



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Détermination de la Sensibilité aux Antibiotiques Méthode de diffusion de l'EUCAST en gélose

Version 4.0
Juin 2014

Sommaire

- Milieux
- Préparation de l'inoculum
- Inoculation des boîtes de Petri
- Disques
- Incubation
- Lecture des zones d'inhibition
- Interprétation
- Contrôle de Qualité
- Analyse des erreurs

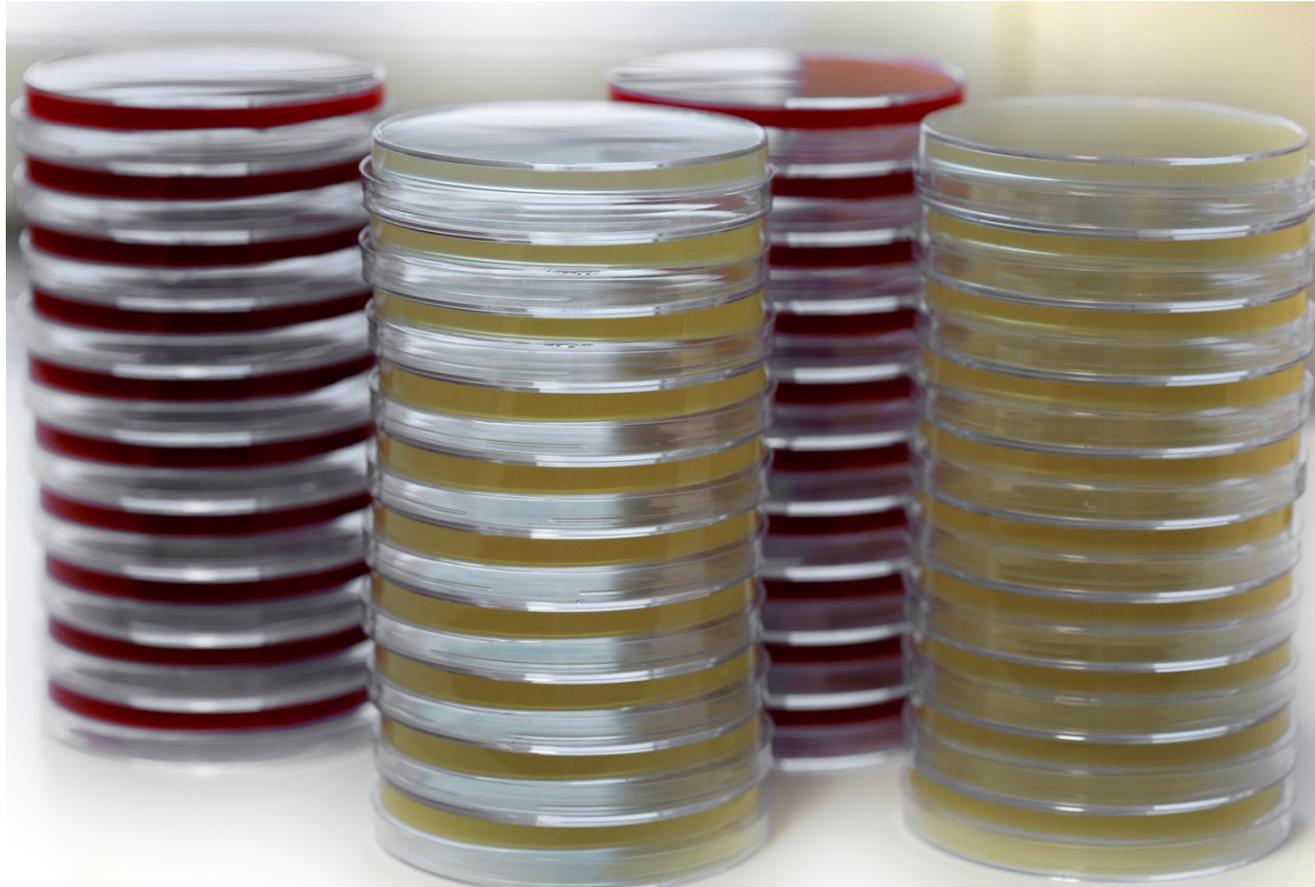
Modifications du diaporama sur la méthode de diffusion en gélose EUCAST

Version	Modifications
<p>Version 4.0 June 2014</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Information sur la pureté du β-NAD ajoutée diapo 6. • <i>Corynebacterium</i> spp. a été ajouté diapos 7 et 20. • Information sur le stockage et manipulation des boîtes de Petri ajoutée diapo 10. • Information sur la manipulation des boîtes de Petri diapo 14. • Staphylocoques changé en <i>S. aureus</i> diapo 28. • Lien avec EUCAST pour les tables du contrôle de qualité étendu ajouté diapo30. • Information sur la lecture et l'évaluation des résultats du contrôle de qualité ajouté diapo34.
<p>Version 3.0 Juin 2013</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Précisions concernant le sang de cheval pour les géloses MH-F, diapos 5 et 6 • Ajout de <i>Pasteurella multocida</i>, <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i> diapos 6 et 19 • Précisions concernant la sélection des colonies pour la technique de diffusion en gélose, diapos 11 et 12 • Ajout de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 diapo 30 • Numérotation DSM et CCUG pour <i>E. faecalis</i> ATCC 51922, diapo 31

Modifications du diaporama sur la méthode de diffusion en gélose EUCAST

Version	Modifications
Version 2.1 Février 2012	<ul style="list-style-type: none">• Précision sur la lecture des zones d'inhibition (Diapos 23 et 25)
Version 2.0 Janvier 2012	<ul style="list-style-type: none">• Nouvelle dénomination (streptocoque du groupe viridans et ajout de <i>Listeria monocytogenes</i> (diapos 6 et 19).• Précision sur la lecture des zones d'inhibition (diapo 24).• Exceptions dans la lecture des zones d'inhibition (diapo 27).• Ajout de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 and <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (diapo 31).
Version 1.1 Juin 2010	<ul style="list-style-type: none">• Précision sur l'épaisseur de la gélose (diapo 7).• Ajout des numéros des souches de référence provenant de la collection espagnole (30 et 31).
Version 1.0 Décembre 2009	<ul style="list-style-type: none">• Première publication du diaporama sur la méthode de diffusion EUCAST sur la toile de l'EUCAST.

Milieux pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques



Milieux pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques

- N'utiliser que le milieu de Mueller-Hinton gélosé (MH)
- Le milieu MH-F, destiné aux bactéries exigeantes (MH-F, **Mueller-Hinton Fastidious**) est un milieu MH additionné de 5% sang de cheval défibriné mécaniquement et de 20 mg/L de β -nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).
- Employer du β -NAD avec un indice de pureté $\geq 98\%$.

Milieux en fonction des bactéries

Organismes	Milieu
Enterobactéries <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	Gélose de Mueller-Hinton
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptococcus des groupes A, B, C et G Streptocoques du groupe viridans <i>Haemophilus</i> spp. <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i> <i>Corynebacterium</i> spp.	Gélose de Mueller-Hinton + 5% de sang de cheval défibriné + 20 mg/L β -NAD (MH-F)
Autres bactéries à croissance lente	Selon

Préparation des milieux

- Préparer les milieux selon les recommandations des fabricants.
- Ne pas ajouter le sang ou le β -NAD sans que le milieu soit ramené à la température de 42-45°C (s'assurer que les personnes responsables de la préparation disposent des moyens appropriés pour repérer la température), bien agiter et couler les boîtes de Petri immédiatement.
- Couler les boîtes sur une surface plane de façon à obtenir une épaisseur homogène de la gélose de $4,0 \pm 0,5$ mm. Si les mesures successives montrent que l'épaisseur des géloses est régulièrement supérieure ou inférieure à 4 mm, ajuster le volume même si les résultats se situent entre 3,5 – 4,5 mm.

