



**EUCAST**

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease:

# **Détermination de la sensibilité aux antibiotiques**

## **Méthode EUCAST de diffusion en gélose**

**Version 4.0**

**Juin 2014**

| <b>Sommaire</b> |  | <b>Page</b> |
|-----------------|--|-------------|
|                 | Modifications des documents                              |             |
|                 | Abréviations et terminologie                             |             |
| 1               | <a href="#">Introduction</a>                             | 4           |
| 2               | Préparation et stockage des milieux                      | 5           |
| 3               | <a href="#">Préparation de l'inoculum</a>                | 7           |
| 4               | Inoculation des géloses                                  | 9           |
| 5               | Dépôt des disques imprégnés d'antibiotiques              | 10          |
| 6               | Incubation des géloses                                   | 11          |
| 7               | <a href="#">Examen des boîtes après incubation</a>       | 13          |
| 8               | Mesure des zones d'inhibition et catégorisation clinique | 15          |
| 9               | Contrôle de qualité                                      | 18          |
|                 | Annexe A   |             |

## Amendements aux documents

| Version | Amendement  | Date          |
|---------|---|---------------|
| 4.0     | <b>Section 2.7: Nouvelle section sur le stockage et la manipulation des boîtes MH-F</b>   | Juin 2014     |
| 4.0     | <b>Tables 1 and 3:</b> <i>Corynebacterium</i> spp. ajouté.  | Juin 2014     |
| 4.0     | <b>Section 5.3.1:</b> Placement des disques pour détecter la résistance inductible à la clindamycine chez les streptocoques (révisé). | Juin 2014     |
| 3.0     | <b>Sections 2.1 and 2.4:</b> Précisions concernant la préparation et le stockage des milieux  | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Tables 1 and 3:</b> Ajout de <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i> .                        | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Section 3.2.2:</b> Précisions concernant l'emploi des étalons de turbidité   | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Section 4.1:</b> Précisions concernant l'emploi des suspensions bactériennes   | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Section 5.3:</b> Précisions concernant le nombre de disques sur chacune des boîtes de Petri  | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Section 5.3.1:</b> Nouveau paragraphe. Détection de la résistance inductible à la clindamycine: placement des disques              | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Section 8.8.2:</b> Information sur la lecture des zones d'inhibition du cotrimoxazole pour <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .   | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Tableau 4:</b> Ajout de la souche de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560.   | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Tableau 5:</b> Numérotation de <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 dans les collections DSM and CCUG.                                    | Juin 2013     |
| 3.0     | <b>Annexe A:</b> Nouvelle section. Méthodologie en diffusion sur gélose EUCAST pour <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i> .   | Juin 2013     |
| 2.1     | <b>Sections 8:</b> Changement de numérotation Nouvelles/changements sections: 8.1 et 8.4.   | Février 2012  |
| 2.0     | <b>Section 2.2:</b> Précisions sur la profondeur de la gélose.  | Janvier 2012  |
| 2.0     | <b>Tableaux 1 &amp; 3:</b> Nouvelle terminologie (streptocoques du groupe viridans). <i>Listeria monocytogenes</i> ajouté.            | Janvier 2012  |
| 2.0     | <b>Section 8:</b> Changement de numérotation Nouvelles/changements sections: 8.1, 8.7, 8.7.3, 8.7.4, 8.7.6, 8.7.9 et 8.7.10.          | Janvier 2012  |
| 2.0     | <b>Tableau 5:</b> <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 et <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 ajoutés.  | Janvier 2012  |
| 2.0     | <b>Tableaux 4 &amp; 5 and Abréviations:</b> Numérotation de souches de la collection espagnole ajoutée                                | Janvier 2012  |
| 1.0     | Première édition  | Décembre 2009 |

