

ETUDE COMPARATIVE DE DIFFERENTES METHODES D'EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES BACTERIES ANAEROBIES STRICTES DE LA FLORE SOUS-GINGIVALE

A. KAMAGATE *, D. KONE *, N. T. COULIBALY *, E. BROU *, M. SIXOU

I - INTRODUCTION

L'antibiothérapie est indiquée dans le traitement d'une parodontite quand celle-ci ne répond que peu ou pas à la thérapie mécanique habituelle. Le choix d'un antibiotique destiné au traitement d'une parodontite est délicat, en raison de la complexité de la flore en cause. En l'absence d'une analyse bactériologique de la flore pathogène, le clinicien prescrira un traitement antibiotique de façon empirique. La recherche de bactéries pathogènes spécifiques responsables des destructions parodontales et de la perte d'ancrage des dents est particulièrement difficile. La plupart des bactéries directement impliquées dans ces pathologies sont difficiles à cultiver et à maintenir en vie lors des repiquages successifs. Les principaux micro-organismes incriminés dans les pathologie parodontales sont des bacilles à Gram négatif anaérobies strictes et/ou capnophiles. Cette flore bactérienne associée aux parodontites, peut fortement varier d'un patient à l'autre et d'un site à l'autre chez un même sujet. *Campylobacter rectus* est une bactérie microaérophile à Gram négatif qui est isolé à partir de la flore de plusieurs formes de parodontites de l'adulte. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Peptostreptococcus micros* sont des bactéries anaérobies strictes impliquées dans les formes évolutives de parodontite.

L'analyse bactériologique et l'évaluation de la sensibilité aux différentes molécules d'antibiotique constituent donc une étape importante dans le choix d'un antibiotique.

La concentration minimale inhibitrice (C.M.I.) se définit comme étant la plus faible concentration d'un antibiotique inhibant totalement la prolifération d'un nombre défini de bactéries. La détermination de la C.M.I. permet d'apprécier l'efficacité des agents antibactériens "in

vivo". Son calcul repose sur des techniques standardisées selon des normes internationales qui facilitent les comparaisons des profils de sensibilité des espèces bactériennes. Le "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS), en absence de consensus sur les anaérobies, ne retient qu'une seule concentration critique par antibiotique. Il s'agit généralement de la concentration critique la plus élevée retenue pour les bactéries anaérobies facultatives. Toute souche dont la C.M.I. est supérieur à cette concentration est considérée comme résistante. Inversement, toute souche dont la C.M.I. est inférieur ou égale à cette concentration est considérée comme sensible.

Les trois principales méthodes de détermination de la sensibilité aux antibiotiques sont :

1. L'antibiogramme par technique de diffusion en milieu solide
2. La méthode de dilution en milieu liquide,
3. La galerie ATB ANA (bioMérieux).

L'objectif de cette étude est de comparer l'efficacité de chacune de ces méthodes sur des bactéries anaérobies strictes isolées dans la flore sousgingivale de patients atteints de parodontites évolutives (parodontite à progression rapide, parodontite réfractaire, phase d'activité de parodontite de l'adulte).

II - MATERIELS ET METHODE

II - 1 - Les antibiotiques testés :

- ampicilline (bêta-lactamine)
- amoxicilline (bêta-lactamine)
- tétracycline (tétracycline)
- érythromycine (macrolide)
- métronidazole (5-nitro-imidazole)

D'autres antibiotiques ont été testés. Mais nous avons choisi de comparer les effets de cinq molécules antibiotiques, représentatifs des prescriptions habituelles en odontologie.

II - 2 - Les bactéries étudiées sont :

Porphyromonas gingivalis (P. g.) *Prevotella intermedia*

(R.i.) *Fusobacterium nucleatum* (F. n.) *Campylobacter rectus* (C. r.) *Peptostreptococcus micros* (P. m.)

Les bactéries utilisées sont des souches cliniques isolées chez des patients atteints de parodontite évolutive au Laboratoire des Maladies infectieuses Bucco-dentaires (Faculté de Chirurgie Dentaire - Toulouse).