Les boîtes les plus utilisées ont un diamètre de 90 mm (~25 mL), 100 mm (~31 mL), 150 mm (~71 mL) ; les boîtes carrées de 100 mm (~40 mL).

Contrôle de Qualité de la gélose de Mueller-Hinton

Vérifier que, pour chaque lot de milieu, les mesures obtenues se situent bien dans les limites permises pour toutes les combinaisons bactéries/ antibiotiques.

Problèmes particuliers:

- De fortes ou faibles concentrations de cations divalents peuvent être suspectées en cas de zones d'inhibition en dessous ou au dessus des valeurs limites pour les aminosides et la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Un excès de thymine ou de thymidine peut être suspecté par des zones d'inhibition en dessous des limites pour l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et *E. faecalis* ATCC 29212.

Séchage et conservation des géloses

- Lors de l'utilisation aucune goutte d'eau ne doit être apparente à la surface de la gélose.
- Les boîtes ne doivent pas être desséchées.
- **Les boîtes doivent être stockées entre 4 et 10°C**
- 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.
- Il convient de suivre les recommandations du fabricant sur le mode de conservation des géloses prêtes à l'emploi.
- **Les boîtes doivent être mises à température ambiante avant inoculation.**
- **Pour les boîtes MH-F stockées en sacs plastique ou containers, il convient de les sécher avant usage. Ceci évitera un excès d'humidité qui peut entraîner des problèmes de zones floues ou de voiles dans les zones d'inhibition.**

Inoculum

- La méthode nécessite d'obtenir un inoculum dont la turbidité est identique à l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland*.

* Pour *E. coli*. cela correspond approximativement à $1-2 \times 10^8$ UFC/mL



Choisir des colonies bien isolées sur milieu non-sélectif après une nuit de culture

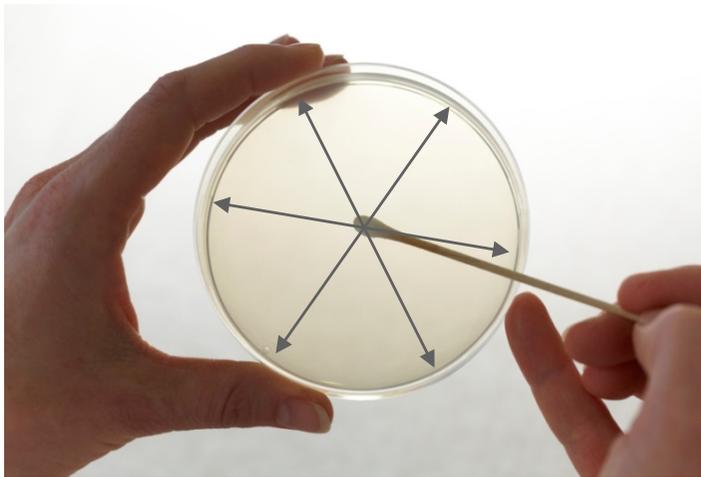


Préparation de l'inoculum

- Prélever une à plusieurs colonies (si possible) de même morphologie afin d'éviter de sélectionner un variant atypique à l'aide d'une boucle stérile ou d'un écouvillon en coton ; mettre les colonies prélevées en suspension dans un solution contenant 0.85% de chlorure de sodium de façon à obtenir un trouble identique à celui de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland.
 - Exception: pour *Streptococcus pneumoniae* utiliser le tube 0,5 McFarland si les colonies sont prélevées à partir d'une gélose au sang ; si la culture a été réalisée sur une gélose chocolat c'est le tube 1 McFarland qui sera retenu.
- Pour obtenir la bonne turbidité, il est préférable d'ajouter soit des bactéries, soit la solution salée plutôt que mesurer un trouble équivalent à McFarland 0,5 avec un néphélomètre.

Inoculation des boîtes de Petri

- L'inoculum doit être employé de façon optimale dans un délai de 15 minutes sans jamais dépasser une heure.
- Plonger l'écouvillon en coton dans la suspension bactérienne et jeter l'excès en tournant l'écouvillon à l'intérieur du tube.
- **Vérifier que les boîtes de Petri sont à température ambiante**
- Etaler sur toute la surface en ensemençant dans trois directions soit à l'aide d'un système rotatif.



Eviter l'ensemencement trop lourd

- Il est très important de ne pas ensemençer de manière excessive les boîtes de Petri.
- Vérifier que les diamètres d'inhibition des souches de contrôle de qualité sont dans les limites requises. Un inoculum lourd engendre des diamètres plus petits.
- Avant d'ensemencer les boîtes de Petri, rejeter l'excès de liquide sur la paroi du tube en le tournant doucement (mais sans excès, particulièrement pour les bactéries à Gram positif).

Conservation des disques imprégnés d'antibiotique

- Les disques doivent être conservés en respectant les consignes du fabricant.
- Les cartouches de disques sont conservées généralement entre 4 et 8°C dans des conteneurs fermés contenant un agent desséchant et à l'abri de la lumière
- Pour éviter d'avoir de la condensation sur les disques, ramener les cartouches à température ambiante avant de les ouvrir. Il vaut mieux garder les cartouches à température ambiante que de les remettre et retirer du réfrigérateur.
- Respecter les dates de péremption indiquées sur chaque cartouche.

Dépôt des disques

- Le dépôt des disques doit être réalisé dans les 15 minutes qui suivent l'inoculation
- Les disques doivent être en contact ferme avec la surface de la gélose.
- La disposition des disques devra être telle que les zones d'inhibition des souches sensibles ne se superposent pas et pour éviter toute interférence entre les antibiotiques; il est important que la mesure des diamètres d'inhibition soit fiable.



Résumé du protocole d'inoculation des boîtes de Petri

- Partir de colonies obtenues après une nuit de culture sur des milieux non sélectifs.
- Ajuster l'inoculum de façon à obtenir un trouble comparable à celui du tube 0.5 de la gamme de McFarland de préférence à une méthode spectrométrique. Utiliser l'inoculum ainsi préparé dans un délai **15 minutes**.
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne , rejeter l'excès de liquide en tournant sur la paroi interne du tube.
- Bien étaler l'inoculum sur la totalité de la surface de la gélose
- Après ensemencement des boîtes, déposer les disques dans un délai maximum de **15 minutes** et incuber les boîtes dans un délai maximum de **15 minutes**.

Incubation des boîtes de Petri

- Retourner les boîtes, puis incuber les, au maximum dans les 15 minutes qui suivent le dépôt des disques. La limite du temps de pré-diffusion des antibiotiques évite l'obtention de zones d'inhibition trop larges.
- Ne pas réaliser des piles de boîtes trop importantes des car l'équilibre en température des boîtes empilées peut influencer sur la taille des zones d'inhibition (selon l'efficacité de votre étuve).
- Les boîtes de MH sont incubées en aérobiose, Celles de MH-F dans une atmosphère contenant 4-6% de CO₂.

Incubation des boîtes de Petri

Organisme	Conditions d'Incubation
Entérobactéries	35±1 °C en aérobiose pendant 16-20h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35±1 °C en aérobiose pendant 16-20h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±1 °C en aérobiose pendant 16-20h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35±1 °C en aérobiose pendant 16-20h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35±1 °C en aérobiose pendant 16-20h
<i>Enterococcus</i> spp.	35±1 °C en aérobiose pendant 16-20h
Streptocoques des groupes A, B, C et G	35±1 °C en atmosphère contenant 4-6% de CO ₂ pendant 16-20h
Streptocoques du groupe viridans	35±1 °C en atmosphère contenant 4-6% de CO ₂ pendant 16-20h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1 °C en atmosphère contenant 4-6% de CO ₂ pendant 16-20h
<i>Haemophilus</i> spp.	35±1 °C en atmosphère contenant 4-6% de CO ₂ pendant 16-20h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1 °C en atmosphère contenant 4-6% de CO ₂ pendant 16-20h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35±1 °C en atmosphère contenant 4-6% de CO ₂ pendant 16-20h
<i>Pasteurella multocida</i>	35±1 °C en atmosphère contenant 4-6% de CO ₂ pendant 16-20h
<i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i>	41+/-1 °C en atmosphère microaérophile 24h (40-48h)
<i>Corynebacterium</i> spp. Autres bactéries à croissance lente	35+/-1 °C en atmosphère contenant 4-6% de CO ₂ pendant 16-20h (40-48h) Selon

