

Méthodes de laboratoire pour la détermination de la sensibilité aux antimicrobiens de *Vibrio cholerae* : points de vigilance

Le présent document reprend les points essentiels des procédures de laboratoire pour la détermination phénotypique de la sensibilité aux antimicrobiens par des méthodes de diffusion en gélose utilisant des disques imprégnés d'antibiotiques (méthode Kirby-Bauer) ou des bandelettes de test.

Ces procédures sont présentées dans l'aide-mémoire « Détermination de la sensibilité aux antibiotiques pour le traitement et le contrôle du choléra ». Cette détection phénotypique peut également être effectuée par d'autres méthodes, notamment des méthodes de microdilution en milieu liquide ou de dilution en milieu gélosé, mais ces dernières sont plus coûteuses et difficiles à mettre en œuvre et ne sont donc généralement pas recommandées par le GTFCC.

Les protocoles standard applicables aux tests de sensibilité aux antimicrobiens sont décrits en détail dans les directives et documents de référence sur les antibiogrammes (CLSI*, EUCAST*, CA-SFM EUCAST***)

Respect des règles de sécurité. Les tests effectués sur *Vibrio cholerae* ou sur d'autres échantillons potentiellement infectieux doivent toujours être réalisés dans le respect des politiques et des procédures de sécurité du laboratoire. Un équipement de protection individuelle (EPI) doit être porté lors de la manipulation de matières potentiellement infectieuses. Il convient de consulter systématiquement les fiches de données de sécurité (FDS) individuelles pour obtenir les informations spécifiques à chaque réactif.

Souches de contrôle de qualité. Conformément aux directives et documents de référence sur les antibiogrammes^(1,2,3), il convient d'inclure des souches de contrôle de qualité (CQ) pour suivre les performances des tests de sensibilité aux antimicrobiens et veiller à l'obtention de résultats exacts et reproductibles. Ces souches doivent toujours être testées en parallèle avec les souches à analyser. Elles doivent être choisies de sorte à couvrir chaque produit testé (voir ci-dessous). Il est toutefois possible d'utiliser d'autres souches disponibles dans le laboratoire, dans la mesure où elles ont été rigoureusement caractérisées et où leur sensibilité aux antimicrobiens testés est connue.

Azithromycine (CMI) *S. aureus* ATCC 29213

Érythromycine (diamètre) *S. aureus* ATCC 29213

Péfloxacin (diamètre) *E. coli* ATCC 25922

Ciprofloxacine (CMI) *E. coli* ATCC 25922

Tétracycline (diamètre) *E. coli* ATCC 25922

Doxycycline (CMI) *E. coli* ATCC 25922

Qualité et préparation du milieu. Le milieu gélosé de Mueller-Hinton est le seul milieu qui ait été validé pour l'étude de la sensibilité aux antimicrobiens dans les directives internationales^(1,2,3). Il est recommandé d'utiliser des formulations déshydratées et prêtes à l'emploi de la gélose Mueller-Hinton. Sur une surface plane, verser la gélose dans des boîtes de Pétri en verre ou en plastique à fond plat, sur une épaisseur uniforme de 4 mm ± 0,5 mm. **Une épaisseur supérieure ou inférieure**

à ce seuil aura une incidence sur la diffusion des agents antimicrobiens, ce qui faussera les résultats. Chaque nouveau lot de gélose doit être contrôlé pour vérifier sa stérilité, sa capacité à favoriser la croissance du ou des agents pathogènes ciblés et sa capacité à produire un profil d'antibiorésistance correct avec la souche de référence. Les boîtes de Pétri contenant la gélose doivent être conservées à une température comprise entre 4 et 8 °C conformément aux instructions du fabricant. Avant d'utiliser la gélose, veiller à ce qu'elle soit sèche en surface, mais non desséchée.

Préparation de l'inoculum. L'antibiogramme doit être réalisé à partir d'une **culture bactérienne fraîche** (16–18 h à 35 ± 2 °C) sur un milieu non sélectif adapté, tel que la gélose Mueller Hinton, la gélose cœur-cerveille ou la gélose trypticase soja, ensemencée de manière à obtenir des colonies isolées. Les souches de CQ ATCC nécessaires pour les tests de diffusion sur disque doivent également être ensemencées et incubées de la même manière. Réaliser une suspension bactérienne en solution saline avec **plusieurs colonies isolées** (pour éviter de sélectionner un variant atypique) de telle sorte à atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme McFarland. Ajuster la densité en ajoutant soit de la solution saline, soit des bactéries.

Ensemencement des géloses. L'inoculum bactérien doit idéalement être utilisé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation, et dans tous les cas dans un délai maximal de 60 minutes. Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en faisant tourner l'écouvillon contre les parois du tube. Si plusieurs géloses doivent être ensemencées avec le même inoculum, il est nécessaire de recharger correctement l'écouvillon entre chaque gélose. Ensemencer en stries sur toute la surface de la boîte par 3 fois, en tournant de 60 degrés à chaque fois et en veillant à ce qu'il n'y ait pas d'espace entre les stries. **Les disques ou les bandelettes de test doivent être déposés dans les 15 minutes qui suivent l'ensemencement.** Si les géloses sont

* Clinical and Laboratory Standards Institute

** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org>)

*** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

laissées à la température du laboratoire trop longtemps avant le dépôt des disques ou des bandelettes, les bactéries peuvent commencer à croître, conduisant à une taille des zones d'inhibition faussement diminuée.

Disques d'antibiotiques. Conserver les cartouches hermétiquement fermées au réfrigérateur à $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ou dans un congélateur sans dégivrage automatique à $\leq -14^{\circ}\text{C}$ jusqu'à leur utilisation, selon les recommandations du fabricant. Pour éviter la condensation, laisser les disques ou les distributeurs contenant les disques revenir à température ambiante avant utilisation. Appliquer les disques en utilisant un distributeur ; à défaut, placer les disques dans un récipient stérile, tel qu'une boîte de Pétri vide, et utiliser une pince stérile pour les manipuler (1). Ne pas déposer plus de 6 disques si les boîtes de gélose utilisées sont de petite taille (90 ou 100 mm). Déposer les disques fermement à la surface de la gélose ensemencée et sèche. **Une fois déposés, les disques ne doivent pas être déplacés, car la diffusion des antibiotiques est très rapide.**

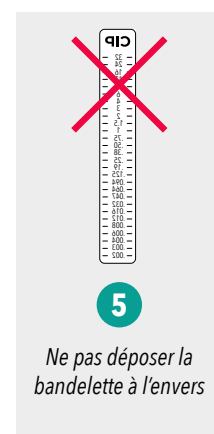
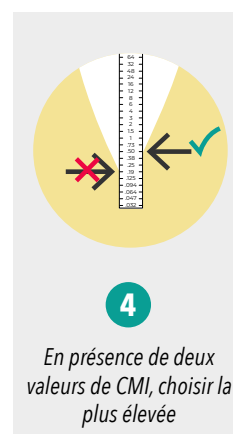
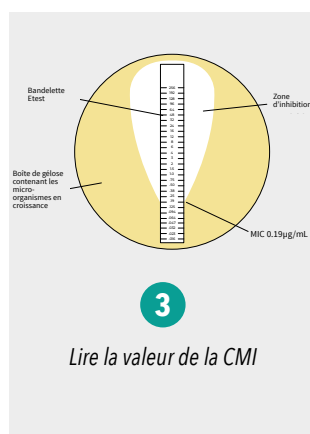
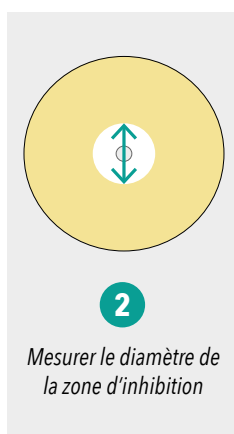
Bandelettes de test. Laisser les bandelettes revenir à température ambiante dans leur emballage pendant environ 30 minutes. À la main ou à l'aide d'une pince, prélever un nombre suffisant de bandelettes. Ne manipuler les bandelettes qu'au-dessus de la ligne noire, dans la partie où est inscrit le sigle de l'antibiotique. Ne pas toucher la surface de la bandelette du côté opposé à l'échelle de CMI. Une fois déposées, les bandelettes doivent être laissées en place **et ne pas être déplacées car les antibiotiques sont immédiatement libérés dans la gélose.**

Incubation. Incuber les boîtes en position retournée à une température de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, par piles de cinq boîtes au maximum, idéalement **dans les 15 minutes qui suivent le dépôt des disques, et dans tous les cas dans un délai maximal de 30 minutes.**

Lecture. Un inoculum correct devrait permettre d'obtenir une culture confluyente répartie sur toute la surface de la gélose. La présence de colonies isolées indique que l'inoculum est trop léger et que le test doit être refait. Après la période d'incubation, mesurer le diamètre des zones d'inhibition (disque compris) au millimètre près à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle maintenue au dos de la boîte (2). Vérifier que les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour les souches de contrôle de qualité se trouvent dans les limites acceptables. Pour l'interprétation des résultats, se référer aux documents de référence (3,4,5) sur les antibiogrammes. Les référentiels sont révisés régulièrement, vérifiez que vous utilisez une version à jour.

Lire la valeur de la CMI au point d'intersection entre l'ellipse d'inhibition et le bord de la bandelette (3) ; si ce point d'intersection se trouve entre deux valeurs de CMI, choisir la valeur la plus élevée (4) ; si la bandelette a été déposée à l'envers, le résultat n'est pas valable et le test doit être refait (5).

Résolution des problèmes. L'obtention de résultats en dehors des limites acceptables pour le contrôle de la qualité est souvent imputable à une contamination ou à l'utilisation d'une souche de CQ incorrecte. La première mesure corrective consiste à répéter le test avec une culture pure d'une souche de CQ fraîchement cultivée. Si le problème persiste, consultez la section «Trouble shooting guide» du CLSI M100¹ ou la rubrique «Frequently Asked Questions» de l'EUCAST⁴. Conformément au guide de lecture de l'EUCAST⁶ pour la diffusion en gélose à partir de disque, si des colonies distinctes sont présentes dans la zone d'inhibition, vérifier la pureté et répéter le test si nécessaire. Si les cultures sont pures, les colonies à l'intérieur des zones d'inhibition doivent être prises en compte lors de la mesure du diamètre. En cas de double zone, vérifier la pureté et répéter le test si nécessaire. Si les cultures sont pures, prendre en compte la zone intérieure.



Références

1. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>, CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34th Edition
2. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2024_manuals/Manual_v_12.0_EUCAST_Disk_Test_2024.pdf
3. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf
4. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
5. <https://clsi.org/all-free-resources/> (CLSI M45 ED3:2016TABLE 20)
6. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Reading_guide_v_10.0_EUCAST_Disk_Test_2023.pdf