## Abréviations et terminologie

|                |  |
|----------------|--|
| ATCC           | American Type Culture Collection<br><a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>  |
| BLNAR          | Résistance à l'ampicilline sans production de $\beta$ -Lactamase,  |
| CCUG           | Culture Collection University of Göteborg<br><a href="http://www.ccug.se">http://www.ccug.se</a>   |
| CECT           | Colección Española de Cultivos Tipo.<br><a href="http://www.cect.org">http://www.cect.org</a>  |
| CIP            | Collection de souches de l'Institut Pasteur<br><a href="http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html">http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html</a>               |
| DSM            | Bacterial cultures from Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) have DSM numbers<br><a href="http://www.dsmz.de/index.htm">http://www.dsmz.de/index.htm</a> |
| BLSE           | $\beta$ -lactamase à spectre élargi  |
| EUCAST         | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing<br><a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a>  |
| MH             | Gélose de Mueller-Hinton   |
| MH-F           | Gélose de Mueller-Hinton agar pour bactéries à croissance lente (MH additionné de 5% de sang de cheval défibriné et de 20 mg/L de $\beta$ -NAD)  |
| SARM           | <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (possédant le gène <i>mecA</i> ou <i>mecC</i> )   |
| NCTC           | National Collection of Type Cultures<br><a href="http://www.hpacultures.org.uk">http://www.hpacultures.org.uk</a>  |
| $\beta$ -NAD   | $\beta$ -Nicotinamide adénine dinucléotide   |
| Solution salée | Solution aqueuse à 0.85% NaCl  |
| U.F.C.         | Unités formant colonies  |

**1****Introduction**

La méthode de diffusion est l'une des plus vieilles approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle convient pour la majorité des bactéries pathogènes incluant les bactéries à croissance lente ; elle permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier. Comme la plupart des techniques de diffusion en gélose, la méthode de l'EUCAST est standardisée, se fonde sur les principes définis dans le rapport de l'International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing, 1972 mais aussi sur l'expérience des experts du monde entier.

Les diamètres critiques de la méthode EUCAST sont établis en fonction des concentrations critiques européennes publiées par EUCAST et accessibles gratuitement sur le site de l' EUCAST (<http://www.eucast.org>).

Comme dans toute méthode, les techniques décrites doivent être suivies sans aucune modification, de façon à obtenir des résultats corrects.

| 2   | Préparation et stockage des milieux  |
|-----|--|
| 2.1 | Préparer la gélose de MH selon les indications du fabricant en ajoutant, pour les bactéries à croissance lente, les suppléments pour la gélose au sang MH-F comme indiqué dans le Tableau 1. La préparation et l'addition des suppléments sont décrits en détail : <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> . |
| 2.2 | L'épaisseur de la gélose doit être de 4 mm ± 0.5 mm (approximativement 25 mL pour une boîte ronde de 90 mm de diamètre, 31 mL pour une boîte ronde de 100 mm, 71 mL pour une boîte ronde de 150 mm de diamètre et 40 mL pour une boîte carrée de 100 mm.   |
| 2.3 | La surface de la gélose doit être séchée avant emploi. Les conditions de séchage et de conservation des milieux fabriqués au laboratoire sont fonction de l'équipement du laboratoire et doivent être déterminées localement. Les boîtes ne doivent pas être desséchées.   |
| 2.4 | Conserver les boîtes préparées au laboratoire à 8-10°C. Si elles sont conservées au delà de 7 jours, les conserver à 4-8°C en sachet plastique scellé.   |
| 2.5 | Les conditions de séchage et de conservation des milieux fabriqués au laboratoire sont fonction de l'équipement du laboratoire et doivent être déterminées localement dans le cadre du programme d'assurance qualité.  |
| 2.6 | Il convient de suivre les recommandations du fabricant pour le mode de conservation des géloses prêtes à l'emploi. Les utiliser avant péremption.  |
| 2.7 | Avec les géloses MH-F <sup>1</sup> (maison ou prêtes à l'emploi) stockées en sacs plastique ou en containers scellés, il est nécessaire de sécher les boites avant usage. Ceci afin d'éviter un excès d'humidité, qui peut conduire à des problèmes de zones floues ou de voiles dans les zones d'inhibition.                  |

