

Une méthode rapide pour l'appréciation de la sensibilité microbienne aux antibiotiques

(A propos de la flore microbienne de 50 otites moyennes de l'adulte
traitées à la pénicilline)

par A. PAQUAY et Ch. JEUNIAUX,

Institut d'Hygiène de l'Université de Liège (Professeur J. van Beneden)

Depuis l'introduction des antibiotiques en thérapeutique, les Oto-Rhino-Laryngologistes ont employé, avec plus ou moins de succès, pour le traitement des otites, ces armes nouvelles mises à leur disposition. Cherchant à uniformiser les traitements, certains auteurs ont étudié l'effet d'un antibiotique utilisé systématiquement. Il est acquis, notamment, depuis les travaux de Nielsen (1951-1952) ⁽¹⁾, que l'administration de pénicilline est efficace dans la plupart des otites aiguës des jeunes enfants. En effet, ces otites sont, dans la plupart des cas, des infections à *Streptococcus pyogenes*, à *Hemophilus influenzae* (bacille de Pfeiffer), ou à *Diplococcus pneumoniae* (pneumocoque), plus rarement à *Staphylococcus*. Les souches de ces espèces, isolées à partir des otites purulentes de l'enfance, sont presque toujours sensibles à la pénicilline.

Il n'en est pas de même dans le cas des otites de l'adulte, chroniques ou même aiguës, où l'emploi systématique d'un antibiotique conduit à de nombreux échecs. Ces derniers sont dus, d'abord, au fait que les otites chroniques sont souvent entretenues (sinon causées) par des bacilles Gram-négatifs (genres *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* ou *Salmonella*), qui ne sont presque jamais sensibles à la pénicilline et dont la sensibilité aux autres antibiotiques est très variable. Ils sont attribuables, d'autre part, à l'existence en nombre croissant de souches microbiennes résistantes à tel antibiotique auquel elles paraissent primitivement sensibles.

En l'absence d'indications fournies par le laboratoire, le médecin spécialiste sera amené

à adopter l'une des deux attitudes suivantes : soit, prescrire systématiquement la pénicilline d'abord, en étant prêt à changer d'antibiotique deux ou trois fois si nécessaire, en cas d'échec (jusqu'à ce qu'un agent efficace soit mis en évidence, ou qu'une intervention chirurgicale soit devenue nécessaire), soit, utiliser systématiquement le plus récent des antibiotiques à large spectre antimicrobien. Ce faisant, il ne fera preuve ni de sens critique, ni de souci d'économie.

Il est évident que, même dans la pratique courante, il est indispensable de déterminer la sensibilité de la flore microbienne d'une otite purulente. Cependant, les techniques classiques de détermination des sensibilités microbiennes, impliquant successivement l'isolement préalable des germes, leur identification et leur obtention en culture pure, exigent un délai de 48 à 72 heures au minimum et ce, entre le moment où le médecin se propose d'agir et celui où la réponse du laboratoire lui permet de faire un choix raisonné du traitement. D'autre part, et surtout pour les otites chroniques, l'examen du laboratoire révélera souvent la présence de plusieurs espèces microbiennes, de sensibilité différente, sans qu'aucun élément n'indique habituellement leur importance relative dans l'évolution de l'infection.

Nous avons donc cherché à appliquer aux flores microbiennes des otites moyennes la méthode des « tests directs », que nous croyons originale, en tout cas dans son application en oto-rhino-laryngologie. Son principe est identique à celui de la technique largement en usage pour la détermination directe de la sensibilité des bacilles de Koch à la streptomycine. Le but du présent travail est de montrer que cette méthode « directe » fournit des résultats aussi précis que la méthode

⁽¹⁾ Nielsen (*Acta Oto-Rhino-Laryngologica*, Stockholm, juin 51-décembre 51-juin 52).

« indirecte » classique, tout en offrant des avantages, le principal étant assurément sa plus grande rapidité ⁽¹⁾.

*Description de la méthode directe
pour la détermination des sensibilités microbiennes
aux antibiotiques*

Le pus qui s'écoule de l'oreille, paracentésée ou non, est recueilli aseptiquement au moyen d'un fil de platine recourbé en une anse terminale. Stérilisé à la flamme et refroidi, le fil est poussé, sous le contrôle de la vue, au contact intime de la perforation tympanique; un speculum stérile empêche toute souillure contre les parois du conduit auditif.