Le milieu de transport utilisé était le VGMA III (Möller, 1966). C'est un milieu semi-gélose qui préserve les micro-organismes prélevés de l'oxygène de l'air. De plus, la présence d'éléments bactériostatiques dans sa composition (acétate de phenyl mercure) permet de maintenir le ratio de chacune des populations bactériennes dans le prélèvement.

Après une série de dilution dans du bouillon Wilkins-Chagren (W.C.), les prélèvements sont ensemencés sur des milieux sélectifs et non sélectifs enrichis et placés dans des conditions d'anaérobiose à 37°C pendant 5 à 10 jours.

Les tests d'identification des souches cliniques sont basés sur les critères du Bergey's Manuel (1994) :

- morphologie des colonies
- fluorescence à l'exposition au rayon UV long
- coloration de Gram complétée par la méthode au KOH
- mobilité
- tests biochimiques et enzymatiques
 - . catalase
 - . oxydase
 - . MUG
- galerie d'identification biochimique API 20A
- galerie d'identification enzymatique Rapid 32
- métabolisme respiratoire (aéro-anaérobiose, anaérobiose stricte,...)

La résistance aux antibiotiques est testée à partir de cultures pures.

II - 3 - Méthodologies

L'antibiogramme par technique de diffusion en gélose

Elle consiste à déposer à la surface d'une gélose Wilkins-Chagren des disques de papier buvard imprégnés des différents antibiotiques testés. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose et détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance par rapport au disque. Avant de déposer les dis-

ques, on ensemence uniformément la surface de la gélose avec le micro-organisme à étudier. L'inoculum doit être dense (opacité équivalente à 0,5 sur l'échelle de Mac Farland). Après une incubation de 24 à 72 heures en anaérobiose à 37°, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition dont le diamètre permet de mesurer la C.M.I. (la culture s'arrête dans la gélose, où il existe une concentration égale à la C.M.I.). Le système disque-milieu de culture est étalonné au préalable avec un grand nombre de souches de références de C.M.I. connues, déterminées par les méthodes de références, on trace ainsi la droite de régression ou "courbe de concordance", donnant la correspondance entre les C.M.I. et les diamètres des zones d'inhibition pour les disques et le milieu de culture considérés. Après, on mesure les diamètres des zones d'inhibition, puis on les reporte sur le graphique pour déduire les C.M.I. Les résultats sont exprimés en souche sensible, intermédiaire ou résistante. Cette méthode est la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Le coût est faible. Mais elle est critiquée par certain auteur en raison du manque de corrélation parfois entre les diamètres d'inhibition et les C.M.I. déterminées par les méthodes de références.

La méthode de dilution en milieu liquide

Nous avons appliqué la méthode de macrodilution qui consiste à distribuer 5 ml de bouillon de culture régénéré (Wilkins-Chagren) dans une série d'une dizaine de tube à hémolyse. Ensuite on distribue dans chaque tube, à l'exception du premier qui servira de témoin positif, des quantités croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant ainsi une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2. La concentration finale en antibiotique dans chaque tube est calculée pour 1 ml. Les antibiotiques utilisés dans cette méthode sont d'abord préparés en solution mères, puis congelés. La suspension bactérienne est préparée de façon à obtenir un inoculum de 10⁶ UFC/ml (UFC = unités formant colonies). Après une incubation de 24 à 48 heures à 37°, on observe les tubes visuellement. Dans un certain nombre de tubes, la culture est positive. Un trouble nettement visible est apparu dans ces tubes. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube où il n'y a plus de culture visible indique la concentration minima inhibitrice. Cette méthode est très fiable. Mais elle est trop longue à réaliser pour être utilisable en bactériologie clinique.

