients comparés des procédés en milieu liquide et en milieu solide.

Inconvénients :	Liquide	Solide
Technique	Délicate	Assez délicate
Dangereuse	Relativement	Certainement
Sensible aux pollutions	Oui	Peu
Appareillage	Relativement coûteux	Aucun
Avantages :		
Temps d'apparition des cultures	8 à 12 jours	28 jours - 40 jours avec orientation au 14 ^e jour
Reproductibilité	Bonne	Pas toujours bonne
Concentration des antibiotiques	Très bonne (lyophilisée)	Moyenne
Permet de tester l'Ethionamide	Oui	Non
Interprétation	Immédiate	Comptage de colonies
Encombrement dans l'étuve	Faible	Notable
Prix de revient	120,65 F TTC (fin 1982)	200 F TTC

Il reste donc à dégager les avantages et les inconvénients comparés des procédés en milieu liquide et en milieu solide que nous présentons sous forme du tableau IV.

CONCLUSION.

La méthode gazométrique représente-t-elle un progrès ?

C'est certain quant à la rapidité de ses résultats, la facilité de sa lecture et quant à son prix de revient. Ses résultats paraissent fiables.

Ces avantages sont un peu contrebalancés par l'investissement en matériel et une mise au point technique assez délicate.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARTMANN (K.). — Recent progress in drug resistance tests for tubercle bacilli — *Bull. Un. int. Tuberc.*, 1966, 37, 189-225.
2. BERCEA (O.), BOGDANESCU (V.), MARCIAN (S.), BONCIOCAT (N.). — The disproportionality between colony count and dilution of the inoculated suspension in quantitative culture of Mycobacterium tuberculosis — *Tubercle*, London, 1968, 49, 310-317.

3. BRETEY (J.). — Une nouvelle méthode de mesure de la résistance des mycobactéries — *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1970, 154, 95-100.
4. BRETEY (J.), JAHAN (M.T.). — La culture en atmosphère confinée des mycobactéries ensemencées en profondeur, application à la mesure accélérée des résistances — *Ann. Inst. Pasteur*, 1971, 121, 349-387.
5. BRETEY (J.), VERGEZ (P.), JAHAN (M.T.), BROUET (G.). — Antibiogramme des mycobactéries : comparaison de deux méthodes — *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1972, 156, 592-594.
6. Colloque annuel de la Société française de Microbiologie, section de microbiologie clinique — Institut Pasteur, Paris, 5 février 1981, « les Mycobactéries ».
7. ENGBAER (H.C.), VERGMANN (B.), WEIS BENTZON (M.). — The sodium lauryl sulphate method in culturing sputum for bacteria — *Scand. J. Resp. Dis.*, 1967, 48, 268-284.
8. JENNISON (M.W.), WADSWORTH (G.P.). — Evaluation of the errors involved in estimating bacterial numbers by the platin method — *J. Bact.*, 1940, 39, 389-397.
9. LEFFORD (M.J.), MITCHISON (D.A.). — Comparison of methods for testing the sensitivity of Mycobacterium tuberculosis to ethionamide — *Tubercle*, London, 1966, 47, 250-261.
10. TSUKAMURA (M.), TSUKAMURA (S.). — [Numérotation des bacilles tuberculeux viables dans l'expectoration avec inoculation au moyen d'une anse spirale] (en jap.) — *Kekkaku*, 1963, 38, 166-171.
11. WILSON, *et al.* — The bacteriological grading of milk — *Med. Res. Council, Spec. Rep. ser.*, 1935, n° 206.