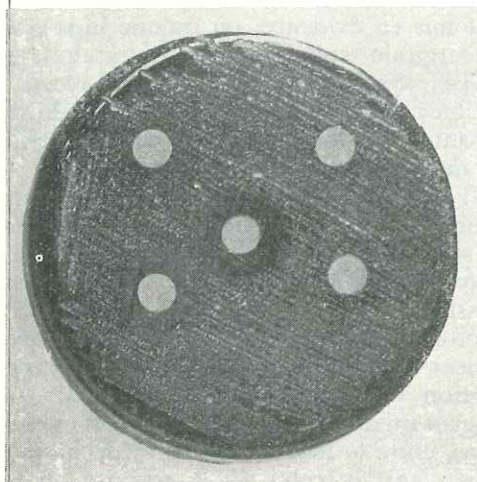


FIG. 1. — (Cliché J. Herman. Institut d'Hygiène).

Le pus ainsi prélevé est aussitôt ensemencé à la surface des milieux de culture gélosés, préalablement coulés en boîtes de Pétri (une boîte de bouillon gélosé et deux de bouillon gélosé au sang). Insistons sur le fait que ces milieux de culture sont à portée de notre main, ce qui nous permet de procéder, sans aucun retard, à la mise en culture, en évitant ainsi toute modification qualitative ou quantitative de la flore.

Sur une première boîte de gélose au sang, on procède à l'isolement classique des germes,

⁽¹⁾ La méthode directe décrite ici est employée actuellement (en collaboration avec A. Nicolas) pour la détermination de la sensibilité microbienne dans des cas de sinusites. Ces recherches feront l'objet d'un prochain travail.

par ensemencement jusqu'à épuisement de l'inoculum. Sur les deux autres boîtes, le pus est étalé plus ou moins abondamment de façon à obtenir, après incubation, un semis de colonies rapprochées mais distinctes (la richesse relative du pus est aisément appréciée au préalable par examen microscopique). Ensuite on dépose sans retard les « pastilles » antibiotiques (de l'Institut Pasteur de Paris) ou, ce qui permet d'utiliser des boîtes de Pétri de diamètre réduit, des « confettis » de papier filtre, de huit millimètres de diamètre. Ces derniers sont préalablement stérilisés à l'autoclave et extemporanément imbibés de la solution d'antibiotique ⁽¹⁾. Les diverses solutions d'antibiotiques sont conservées à -10° ou -15° C. Pour chaque série de tests de sensibilité, on teste l'activité antibiotique des solutions sur un staphylocoque sensible, souche H d'Oxford. Nous nous sommes limités à la détermination de la sensibilité aux cinq antibiotiques suivants : Pénicilline, Streptomycine, Terramycine, Chloromycétine et Auréomycine.

Après 24 heures d'incubation à 37° , on mesure le diamètre de la zone d'inhibition entourant chaque « confetti ». Cette mesure permet d'apprécier la sensibilité de la flore microbienne et de la qualifier de « sensible », « peu sensible », ou « résistante ». Il ne s'agit pas, en effet, d'une mesure réelle de la sensibilité, qui ne peut être obtenue que par la méthode des dilutions, mais bien d'une évaluation par comparaison.

Ce test direct permet de déterminer immédiatement le ou les antibiotiques dont l'action est efficace sur la flore mono- ou même polymicrobienne.

Si l'otite est monomicrobienne, la lecture est particulièrement aisée : dans l'exemple représenté à la figure 1, ci-dessus, le germe unique est résistant à la pénicilline, à la streptomycine et à la chloromycétine; par contre, il est sensible à l'aureomycine (disque central) et à la terramycine (disque placé en bas et à gauche).

Si l'otite est polymicrobienne, le test direct révèle cependant immédiatement les antibiotiques efficaces sur l'ensemble de la

⁽¹⁾ Ces « confettis » sont utilisés pour la détermination de la sensibilité microbienne aux antibiotiques par le Laboratoire Provincial de Bactériologie (Directeur : P. Fredericq).

flore. Dans l'exemple considéré (voir fig. 2 ci-dessous), les deux germes, l'un poussant en colonies épaisses, l'autre en colonies plus petites, sont sensibles à l'auroomycine (au centre) et à la terramycine (à droite et en haut). Un examen plus minutieux permet de préciser ensuite la sensibilité spécifique des différents types microbiens. Observons dans l'exemple de la figure 2, que les deux germes sont de sensibilité différente vis-à-vis de la chloromycétine (à droite et en bas), en étant tous deux résistants à la pénicilline (à gauche et en haut) et à la streptomycine (à gauche et en bas).

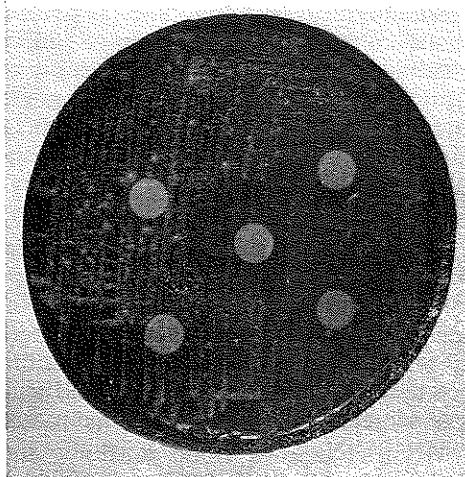


FIG. 2. — (Cliché J. Herman, Institut d'Hygiène).

Ultérieurement, il convient de dénombrer soigneusement les colonies appartenant à ces différents types et de procéder à leur identification.

En ce qui concerne l'isolement réalisé sur la première boîte de Pétri, il révélera éventuellement la présence d'espèces microbiennes qui ne seraient pas apparues sur les boîtes destinées au test direct. En fait, cette éventualité n'a été rencontrée qu'une seule fois sur cinquante observations.

En résumé, la réponse fournie par la méthode directe, 24 heures déjà après le prélèvement et l'étalement du pus, nous donne non seulement la sensibilité « globale » de la flore microbienne (que l'on peut apprécier par un simple coup d'œil), mais aussi le nombre d'espèces constituant cette flore, leur nature présumée, leur proportion numérique et leur sensibilité propre (fig. 2).

Justification et contrôle de la méthode directe

1. Nous avons recherché les causes d'erreur que pourraient entraîner, dans la méthode directe, les effets de l'inhibition d'une espèce sous l'action antibiotique d'une autre, ou les conséquences de l'envahissement d'une espèce allant jusqu'à « masquer » le développement d'une ou de plusieurs autres. Nous avons mélangé en proportions variables et cultivé simultanément plusieurs souches isolées à partir de pus d'otite.

a) Aucune action antibiotique n'a été observée de la part des germes pathogènes ou saprophytes, sauf de la part de *Pseudomonas aeruginosa*.

b) Sous le voile bactérien continu mais peu opaque de certaines espèces à croissance envahissante (du genre *Proteus* ou *Pseudomonas*), les colonies des autres espèces microbiennes, non seulement n'ont pas été inhibées, mais ont pu être repérées par un examen attentif. Dans la pratique, il a toujours été aisé d'apprécier la sensibilité des espèces microbiennes accompagnant *Proteus sp.* Quant aux rares pus à *Pseudomonas aeruginosa*, ils se sont toujours révélés monomicrobiens.

2. Nous avons comparé la sensibilité des germes, appréciée par les deux méthodes simultanément, à partir des mêmes pus. Sauf dans un seul cas (une *Escherichia coli* dont les colonies étaient sensibles à la streptomycine dans le test direct, mais résistantes dans le test indirect), tous les résultats obtenus par notre méthode ont parfaitement concordé avec ceux des tests indirects.

3. On sait enfin qu'un ensemencement trop massif peut influencer le comportement de la flore microbienne vis-à-vis des antibiotiques (rétrécissement de la zone d'inhibition). Il est donc nécessaire, dans la méthode directe, de se rendre compte préalablement (par frottis et examen microscopique) de la richesse en germes du pus, afin de procéder ensuite à un ensemencement quantitativement correct.

Avantages présentés par notre méthode directe.

1. L'avantage principal réside dans la rapidité de la méthode. Le résultat qui intéresse le médecin pour l'application du traitement (c'est-à-dire d'une part la sensibilité de l'ensemble de la microflore, d'autre part la

spécifique des germes) peut en donner 24 heures après le prélèvement.