La galerie ATB ANAR^R (bioMérieux)

Les galeries ATB comportent 16 paires de cupules. La première sert de témoin de culture. Les 14 suivantes contiennent chacune un antibiotique à deux concentrations (c et C). La dernière cupule, sans antibiotique, permet de tester un antibiotique supplémentaire.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture sur gélose au sang. Les colonies prélevées sont mises en suspension dans le milieu API 20 A de façon à obtenir une opacité de 0,3 sur l'échelle Mac Farland. Pour les bactéries à croissance lente, 200 µl de la suspension sont dilués dans le milieu ATBS. La répartition finale de l'inoculum se fait en raison de 135 µl par cupule. Après 24 à 48 heures d'incubation, la lecture de la croissance est faite soit visuellement, soit avec un lecteur automatique ATB. Les résultats sont exprimés en souche sensible, intermédiaire ou résistante. Cette méthode est facile d'emploi et très fiable. Mais elle ne peut pas être appliquée aux nouvelles molécules. Le coût est élevé.

III - LES RESULTATS

Le tableau de la page suivante résume l'activité "in vitro" des 5 antibiotiques vis-à-vis de P.g., P.i., F.n., C.r. et P.m. par les trois méthodes sélectionnées.

Une interprétation globale des résultats montre que les antibiotiques les plus efficaces sont les bêta-lactamines et les tétracyclines suivis de l'érythromycine et le métronidazole. Parfois les taux de résistances au métronidazole étaient supérieures ou égales à 64 µg/ml notamment pour *Porphyromonas gingivalis* et *Pepto-strepto-*

coccus micros (par la méthode de dilution en milieu liquide).

La comparaison des C.M.I. obtenues avec chacune de ces méthodes montre qu'il existe une corrélation dans les résultats. Les C.M.I. déterminées par la mesure des diamètres des zones d'inhibition correspondent aux C.M.I. déterminées en milieu liquide et par la méthode ATB ANA. Lorsque les diamètres des zones d'inhibition sont importantes, les C.M.I. en milieu liquide sont faibles et nous observons une culture négative avec la méthode ATB ANA.

IV - CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer qu'il existe une étroite corrélation dans les résultats observés avec les trois approches à condition de ne pas dépasser une durée de croissance des bactéries anaérobies strictes sur gélose de 72 heures. Si ce délai est dépassé, des aberrations de lecture peuvent apparaître. La plupart des laboratoires, pour des raisons économiques et en raison du nombre de bactéries isolées ne peuvent tester en routine, les sensibilités aux antibiotiques des anaérobies par une méthode de référence. La technique de diffusion en milieu solide a donné de bons résultats que nous vérifions par les méthodes de références lorsque nous avons des problèmes d'interprétation. Cette méthode, par sa simplicité, sa facilité et sa rapidité de réalisation constitue une technique de choix en bactériologie clinique.

RESUME

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies strictes à croissance lente est délicate en raison de considérations techniques qui rendent difficiles la transposition de méthodes classiques utilisées dans des laboratoires de microbiologie. Les trois principales méthodes de détermination de la sensibilité aux antibiotiques sont: l'antibiogramme par technique de diffusion, la méthode de dilution en milieu liquide, la galerie ATB ANA (bioMérieux).

Cette étude a pour objectif de comparer l'efficacité de chacune de ces méthodes à partir de bactéries anaérobies strictes isolées dans la flore sousgingivale de patients atteints de parodontites évolutives (parodontite à progression rapide, parodontite réfractaire, parodontite chronique de l'adulte). Les bactéries étudiées sont : *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*. Les molécules d'antibiotiques testées sont : ampicilline, amoxicilline, tétracycline, érythromycine, métronidazole.

La comparaison des concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) obtenues avec chacune de ces méthodes a permis de montrer une étroite corrélation dans les résultats observés avec ces trois approches à condition de ne pas dépasser une durée de croissance des bactéries anaérobies strictes sur milieu gélosé de 72 heures.

Mots clés : *Antibiotiques, concentration minimale inhibitrice (C.M.I.), bactéries anaérobies strictes.*

Etude comparative...

ABSTRACT

The study on the sensitiveness of slow-growing anaerobes bacteria to antibiotics is delicate when you consider the technical motives that make it difficult to transpose the standart methods frequently used in microbiological laboratories. The three main methods used to determine susceptibility to antibiotics are: disk-diffusion test, antibiotics containing microdilution plates and ATB ANA (bioMérieux).

The aim of this study is to compare the effectiveness of each of these methods on severe anaerobes bacteria isolated in sub-gingival flora of patients suffering from developing periodontitis (rapidly progressive periodontitis, refractory periodontitis, active stage of adult chronic periodontitis). The observed bacteria are : Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Campylobacter rectus, Peptostreptococcus micros. Antibiotics used are : ampicilline, amoxicilline, tetracycline, erythromycine, metronidazole.

The comparison of the minimal inhibitory concentrations (M.I.C) of each of these methods has permitted to show a strict correlation in the results observed with these three methods, if only the growth of the severe anaerobes bacteria on agar medium does not exceed 72 hours.

Key words : Antibiotics, minimal inhibitory concentration, severe anaerobes bacteria

Résultats de 5 souches par espèce en fonction de la méthode

Souches	Diamètres des zones d'inhibition sur gélose (mm)					C.M.I. en milieu liquide				ATB ANA Culture positive = +, négative = -				
	AM	AMX	TE	E	ME	AM	TE	E	ME	AMX	TE	E	ME	
P.g	1	21	24	19	6	6	2	2	16	-	-	-	-	+
	2	32	24	25	20	16	0,25	1	2	4	-	-	-	-
	3	40	40	35	12	6	0,25	0,25	8	> 64	-	-	+	+
	4	22	21	14	10	16	1	16	16	> 64	-	+	+	+
	5	28	27	29	20	8	2	2	4	32	-	-	-	+
P.i	1	30	35	29	24	17	0,25	1	1	4	-	-	-	-
	2	12	10	21	17	10	16	4	2	32	+	-	-	+
	3	26	26	25	21	19	1	1	1	2	-	-	-	-
	4	30	29	29	20	6	0,5	0,5	1	> 64	-	-	-	+
	5	22	23	25	20	8	1	1	1	32	-	-	-	+
F.n	1	19	17	22	8	21	4	2	64	2	-	-	+	-
	2	18	20	24	14	19	8	2	32	4	-	-	+	-
	3	24	23	23	16	20	4	2	32	2	-	-	+	-
	4	14	13	21	17	12	16	2	32	8	+	-	-	+
	5	12	12	21	10	16	16	2	64	4	+	-	-	+
C.r	1	25	26	22	19	6	4	2	4	> 64	-	-	-	+
	2	23	25	21	17	19	2	2	32	4	-	-	-	-
	3	29	30	25	19	21	1	1	4	4	-	-	-	-
	4	35	35	30	21	20	0,5	0,5	4	4	-	-	-	-
	5	26	25	30	20	17	1	2	4	32	-	-	-	-
P.m	1	19	21	14	19	6	4	16	4	> 64	-	-	-	+
	2	15	17	16	20	8	8	16	4	64	+	+	-	+
	3	19	22	14	16	12	4	16	8	64	-	-	+	+
	4	22	21	12	19	10	2	16	4	64	-	+	-	+
	5	25	24	17	20	14	1	8	4	32	-	-	-	+

BIBLIOGRAPHIE

1 - DUBREUIL L.
Méthodes d'études de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies stricts.
Rev. Franç. Lab. 1993 : 256 : 91 - 98.
2 - SIXOU M., KONE D., DUFFAUT-LAGARRIGUE D., LODTER J. Ph. et BERDOULAT C.
Etude in-vitro de la sensibilité aux antibiotiques des principales

bactéries impliquées dans l'étiologie des parodontites chez l'homme.
J. Parodontol., 12: 257 - 263, 1993.
3 - VAN WINKELHOFF A. J., PAVICIC M. J. A. M. et DE GRAFF J.
Commentaires sur la technique utilisée dans les tests de susceptibilité aux antibiotiques des micro-organismes pathogènes parodontaux.
J. Parodontol., vol. 13, n° 1: 87-90, 1994