<sup>1</sup> MH + 5% sand de cheval défibriné mécaniquement + 20 mg/L β-NAD

| <b>Tableau 1</b>                              |  | <b>Milieux de détermination la sensibilité des bactéries aux antibiotiques</b> |
|---|--|--|
| <b>Organisme</b>                              | <b>Milieu</b>                            |  |
| Entérobactéries                               | Gélose de Mueller-Hinton                 |  |
| <i>Pseudomonas</i> spp.                       | Gélose de Mueller-Hinton                 |  |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>           | Gélose de Mueller-Hinton                 |  |
| <i>Acinetobacter</i> spp.                     | Gélose de Mueller-Hinton                 |  |
| <i>Staphylococcus</i> spp.                    | Gélose de Mueller-Hinton                 |  |
| <i>Enterococcus</i> spp.                      | Gélose de Mueller-Hinton                 |  |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>               | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |  |
| Streptocoques des groupes<br>A, B, C, G       | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |  |
| Streptocoques du groupe viridans              | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |  |
| <i>Haemophilus</i> spp.                       | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |  |
| <i>Moraxella catarrhalis</i>                  | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |  |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                 | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |  |
| <i>Pasteurella multocida</i>                  | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |  |
| <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i> | Gélose MH-F <sup>1</sup> (voir Annexe A) |  |
| <i>Corynebacterium</i> spp.                   | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |  |
| Autres bactéries à croissance lente           | Selon                                    |  |

<sup>1</sup> MH + 5% sang de cheval défibriné mécaniquement + 20 mg/L β-NAD

**3****Préparation de l'inoculum**

- 3.1 Utiliser la méthode de mise en suspension directement à partir des colonies en réalisant une suspension bactérienne en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland (Tableau 2), ce qui correspond à un inoculum d'environ  $1 \text{ à } 2 \times 10^8$  UFC/mL pour *Escherichia coli*. Cette méthode convient pour toutes les bactéries y compris à croissance lente dont : *Haemophilus* spp. *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques
- 3.1.1 Réaliser une culture sur milieu non sélectif, Le lendemain, prélever plusieurs colonies de même morphologie (si possible) afin d'éviter de sélectionner un variant atypique. Mettre ces colonies en suspension en milieu salé avec une öse stérile ou un écouvillon en coton.
- 3.2 La suspension bactérienne est standardisée à l'aide du témoin 0,5 McFarland. Un inoculum lourd engendre des diamètres plus petits et inversement.
- 3.2.1 Il est recommandé d'employer un spectrophotomètre pour ajuster l'inoculum. Cet appareil doit être calibré contre un étalon de la gamme de McFarland et ceci selon les recommandations du fabricant.
- 3.2.2 On peut également comparer à l'œil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland. Dans ce cas agiter vigoureusement l'étalon de turbidité sur un vortex avant usage. (certains étalons commerciaux sont gélifiés et ne doivent pas être agités; suivre les recommandations du fabricant). Pour faciliter la comparaison des deux échantillons, se placer face à un fond blanc avec des lignes noires.
- 3.2.3 Pour *Streptococcus pneumoniae* on préfère partir d'une gélose au sang et atteindre McFarland 0,5. Quand *S. pneumoniae* provient d'une gélose chocolat on prépare l'inoculum comparativement au tube 1 de McFarland.
- 3.2.4 Pour ajuster la densité bactérienne au tube 0,5 McFarland ajouter soit la solution salée soit les bactéries.
- 3.3 La suspension bactérienne doit être employée de façon optimale dans les 15 minutes sans jamais dépasser 60 mn.



| Tableau 2 | Préparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5  |
|-----------|---|
| 1         | Ajouter 0,5 mL d'une solution à 0,048 mol/L de $\text{BaCl}_2$ (1.175% p/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) à 99,5 mL d'une solution 0,18 mol/L (0.36 N) de $\text{H}_2\text{SO}_4$ (1% v/v) et agiter vigoureusement. |
| 2         | Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 to 0,13.   |
| 3         | Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.  |
| 4         | Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.   |
| 5         | Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un vortex.  |
| 6         | Renouveler l'étalon ou vérifier leur absorbance après 6 mois de conservation.   |
| 7         | Il convient de vérifier les étalons achetés dans le commerce en s'assurant que l'absorbance se situe dans les limites fixées.   |

| <b>4</b> | <b>Inoculation des géloses</b>   |
|----------|--|
| 4.1      | L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation. Son emploi doit être fait au plus tard dans les 60 minutes qui suivent sa préparation.   |
| 4.2      | Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et rejeter l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide sur l'écouvillon pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif. |
| 4.3      | Etaler l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose en écouvillonnant dans trois directions ou en utilisant un ensemenceur rotatif.   |
| 4.4      | Déposer les disques dans un délai de 15 minutes.<br>Si les boîtes sont abandonnées à la température du laboratoire trop longtemps avant le dépôt des disques la bactérie peut commencer à croître conduisant à une fausse diminution de la taille des zones d'inhibition.  |

| <b>5</b> | <b>Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique</b>  |
|----------|--|
| 5.1      | Les charges des disques sont indiquées dans les Tableaux où figurent les concentrations critiques et le contrôle de qualité. <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> .   |
| 5.2      | Déposer les disques fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée. Le contact avec la surface doit être étroit. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.   |
| 5.3      | Le nombre de disques déposés par boîte est limité du fait du chevauchement des zones d'inhibition et pour limiter les interférences entre les antibiotiques. Il est important que les diamètres des zones d'inhibition soient mesurables. Le nombre maximum de disques est fonction de la bactérie et des antibiotiques car certains donnent pour des souches sensibles, des zones très larges. Un maximum de six disques convient pour les boîtes rondes de 90 mm et douze pour celles de 150 mm. |
| 5.3.1    | Les disques d'érythromycine et de clindamycine doivent être placés à une distance de 12-20 mm bord à bord afin de détecter la résistance inductible à la clindamycine, chez les staphylocoques et 12-16mm bord à bord pour les streptocoques,  |
| 5.4      | La décharge des disques conduit à des zones d'inhibition réduites et constitue une source d'erreur habituelle. D'où :  |
| 5.4.1    | Conserver les disques y compris ceux en cartouches dans des conteneurs fermés avec un dessiccateur et à l'abri de la lumière (certains agents comme le métronidazole, le chloramphénicol et les fluoroquinolones sont inactivés en cas d'exposition prolongée à la lumière)  |
| 5.4.2    | Conserver les disques à -20°C sauf indication contraire du fabricant. Si cela n'est pas possible conserver les disques à une température inférieure à 8°C.   |
| 5.4.3    | Placer le matériel pour les tests à une température inférieure à 8°C.  |
| 5.4.4    | Pour éviter la condensation, laisser les disques revenir à la température ambiante avant d'ouvrir les cartouches.  |
| 5.4.5    | Ne pas utiliser les disques périmés  |

| <b>6</b> | <b>Incubation des boîtes de Petri</b>  |
|----------|--|
| 6.1      | Retourner les boîtes et dans les 15 mn qui suivent le dépôt des disques, les incubent. Si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies.  |
| 6.2      | L'empilement des boîtes dans l'étuve par les différences de température liées au système de chauffage et de ventilation peut affecter les résultats. L'efficacité des étuves est variable aussi le contrôle des paramètres de l'incubation y compris le nombre de boîtes par pile doivent être précisés et font partie du programme de l'assurance qualité du laboratoire. |
| 6.3      | Incuber les boîtes comme indiqué dans le Tableau 3.  |
| 6.4      | Pour les glycopeptides et certaines souches d'entérocoques les colonies résistantes n'apparaissent qu'après une période de 24 h pleine d'incubation. Il est possible d'effectuer la lecture après 16 à 20 h et de répondre que la souche est résistante ; en cas de sensibilité il y a lieu d'incuber à nouveau puis de lire à 24 h.                                       |

| <b>Tableau 3 Conditions d'incubation</b>      |   |
|---|---|
| <b>Organisme</b>                              | <b>Conditions d'incubation</b>  |
| Entérobactéries                               | 35±1°C en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Pseudomonas</i> spp.                       | 35±1°C en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>           | 35±1°C en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Acinetobacter</i> spp.                     | 35±1°C en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Staphylococcus</i> spp.                    | 35±1°C en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Enterococcus</i> spp.                      | 35±1°C en aérobiose 16 à 20 h<br>(35±1°C en aérobiose 24 h pour les glycopeptides)  |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>               | 35±1°C en présence de 4 à 6% CO <sub>2</sub> en aérobiose 16 à 20 h   |
| Streptocoques groupes A, B, C et G            | 35±1°C en présence de 4 à 6% CO <sub>2</sub> en aérobiose 16 à 20 h   |
| Streptocoques du groupe viridans              | 35±1°C en présence de 4 à 6% CO <sub>2</sub> en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Haemophilus</i> spp.                       | 35±1°C en présence de 4 à 6% CO <sub>2</sub> en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Moraxella catarrhalis</i>                  | 35±1°C en présence de 4 à 6% CO <sub>2</sub> en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                 | 35±1°C en présence de 4 à 6% CO <sub>2</sub> en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Pasteurella multocida</i>                  | 35±1°C en présence de 4 à 6% CO <sub>2</sub> en aérobiose 16 à 20 h   |
| <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i> | Voir Annexe A   |
| <i>Corynebacterium</i> spp.                   | 35±1°C en présence de 4-6% CO <sub>2</sub> en aérobiose 16-20 h. Les souches pour lesquelles la culture est insuffisante après 16-20h d'incubation sont réincubées immédiatement et les zones d'inhibition sont lues après 40- à 48 h d'incubation. |
| Autres bactéries à croissance lente           | Selon   |



|          |  |
|----------|--|
| <b>7</b> | <b>Lecture des boîtes après incubation</b>   |
| 7.1      | Un inoculum et un ensemencement corrects doivent conduire à une culture confluyente.                                   |
| 7.2      | La culture doit être répartie sur toute la surface de la gélose de façon à obtenir des zones d'inhibition circulaires. |
| 7.3      | La présence de colonies isolées indique que l'inoculum est trop faible. Refaire le test.                               |
| 7.4      | Vérifier que les diamètres des zones d'inhibition sont dans les limites du contrôle de qualité.                        |

| 8     | Mesure des zones d'inhibition et catégorisation clinique  |
|-------|---|
| 8.1   | La bordure de la zone d'inhibition doit être lue à l'œil nu et au niveau de la complète inhibition de la culture ; la boîte tant placée à 30 cm de l'œil.   |
| 8.2   | Lire les zones d'inhibition au dos des géloses <b>MH</b> sur fond noir éclairé par une lumière réfléchie.   |
| 8.3   | Lire les zones d'inhibition sur géloses <b>MH-F</b> directement face à la boîte, couvercle retiré, éclairée par une lumière réfléchie.  |
| 8.4   | Ne pas tenir les boîtes face à une lampe (lumière transmise) ni employer une loupe grossissante (sauf cas particulier (voir infra).   |
| 8.5   | Mesurer les diamètres des zones d'inhibition au millimètre le plus proche avec une règle, un pied à coulisse ou un système de lecture automatisé.   |
| 8.6   | Interpréter les diamètres des zones d'inhibition par référence aux Tableaux où figurent les concentrations critiques ( <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> .)   |
| 8.7   | Si des modèles sont employés pour interpréter les diamètres des zones d'inhibition les boîtes de Petri doivent être placées sur le modèle et les zones d'interprétation sur le modèle doivent correspondre aux concentrations critiques EUCAST. Vérifier que les concentrations critiques employées correspondent bien à la dernière version EUCAST. Un programme de préparation des modèles s'obtient gratuitement sur la toile : <a href="http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program">http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program</a>  |
| 8.8   | Recommandations particulières de lecture:   |
| 8.8.1 | S'il y a quelques colonies dans la zone d'inhibition elles devront être repiquées, identifiées et le test sera recommencé.  |
| 8.8.2 | <p>Pour les sulfamides et la triméthoprim, un antagonisme du au milieu peut conduire à des colonies minuscules autour du disque. Ce type de culture doit être ignoré et le diamètre de la zone d'inhibition mesuré là où la bordure est nette.</p> <p>Pour <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> et le cotrimoxazole, une culture substantielle peut apparaître dans la zone d'inhibition. Ignorer cette culture et ne considérer qu'il y existe une zone d'inhibition que si celle-ci est bien visible. Considérer qu'il n'y a pas de zone d'inhibition, si la culture se fait au contact du disque sans aucune zone d'inhibition.</p> |
| 8.8.3 | Pour les entérobactéries et l'ampicilline avec certains lots de MH, un fin film peut se produire à l'intérieur de la zone d'inhibition, ignorer ce film.  |
| 8.8.4 | Pour <i>E. coli</i> et mécillinam, ne pas tenir compte des colonies isolées au sein de la zone d'inhibition.  |
| 8.8.5 | Pour <i>Proteus</i> spp., ignorer l'étalement (swarming) et lire l'inhibition de la croissance.   |

- 8.8.6 Pour les staphylocoques et la pénicilline G, examiner la bordure de la zone proche d'une lumière transmise (boîte tournée vers la lumière). Des souches pour lesquelles le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur au diamètre critique mais dont la bordure n'est pas nette doivent être répondues résistantes.
- 8.8.7 Quand la détection de la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* est effectuée à l'aide d'un disque de céfoxitine, mesurer la zone d'inhibition et rechercher attentivement, sous un éclairage adéquat, la présence de colonies dans la zone d'inhibition. Il s'agit alors soit d'une contamination soit de l'expression de la résistance hétérogène à la méticilline.
- 8.8.8 Pour les staphylocoques et le linézolide lire au dos de la boîte placée face à la lumière (lumière transmise).
- 8.8.9 Pour les entérocoques et la vancomycine, inspecter la bordure de la zone d'inhibition, boîte face à la lumière (lumière transmise). Des bordures au contour peu net ou des colonies dans la zone d'inhibition doivent être examinées avec attention et sont parfois le seul signal évocateur d'une résistance à la vancomycine. Poursuivre l'investigation
- 8.8.10 Pour les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques sur gélose MH-F ne pas lire la zone d'hémolyse mais la zone d'inhibition. La zone d'hémolyse est généralement distincte de la zone de croissance tandis que pour les streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques les deux coïncident fréquemment.



**9****Contrôle de qualité**

- 9.1 Utiliser les souches du contrôle pour apprécier la performance globale du test (Tableau 4). Les souches recommandées sont des souches sensibles, mais des souches résistantes peuvent être également employées pour confirmer que la méthode détecte un mécanisme de résistance connue (Tableau 5). Ces souches s'achètent soit dans les collections soit dans le commerce.
- 9.2 Conserver les souches dans des conditions qui maintiennent à la fois leur vitalité et leurs caractéristiques. Une méthode pratique consiste à les conserver sur billes de verre à -70°C en bouillon glycérolé (ou équivalent commercial). Pour les bactéries autres que celles à croissance lente, on peut les conserver à -20°C. Deux tubes de chaque souche contrôle doivent être conservés, l'un est le tube « en cours » (en service) l'autre est le tube « archivé » pour fournir ultérieurement un nouveau tube en cours si besoin.
- 9.3 Chaque semaine, repiquer une bille du tube en cours sur un milieu non sélectif et vérifier la pureté. A partir de cette culture, préparer autant de tubes de repiquage que de jours de la semaine travaillés. Pour les bactéries à croissance lente qui ne survivront pas sur boîtes au delà de 5 à 6 jours, pratiquer un repiquage quotidien mais sans dépasser une semaine.
- 9.4 Les limites acceptables sont indiquées dans : <http://www.eucast.org>.
- 9.5 Utiliser les souches recommandées en routine pour vérifier la performance de l'essai. Les tests seront effectués quotidiennement au moins pour les antibiotiques utilisés en routine.  
Chaque jour réaliser le test et comparer les 20 derniers résultats consécutifs. Observer les tendances et en particulier les résultats constamment supérieurs ou inférieurs à la moyenne. Si au moins 2 tests sont hors limites, enquêter.
- 9.6 Le contrôle a lieu quotidiennement jusqu'à ce que la performance soit satisfaisante (pas plus d'un test sur 20 en dehors des limites) ; la fréquence du contrôle peut ensuite devenir hebdomadaire, Si la performance est mauvaise les causes doivent être recherchées.
- 9.7 En plus du contrôle de routine, il convient de tester tout nouveau lot de MH et de s'assurer que les zones d'inhibition sont dans les limites requises. Des divergences inacceptables s'observent avec les aminosides (variation du taux de cations divalents dans le milieu), tigécycline (variation de la concentration en magnésium, triméthoprime-sulfaméthoxazole (avec la concentration en thymine), érythromycine (pH inadéquat).

| <b>Tableau 4: Souches du contrôle de qualité en routine</b> |  |  |
|---|--|--|
| <b>Organisme</b>  | <b>Souche</b>  | <b>Caractéristiques de la souche</b>   |
| <i>Escherichia coli</i>                                     | ATCC 25922<br>NCTC 12241<br>CIP 7624<br>DSM 1103<br>CCUG 17620<br>CECT 434   | Sensible   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                               | ATCC 27853<br>NCTC 12934<br>CIP 76110<br>DSM 1117<br>CCUG 17619<br>CECT 108  | Sensible   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                                | ATCC 29213<br>NCTC 12973<br>CIP 103429<br>DSM 2569<br>CCUG 15915<br>CECT 794 | Faible production de $\beta$ -lactamase.   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                                | ATCC 29212<br>NCTC 12697<br>CIP 103214<br>DSM 2570<br>CCUG 9997<br>CECT 795  | Sensible   |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                             | ATCC 49619<br>NCTC 12977<br>CIP 104340<br>DSM 11967<br>CCUG 33638            | Intermédiaire à la Pénicilline G   |
| <i>Haemophilus influenzae</i>                               | NCTC 8468<br>CIP 5494<br>CCUG 23946  | Sensible   |
| <i>Campylobacter jejuni</i>                                 | ATCC 33560<br>NCTC 11351<br>CIP 702<br>DSM 4688,<br>CCUG 11284               | Sensible, souche sauvage,<br>Pour les conditions méthodologiques se<br>reporter à l'annexe A |

| <b>Tableau 5: Souches complémentaires du contrôle de qualité pour la détection de mécanismes de résistance spécifiques.</b> |  |   |
|---|--|---|
| <b>Organisme</b>  | <b>Souche</b>  | <b>Caractéristiques</b>   |
| <i>Escherichia coli</i>   | ATCC 35218<br>NCTC 11954<br>CIP 102181<br>DSM 5564<br>CCUG 30600<br>CECT 943 | β-lactamase TEM-1, résistant à l'ampicilline                                |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | ATCC 700603<br>NCTC 13368<br>CCUG 45421<br>CECT 7787                         | BLSE (SHV-18)   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | NCTC 12493   | Hétérorésistante à l'oxacilline, <i>mecA</i>                                |
| <i>Enterococcus faecalis</i>  | ATCC 51299<br>NCTC 13379<br>CIP 104676<br>DSM 12956<br>CCUG 34289            | Résistante à haut niveau aux aminosides et à la vancomycine ( <i>vanB</i> ) |
| <i>Haemophilus influenzae</i>   | ATCC 49247<br>NCTC 12699<br>CIP 104604<br>DSM 9999<br>CCUG 26214             | Résistance à l'ampicilline sans production de β-lactamase (BLNAR)           |

## Annexe A

### Méthode de diffusion en gélose pour *Campylobacter jejuni* et *C. coli*

On doit adhérer à la méthodologie ci-après (Tableau A1) quant on réalise le test selon la méthodologie EUCAST pour *Campylobacter jejuni* et *C. coli*.

| <b>Tableau A1</b>          | <b>Méthode de diffusion en gélose pour <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i></b>   |
|----------------------------|--|
| <b>Milieu</b>              | Gélose Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de cheval défibriné et 20 mg/L $\beta$ -NAD (MH-F)<br>Afin d'éviter l'envahissement par étalement de la culture les géloses MH-F devront être séchées (une nuit à 20-25°C, ou pendant 15 minutes à 35°C, couvercle retiré).  |
| <b>Inoculum</b>            | McFarland 0,5  |
| <b>Incubation</b>          | Atmosphère microaéroophile 41±1°C<br>24 heures<br><br>Après incubation, on doit obtenir une culture confluyente. Quelques souches de <i>C. coli</i> ne permettent pas d'obtenir ce résultat. Dans ce cas les boîtes de Petri sont immédiatement incubées à nouveau et la lecture des zones d'inhibition se fera après 40-48 h d'incubation.<br><br>La température de 41±1°C a été choisie afin d'obtenir les conditions les plus favorables à la culture des Campylobacters. |
| <b>Lecture</b>             | Les instructions EUCAST sont les suivantes:<br>Lire face aux boîtes MH-F, couvercle retiré et avec une lumière réfléchie. La limite de la zone d'inhibition correspond à l'inhibition complète de la culture à l'œil nu et lorsque la boîte de Petri est placée à 30 cm de l'œil.  |
| <b>Contrôle de qualité</b> | Les diamètres des zones d'inhibition avec la souche de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 doivent se trouver dans les limites indiquées.<br>( <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> ).   |



**EUCAST**

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases