

Méthode EUCAST de diffusion en gélose et de détermination des CMI par microdilution en milieu liquide : préparation des milieux

A. Diffusion en gélose : milieux

Gélose Mueller-Hinton (MH) et gélose MH au sang de cheval défibriné et additionnée de β -NAD (MH-F)

La gélose MH est employée lors de la méthode de diffusion en gélose pour les bactéries autres que celles à croissance lente.

La gélose MH-F additionnée de 5% de sang de cheval défibriné mécaniquement et de 20 mg/L de β -NAD, est employée pour *Streptococcus* spp. dont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp. et autres bactéries à croissance lente.

Les géloses peuvent être achetées prêtes à l'emploi dans le commerce ou être préparées localement ainsi:

Réactifs	
1.	Poudre pour gélose MH du commerce
2.	Sang de cheval défibriné mécaniquement
3.	β -Nicotinamide adénine dinucléotide (β -NAD) pureté $\geq 98\%$.

Préparation de la solution mère de β -NAD	
1.	Dissoudre la β -NAD dans de l'eau désionisée stérile afin d'obtenir une concentration de 20 mg/mL.
2.	La filtration stérilisante de la solution mère est réalisée à l'aide d'une membrane de 0.2 μ m.
3.	La solution mère filtrée se conserve en aliquotes à 20°C, décongelés au fur et à mesure des besoins. Ne pas recongeler les solutions inutilisées.

Préparation des géloses	
1.	Préparer et autoclaver la gélose MH en fonction des recommandations du fabricant.
2.	Ramener la température du milieu en dessous de 50°C. Ramener la température à 42-45°C.
3.	Pour préparer la gélose MH-F, ajouter stérilement 50 mL de sang de cheval défibriné et 1 mL de la solution mère de β -NAD par litre de milieu. Bien agiter et répartir immédiatement.
4.	Répartir le milieu en boîtes de Petri stériles de façon à obtenir une épaisseur de 4 mm \pm 0.5 mm (soit environ 25 mL par boîte de Petri de 90 mm de diamètre, 31 mL par boîte de Petri de 100 mm de diamètre, 71 mL par boîte de Petri de 150 mm de diamètre, 40 mL par boîte de Petri carrée de 100 mm).
5.	Laisser la gélose se placer avant de déplacer les boîtes.
6.	La surface de la boîte doit être sèche avant utilisation. Si un séchage des boîtes s'avère nécessaire la durée du séchage dépend des conditions de stockage et des moyens de séchage. Ne pas dessécher les boîtes.

Conservation des géloses	
1.	Conserver les boîtes dans des sachets en plastique ventilés à 8-10°C. Si les boîtes de Petri doivent être conservées plus de 7 jours, il existe une alternative qui consiste à les conserver à 4-8°C, en sachet plastique scellé.
2.	En cas de fabrication au laboratoire, les conditions de séchage, de conservation des boîtes et durée de vie à la paillasse devront être déterminées dans le cadre du programme d'assurance qualité.
3.	Les boîtes achetées dans le commerce seront conservées selon les indications du fabricant et employées avant la limite de péremption
4.	Avec les géloses MH-F (maison ou prêtes à l'emploi) stockées en sacs plastique ou en containers scellés, il est nécessaire de sécher les boîtes 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.

Contrôle de qualité	
1	Employer une électrode de contact pour vérifier que le pH se situe entre 7,2 et 7,4.
2	Contrôler l'épaisseur de la gélose $4 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$.
3	Vérifier que le milieu permet une bonne croissance de(s) souche(s) du contrôle de qualité des bactéries proposées.
4	Vérifier que les diamètres des zones d'inhibition sont bien dans les limites requises pour chacune des associations antibiotique/bactérie.

B. Milieu employé lors de la détermination des CMI en milieu liquide (microdilution)

Bouillon Mueller-Hinton (MH) ajusté en cations divalents et bouillon MH au sang de cheval et additionné de β -NAD (bouillon MH-F)

Le bouillon MH, ajusté en cations divalents est employé lors de la méthode de dilution en milieu liquide (microdilution) pour les bactéries autres que celles à croissance lente selon la norme ISO 20776-1, 2006.

Le bouillon MH-F, bouillon MH additionné de 5% de sang de cheval lysé et de 20 mg/L β -NAD, est employé pour *Streptococcus* spp., dont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp. et autres bactéries à croissance lente.

Le bouillon MH-F est préparé comme il suit:

Réactifs	
1.	Bouillon MH du commerce ajusté en cations divalents.
2.	Sang de cheval lysé à 50%.
3.	β -Nicotinamide adénine dinucléotide (β -NAD), pureté $\geq 98\%$.

Préparation du sang de cheval lysé à 50%.	
1.	Diluer stérilement le sang de cheval avec de l'eau désionisée stérile à parties égales.
2.	Congeler le sang une nuit à -20°C et décongeler. Répéter le cycle jusqu'à ce que les cellules soient complètement lysées (trois cycles sont souvent suffisants mais la norme ISO 20776-1 suggère que 7 cycles sont parfois nécessaires).
3.	Clarifier le sang de cheval lysé à 50%, par centrifugation à $12000 \times g$ pendant 20 minutes pour enlever les membranes cellulaires. La clarté de la solution est essentielle pour la lecture. Un échec de clarté peut être dû à une lyse ou une centrifugation inadéquate. Répéter la centrifugation peut augmenter la clarté de la solution.
4.	La solution mère filtrée se conserve en aliquotes à -20°C qui seront décongelés au fur et à mesure des besoins. Ne pas recongeler les fractions inutilisées.

Préparation de la solution mère de β -NAD

1.	Dissoudre la β -NAD dans de l'eau désionisée stérile afin d'obtenir une concentration de 20 mg/mL.
2.	La filtration stérilisante de la solution mère est réalisée à l'aide d'une membrane de 0.2 μ m.
3.	La solution mère filtrée se conserve en aliquotes à 20°C qui seront décongelés au fur et à mesure des besoins. Ne pas recongeler les fractions inutilisées.

Préparation du bouillon MH-F

1.	Préparer et autoclaver le bouillon MH ajusté en cations selon les recommandations du fabricant mais avec 100 mL en moins d'eau désionisée pour tenir compte de l'addition ultérieure de sang de cheval.
2.	Ramener la température du milieu en dessous de 50°C. Tiédir jusque 42-45°C.
3.	Ajouter stérilement 100 mL de sang de cheval lysé à 50% et 1 mL de la solution mère de β -NAD pour un litre de bouillon ; bien mélanger.
4.	Répartir 11 mL de bouillon MH-F en tubes stériles avec bouchon à vis.

Conservation du bouillon MH-F

1.	Le bouillon MH-F est conservé à la température de 4-8°C.
2.	Les conditions de conservation et la durée d'utilisation devront être déterminées dans le cadre du programme d'assurance qualité. On s'attend à une date de péremption des milieux de 3 mois.

Contrôle de qualité

1	Vérifier que le pH est compris entre 7.2- et 7.4.
2	Vérifier que le milieu permet une bonne croissance de(s) souche(s) du contrôle de qualité des bactéries proposées.
3	Vérifier que les valeurs des CMI sont bien dans les limites requises pour chacune des associations antibiotique/bactérie.