À l'occasion de chaque examen bactériologique, on procède non seulement à un examen destiné au test direct, mais aussi à un isolement permettant d'identifier les différentes espèces présentes, ainsi que nous l'avons déjà expliqué.

En outre, nous avons constaté, à plusieurs reprises, que la culture soumise au test direct en présence d'une espèce bactérienne couramment courante n'avait pas pu mettre en évidence.

Les deux espèces microbiennes, l'une à croissance relativement lente et présente en faible proportion (10 à 30 %), l'autre à croissance envahissante et numériquement dominante (à 90 %). Dans la méthode d'isolement habituelle, le germe à croissance lente est souvent masqué dans la culture envahissante. Au contraire, dans notre méthode, lorsque le germe envahissant est sensible et l'autre résistant à un même antibiotique (en l'occurrence streptomycine), ce dernier germe est bien visible dans la « fenêtre » créée par la zone d'inhibition du résistant.

Dans la méthode indirecte, une seule culture est prélevée au hasard après l'isolement soumise au test : sa sensibilité sera le reflet de la descendance d'un seul des germes se trouvant réellement dans le pus. La méthode que nous recommandons est donc à la fois directe non seulement par définition mais encore par le résultat qu'elle permet d'obtenir. Les microbes prélevés dans l'oreille sont étalés sur la boîte et sont tous soumis au test. De la sorte, s'il y a des différences de sensibilité *in vivo*, ces différences seront mises en évidence.

Tests cliniques. — Evolution de 50 otites aiguës et chroniques de l'adulte, discutée en fonction des indications des « tests directs ». Dans notre travail (A. Paquay, 1954) a donné, dans une publication antérieure (1), la statistique des espèces bactériennes observées dans 50 cas d'otites aiguës et chroniques, en fonction de leur sensibilité. Quelques conclusions sur

la valeur théorique des différents antibiotiques ont été déduites. Enfin l'intérêt qu'il y a à noter la proportion relative des différentes espèces dans chaque flore microbienne et le rôle prépondérant joué par l'espèce numériquement dominante dans la pathogénie de l'otite ont été soulignés.

Nous résumerons, dans ce travail, les principales constatations faites au cours du traitement de ces 50 otites.

Suivant un plan clinique d'étude justifié dans le travail précité (A. Paquay, l.c.), nous avons administré systématiquement de la pénicilline par voie locale et générale, quelle que soit l'indication du test de sensibilité. Ce traitement à la pénicilline a permis la guérison complète de 27 cas sur 50 (guérison non suivie de récurrence pendant 10 mois environ); 5 autres cas ont montré une guérison momentanée suivie de récurrence quelques dizaines de jours plus tard; 17 cas ont abouti à un échec complet malgré l'administration de pénicilline pendant une moyenne de sept jours; un cas, enfin, a été soigné d'emblée à la chloromycétine.

1. *Succès complets de la pénicilline.* — Dans 23 cas sur 27, la guérison après traitement à la pénicilline concorde parfaitement avec les indications des tests de sensibilité. Ces 27 cas se répartissent, en effet, comme suit :

a) 6 otites aiguës dont la flore, monomicrobienne ou non, était sensible à la pénicilline.

b) 6 otites chroniques dont la flore était constituée de plusieurs espèces différentes, mais toutes sensibles à la pénicilline.

c) 11 otites aiguës ou chroniques dont les espèces microbiennes présentaient des sensibilités différentes à la pénicilline. Parmi ces 11 cas et sans exception, l'espèce ou les espèces sensibles à la pénicilline avaient un caractère pathogène indiscutable et étaient numériquement dominantes dans le pus (*Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *S. citreus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. faecalis*). D'autre part, les espèces résistantes à la pénicilline étaient, sinon réputées saprophytes (*Corynebacterium sp.* autre que *C. diphtheriae*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*), en tout cas numériquement peu abondantes (moins de 30 % des germes).

d) Enfin, dans 4 cas seulement, nous avons obtenu la guérison après traitement à la

Oto-rhino-laryngologica Belgica, 1954. Utilité de la sensibilité aux antibiotiques de la flore microbienne des otites (50 cas).

pénicilline, alors que la flore microbienne était constituée de germes résistants à cet antibiotique (*Staphylococcus albus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium sp.* et *Pseudomonas aeruginosa*). Ces guérisons sont attribuables aux concentrations très élevées d'antibiotique administrées *in loco*, par instillation de solutions fortes de pénicilline (20.000 u. par cc.).

2. *Guérisons suivies de récédives.* — Dans 5 cas sur 50, nous avons obtenu, après traitement à la pénicilline, une guérison momentanée suivie de récédive 10 à 50 jours après la guérison. Dans un cas seulement, le test de sensibilité ne permettait pas de prévoir la récédive, les deux espèces microbiennes en cause étant sensibles à la pénicilline. Dans les 4 autres cas, la flore microbienne était résistante à la pénicilline; la sédation avait semblé paradoxale et ne fut en fait que passagère.

Pour assurer le traitement ultérieur de ces récédives, 2 de ces otites furent traitées directement par la chloromycétine qui semblait indiquée par les tests. La guérison fut définitive dans le premier cas mais le deuxième cas fut suivi de deux rechutes.

Dans les 3 dernières otites, nous avons administré de la streptomycine, malgré la résistance à cet antibiotique. Le traitement par la streptomycine pendant 5 à 8 jours resta sans effet. Nous avons alors utilisé la chloromycétine à laquelle les germes numériquement dominants étaient sensibles (*Staphylococcus albus* et *aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium sp.* en culture pure). La guérison fut complète et définitive.

Le compte rendu un peu détaillé de ces derniers cas souligne également l'intérêt pratique des tests de sensibilité.

3. *Échecs complets de la pénicilline.* — L'échec complet enregistré pour les 17 derniers cas, après 7 jours de traitement à la pénicilline, s'explique sans difficulté si l'on tient compte de la sensibilité des espèces microbiennes isolées :

a) Dans 13 cas, là où les espèces présentes dans le pus étaient toutes résistantes à la pénicilline (4 otites aiguës à *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* et *Escherichia coli*, dominants; 9 otites chroniques à *Proteus vulgaris* et *Escherichia coli* dominants).

Après échec du traitement par l'antibiotique qui d'ailleurs n'était pas indiqué par les tests (pénicilline), l'administration de l'antibiotique de choix fut couronnée de succès (streptomycine dans deux cas, streptomycine et chloromycétine dans deux autres cas, chloromycétine localement dans 9 cas). Un seul échec fut enregistré : il s'agit d'une otite chronique datant de l'enfance, à *Escherichia coli*, otite qui évolua en mastoïdite et nécessita l'intervention chirurgicale.

b) Dans les 4 autres cas (chroniques), nous avons trouvé une flore polymicrobienne dont certains germes étaient sensibles à la pénicilline mais dont les espèces dominantes (appartenant aux genres *Proteus*, *Alcaligenes*, *Salmonella* et *Corynebacterium*) étaient toutes résistantes à cet antibiotique. Après échec prévisible de la pénicilline, l'administration de l'antibiotique de choix, actif sur l'ensemble de la flore (chloromycétine), a entraîné leur guérison rapide, sans récédive ultérieure (10 mois de recul).

En ce qui concerne les otites dues à des germes numériquement dominants et résistants à la pénicilline, l'échec du traitement par cet antibiotique rend donc plus spectaculaire et plus significative la guérison rapide par l'antibiotique de choix (chloromycétine dans nos observations).

Résumé

Pour répondre aux exigences du traitement clinique rationnel des otites aiguës ou chroniques de l'adulte, nous proposons une méthode « directe » de détermination de la sensibilité microbienne aux antibiotiques. Cette méthode, aussi précise que la méthode courante, offre, entre autres avantages, celui d'être extrêmement rapide; avantage que le clinicien appréciera au premier chef.

Nous avons discuté l'évolution clinique de 50 otites aiguës et chroniques de l'adulte pour lesquelles il fut administré systématiquement de la pénicilline en premier lieu, puis, en cas d'échec, l'antibiotique de « choix » indiqué par les examens de laboratoire. Dans la grande majorité des cas, nous avons vérifié la concordance frappante entre les résultats cliniques et les prévisions bactériologiques.