La règle des 3 fois 15 minutes

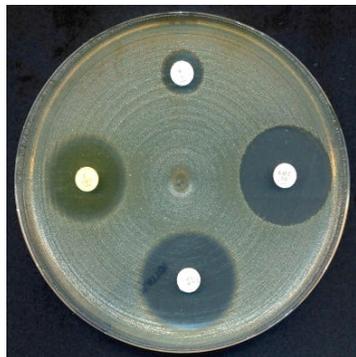
Préparer vos boîtes de Petri de façon à:

- Utiliser l'inoculum dans les **15 minutes** suivant sa préparation sans jamais dépasser 60 minutes.
- Appliquer les disques dans les **15 minutes** qui suivent l'inoculation des boîtes.
- Incuber dans les **15 minutes** qui suivent l'application des disques.

Lecture des boîtes après incubation

- Un inoculum correct et un ensemencement en stries satisfaisant conduisent à une culture confluyente.
- La culture pourrait éventuellement être distribuée sur toute la surface de la gélose afin d'obtenir des zones d'inhibition parfaitement rondes (voir diapo suivante)
- L'obtention de colonies isolées traduit une légèreté de l'inoculum et nécessite une reprise du test.

La culture devra être confluyente et uniformément répartie sur la surface de la gélose.



Ce que l'on devrait atteindre..

..et ce que l'on ne doit pas obtenir !

Lecture des zones d'inhibition

- Les limites des zones doivent être lues à l'œil nu en tenant compte de la complète inhibition de la culture, la boîte étant placée à environ 30 cm de l'œil.

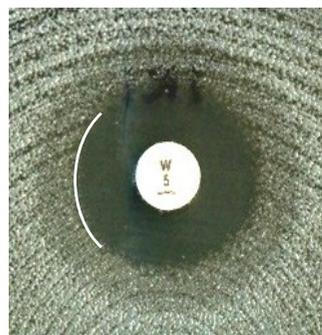
Exemples:



E. coli
ciprofloxacine



S. aureus
érythromycine



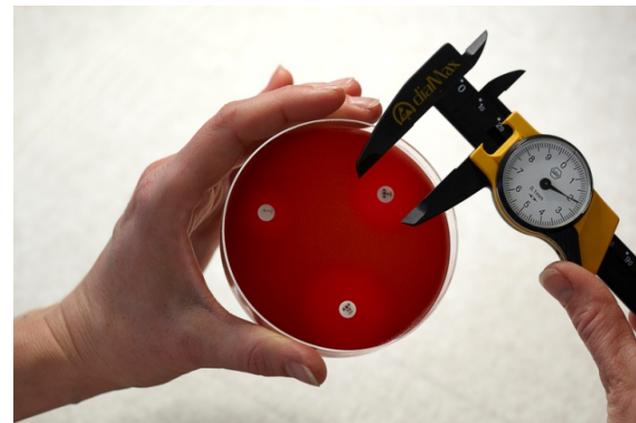
CoNS
triméthoprime



S. pneumoniae
rifampicine

Lecture des zones d'inhibition

- Lire les zones au dos des géloses **MH** sur fond noir éclairé avec une lumière réfléchie.
- Lire les zones des géloses **MH-F** directement face à la boîte couvercle retiré, éclairée avec une lumière réfléchie.



Lecture des zones d'inhibition

- Ne pas tenir les boîtes face à une lampe (lumière transmise) ni utiliser une loupe grossissante, sauf indication particulière.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition avec une règle, un pied à coulisse ou un système de lecture automatisé.
- Si à l'intérieur d'une zone d'inhibition apparaissent des colonies distinctes, les prélever, cultiver séparément vérifier la pureté et si nécessaire refaire le test.

