

Liste des procédés facilitant la mise en place des tests de sensibilité aux antibiotiques avec les concentrations critiques recommandées par l'EUCAST

Pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, avant de passer aux nouvelles concentrations critiques de l'EUCAST il convient de :

1. Se mettre en liaison avec votre comité national (NAC) et appliquer les recommandations de ce dernier
2. Identifier au sein de votre laboratoire les différentes méthodes employées (diffusion en gélose, automates, etc..). assurer vous que vous êtes prêts pour chacune d'entre elles à la mise en place des nouvelles concentrations.
3. Identifier les différents supports qui peuvent être affectés (manuel d'accréditation, protocoles internes et rendus de résultats)
4. Identifier dans votre personnel le "champion" qui prendra le rôle de leader et s'engagera en premier puis fera toute la mise en place des changements à effectuer
5. Prendre contact avec un laboratoire ayant déjà réalisé la mise en place des normes EUCAST. Prévoir une visite de ce laboratoire.
6. Identifier et informer tous les aboutissants stakeholders (personnels du laboratoire, clients et utilisateurs de ces tests, réseaux assurant les programmes de surveillance de la résistance aux antibiotiques) and distributors).
7. S'assurer que l'on dispose bien du matériel nécessaire. On peut s'aider en regardant la liste sur le site de l'EUCAST rubrique [preparedness of manufacturers of AST material](#).
8. Après avoir fixé la date de la mise en place définitive, prévoir préalablement une période de formation de 3 à 6 mois en interne au laboratoire.
9. Informer les responsables qualité qui organisent les contrôles de qualité externe

10. Si nécessaire consulter EUCAST. L'adresse de contact d'EUCAST est indiquée sur le site à l'adresse E mail : www.eucast.org).

Dispositions pour la mise en place des automates

1. Consulter les recommandations de votre comité national et regarder les mentions nationales particulières.
2. S'assurer que le système s'appuie sur les concentrations critiques EUCAST pour l'ensemble des antibiotiques. Demander au fabricant d'établir la liste des discordances entre les concentrations de l'automate et celles recommandées par EUCAST. Ces éléments évoluent dans le temps, en fonction des pays ou des installations.
3. En absence de concentrations critiques dans les tableaux EUCAST, les mentions IE (insuffisance de données) ou un trait (-) font partie des recommandations. Le laboratoire qui suit la procédure EUCAST ne peut s'en affranchir et ne doit pas remplacer ces mentions par d'autres valeurs critiques.

Dispositions pour la mise en place de la méthode de diffusion en gélose EUCAST

La méthode de diffusion EUCAST est établie à partir d'un inoculum (0,5 McFarland) sur gélose Mueller-Hinton additionnée ou non de 5% horse de sang de cheval et de 20 mg/L β -NAD. Il est important de suivre la description de cette méthode (voir www.eucast.org).

Détails importants :

Il a été mentionné que l'inoculum devait avoir une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 McFarland, on privilégiera les méthodes spectrophotométriques.

Exception: pour *Streptococcus pneumoniae* l'inoculum devra correspondre à une turbidité identique à celle de l'étalon 0.5-McFarland, si les colonies sont prélevées à partir d'une gélose au sang ou à l'étalon 1.0 McFarland si elles proviennent d'une gélose chocolat.

- **La culture doit être confluyente et régulièrement répartie sur la boîte de Petri**
Préparation de l'inoculum et ensemencement de celui-ci doivent conduire à l'obtention d'une culture confluyente et de zones d'inhibition parfaitement circulaires. L'inoculum doit être bien réparti sur la surface de la gélose afin d'obtenir une bonne reproductibilité des diamètres de la zone d'inhibition. Avec les bactéries à Gram négatif on évitera les inoculums trop lourds en prenant soin d'essorer l'excès de liquide sur l'écouvillon en le pressant légèrement à l'intérieur du tube avant inoculation.
- **Pour obtenir des résultats reproductibles, accepter la règle des trois fois 15 minutes.**

- L'inoculum préparé précédemment est ensemencé en moins de 15mm
- Lorsque les boîtes de Petri sont ensemencées, appliquer les disques dans un délai maximum de 15 minutes
- Lorsque les disques sont déposés l'incubation est réalisée dans un délai maximum de 15 minutes
- Cette règle peut apparaître difficile à suivre mais de petites modifications dans la routine du laboratoire devraient permettre de résoudre ce problème éventuel.
- **Vérifier que la charge des disques d'antibiotique est adéquate.** On retrouve ces valeurs dans les tableaux intitulés concentrations critiques EUCAST et contrôle de qualité. Ils peuvent être différents de ceux employés antérieurement dans le laboratoire.
- **La période d'incubation est de 16 à 20H. Ne pas la raccourcir ou l'allonger**
- **Suivre les instructions pour lire les résultats**

La bordure de la zone d'inhibition correspond à une inhibition complète de la culture observée à l'œil nu. Lire les géloses Mueller - Hinton non supplémentées à l'envers sur un fond noir avec une lumière réfléchissante. Lire les géloses Mueller - Hinton supplémentées de face sans couvercle avec une lumière réfléchissante.

Suggestions pour la mise en place de la méthode de diffusion EUCAST dans le laboratoire. Guide pratique pour le champion

1. Apprendre aux techniciens la méthode de diffusion en gélose EUCAST en insistant sur l'inoculation des boîtes de Petri et la lecture des zones d'inhibition. Cf. diaporama www.eucast.org.
 2. Commencer la formation de tous les personnels en lisant les zones d'inhibition d'une même boîte. Le but étant d'harmoniser la mesure des zones d'inhibition au sein du laboratoire. Toute personne nouvelle dans le laboratoire devra passer par cette épreuve préliminaire. Un guide de lecture se trouve sur www.eucast.org.
- Commencer par mesurer les zones d'inhibition obtenues à l'aide de deux souches de référence par exemple. *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 29213 sur gélose Mueller Hinton simple. Choisir quatre antibiotiques fréquemment testés pour ces bactéries. Aligner les boîtes réalisées trois jours consécutivement. Comparer les résultats entre membres du laboratoire, et d'un jour à l'autre et vérifier que les diamètres mesurés sont proches des valeurs cibles du contrôle de qualité et que toutes les valeurs sont dans la fourchette du contrôle de qualité. Valeurs indiquées sur www.eucast.org.

- Profiter des réunions de laboratoire pour en discuter les résultats. Répéter l'opération sur les mêmes souches et mêmes antibiotiques jusqu'à obtention des mêmes résultats pour la totalité des personnels du laboratoire
 - Pratiquer de même avec *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. faecalis* ATCC 29212.
 - Continuer avec le milieu MH-F (gélose Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de cheval et 20 mg/L β -NAD) avec les souches : *H. influenzae* NCTC 8468 et *S. pneumoniae* ATCC 49619.
 - Poursuivre avec quelques isolats cliniques tels que les streptocoques des groupes A, B, C et G. Comparer les résultats individuels avec ceux de la moyenne du groupe.
3. L'étape suivante vise à préparer l'inoculum et à ensemercer les boîtes de Petri. Le but de cette étape consiste en la standardisation des techniques permettant d'obtenir une culture confluyente. Il est préférable d'utiliser un néphélomètre/spectrophotomètre pour apprécier la densité de l'inoculum et une système de rotation des boites pour les ensemercer avec un écouvillon en coton.
Ne pas limiter le nombre d'antibiotiques dans ce test.
Cette procédure sera répétée pour toutes les souches du contrôle de qualité recommandées par EUCAST. Comparer les résultats entre membres du laboratoire, et d'un jour à l'autre et vérifier que les diamètres mesurés sont proches des valeurs cibles du contrôle de qualité et que toutes les valeurs sont dans la fourchette du contrôle de qualité. Valeurs indiquées sur www.eucast.org.
4. Avant d'introduire en routine la méthode de diffusion EUCAST réaliser un contrôle de qualité quotidien (avec les antibiotiques les plus courants) jusqu'à obtention de résultats, en conformité avec les recommandations EUCAST, au sein du laboratoire

**Des questions à propose de la méthode de diffusion EUCAST ?
Besoin d'aide ?**

Contact : erika.matuschek@ltkronoberg.se

Ou le secrétariat de l'EUCAST