Zones d'inhibition – cas particuliers (1)

Organisme	Antibiotique	Lecture des zones d'inhibition
<i>Proteus</i> spp.	Tous	Ignorer le swarming (étalement).
<i>Streptococcus</i> spp.	Tous	Ne pas lire la zone d'hémolyse mais la zone d'inhibition.
Tous	Triméthoprim Triméthoprim- sulfaméthoxazole	Ignorer un fin film de culture près du disque en cas de larges zones d'inhibition.
<i>Staphylococcus</i> spp.	Linézolide	Lire sous lumière transmise (boîte face à la lumière).
<i>Enterococcus</i> spp.	Glycopeptides	Lire sous lumière transmise (boîte face à la lumière).
Enterobacteriaceae	Ampicilline	Ignorer une culture fine qui peut survenir comme une zone interne avec certains lots de gélose MH.

Zones d'inhibition – cas particuliers (2)

Organisme	Antibiotique	Lecture des zones d'inhibition
<i>E. coli</i>	Mécillinam	Ignorer la présence de quelques colonies dans la zone d' inhibition .
S. aureus	Pénicilline G	Examiner la limite de la zone proche d'une lumière transmise (boîte tournée vers la lumière).
Staphylocoques	Céfoxitine	Examiner les zones d'inhibition avec attention pour détecter les colonies dans la zone d'inhibition.

Interprétation des zones d'inhibition

- Vérifier que, pour les souches du contrôle de qualité, les diamètres de la zone d'inhibition sont dans les limites acceptables avant de lire les autres tests.
- La catégorisation clinique (S, I ou R) se fait à partir des diamètres des zones d'inhibition (arrondie au millimètre le plus proche) et en fonction des données publiées sous forme de Tableaux (www.eucast.org). Une fiche-modèle avec les concentrations critiques EUCAST peut être employée.

Contrôle de qualité

- Employer les souches du contrôle de qualité recommandées pour la routine pour vérifier la performance du test (voir [EUCAST Routine QC Tables](#))
- Pour ce contrôle, des souches avec un mécanisme de résistance connu peuvent être ajoutées afin de vérifier que ce mécanisme est détecté. (Voir [EUCAST Extended QC Tables](#))
- On peut obtenir les souches du contrôle soit à partir de collections soit dans le commerce.

Souches du contrôle de qualité EUCAST pour la routine

Organisme	Référence dans les collections	Caractéristiques de la souche
<i>E. coli</i>	ATCC 25922; NCTC 12241; CIP 7624 DSM 1103; CCUG 17620, CECT 434	Sensible, sauvage
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853; NCTC 12903; CIP 76110 DSM 1117; CCUG 17619; CECT 108	Sensible, sauvage
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213; NCTC 12973; CIP 103429 DSM 2569; CCUG 15915; CECT 794	Faible production de β -lactamase
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212; NCTC 12697; CIP 103214 DSM 2570; CCUG 9997; CECT 795	Sensible, sauvage
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 49619; NCTC 12977; CIP 104340 DSM 11967; CCUG 33638	Intermédiaire à la Pénicilline G
<i>H. influenzae</i>	NCTC 8468; CIP5494, CCUG 23946	Sensible, sauvage
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560; NCTC 11351; CIP 702 DSM 4688; CCUG 11284	Sensible, sauvage

Souches EUCAST pour la détection de mécanismes de résistance (en cours)

Organisme	Référence dans les collections	Caractéristiques de la souche
<i>E. coli</i>	ATCC 35218; NCTC 11954; CIP 102181; DSM 5564; CCUG 30600; CECT 943	β-lactamase TEM-1
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603; NCTC 13368; CCUG 45421; CECT 7787	BLSE (SHV-18)
<i>S. aureus</i>	NCTC 12493	Hétérorésistante à l'oxacilline, (<i>mecA</i>)
<i>E. faecalis</i>	ATCC 51922; NCTC 13379; CIP 104676; DSM 12956 CCUG 34289	Résistance à haut niveau aux aminosides et résistante à la vancomycine (<i>vanB</i>)
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247; NCTC 12699; CIP 104604; DSM 9999; CCUG 26214	Résistance à l'ampicilline (BLNAR) sans production de β-lactamase

Culture Collections

ATCC, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

NCTC, National Collection of Type Cultures, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK.

CIP, Collection de Institut Pasteur, 25–28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 France.

DSMZ, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 16, D-38124 Braunschweig, Germany.

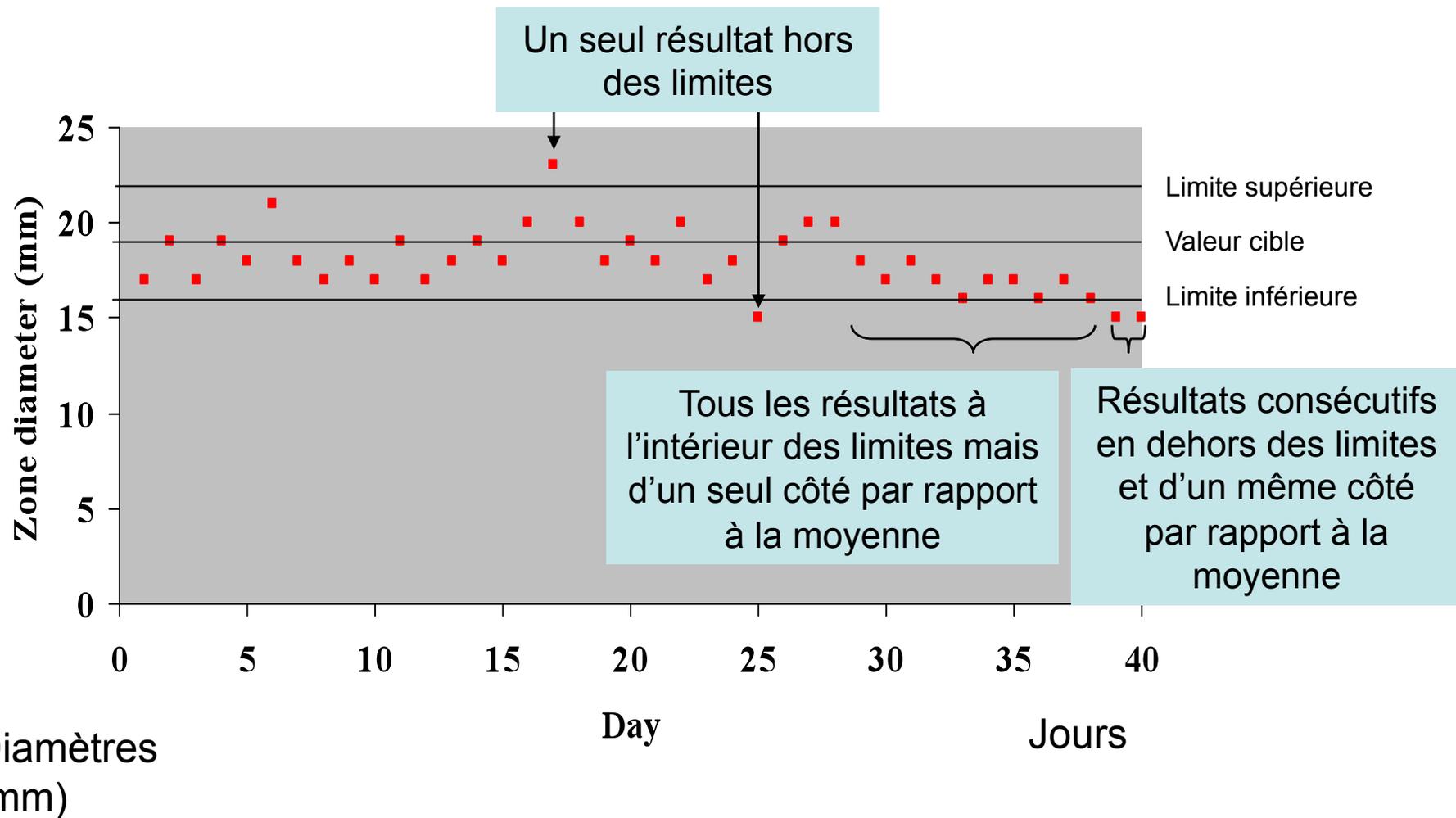
CCUG, The Culture Collection University of Gothenburg <http://www.ccug.se/>

CECT. Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia. 46100. Burjassot. Valencia. Spain. <http://www.cect.org>

Utilisation des souches du contrôle de qualité en routine

- Le contrôle doit être réalisé et lu quotidiennement au moins pour les antibiotiques qui font partie du choix en routine.
- Les tests doivent toujours être lus et évalués avant de répondre les résultats pour les souches cliniques.
- Chaque fois qu'un essai est réalisé, contrôler les 20 derniers résultats consécutifs.
- Examiner les résultats pour observer les tendances ou les diamètres uniformément inférieurs ou supérieurs à la moyenne.
- Si au moins deux tests sont hors de la zone autorisée enquêter.

Appréciation de la performance des mesures



Attitude à adopter lorsque les résultats du CQ sont hors des limites

- Si deux contrôles de qualité non consécutifs sur 20 sont hors des limites, rendre les résultats mais enquêter.
- Si deux résultats consécutifs sur 20 sont hors des limites, enquêter avant de répondre. Il est souhaitable de recommencer les tests.
- Si pour au moins deux disques les résultats sont hors limites – enquêter avant de répondre. Il est souhaitable de recommencer les tests.
- Si pour une souche résistante, la résistance n'est pas détectée, ne pas rendre les résultats, enquêter et recommencer le tests.

Conservation et repiquage des souches du contrôle de qualité

- Les souches sont conservées sur billes à -70 °C en bouillon glycérolé : un tube “en cours” , un autre “archive”. On peut également utiliser des systèmes commerciaux.
- Réaliser un repiquage chaque semaine à partir du tube en cours sur un milieu non sélectif et vérifier la pureté de la souche.
- Repiquer à partir de la culture précédente chaque jour et pour une période de 7 jours.
- Les microorganismes à croissance lente peuvent n’être repiqués que tous les 6 jours.
- Lorsque le tube en cours est inutilisable, un nouveau tube en cours est obtenu par repiquage à partir du tube archivé.

Principales sources d'erreurs (1)

Milieux	Conservation des boîtes de Petri
	Manipulateur non habitué au respect des instructions
	Changement de lot ou de fabricant de milieu
	Suppléments (variation selon les lots, quantité incorrecte, péremption)
	pH
	Profondeur de la gélose /Quantité d'agar
	Date de péremption
Conditions de l'essai	Non-adhésion à la règle "15-15-15"- (inoculum utilisée en 15 min, disques déposés en 15 min, incubation en 15 min)
	Incubation (température, atmosphère et durée)
	Inoculum incorrect (trop léger, trop lourd ou autre)
	Conditions de lecture
	Lecture des bordures de la zone d'inhibition

Principales sources d'erreurs (2)

Disques	Disques (erreur d'antibiotique ou charge du disque erronée)
	Charge du disque (mauvaises conditions de conservation, agent peu stable, péremption)
	Disques non ramenés à température ambiante à l'ouverture des cartouches
	Disques trop nombreux sur la gélose (interactions entre les antibiotiques)
Souches Contrôle	Mauvaise souche
	Mutation
	Contamination
	Age de la culture

Site web de l' EUCAST

- Regarder régulièrement sur le site de l'EUCAST les mises à jour concernant la méthodologie, les valeurs limites du CQ et les concentrations critiques.

www.eucast.org

- Adresser tout commentaire ou suggestion à erika.matuschek@ltkronoberg.se ou au secrétariat de l'EUCAST (voir sur le site).



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases