

Accréditation de l'antibiogramme en 2014 / EUCAST

- **Patrice LAUDAT (Tours)**
- **Journée de Microbiologie Clinique**
- **Paris 19 septembre 2014**
- **patrice.laudat@sfr.fr**
- **QUAMIC: [www.sfm-microbiologie .org](http://www.sfm-microbiologie.org)**

Accréditation, les échéances sont connues:

- Ordonnance du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale
- Code de la Santé Publique: Art. L 6221-1 « Un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation »
- Accréditation délivrée par le COFRAC selon la Norme NF EN ISO 15 189
- Arrêté du 17 octobre 2012
- Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013: **accréditation sur 50% des examens (1/11/2016), 70% (1/11/2018) et enfin 100% (1/11/2020)**

Cas où la détermination de la CMI est considérée comme un examen / NABM

- **Cas général** s'applique aux infections systémiques et comprend l'étude au minimum de deux antibiotiques : codes 5278, 5279
- NB: la NABM mentionne que la détermination de la CMI doit être effectuée en utilisant une gamme comportant au minimum une série de 10 concentrations.
- **Cas de *Streptococcus pneumoniae*** avec une gamme de concentration adaptée à la mise en évidence d'une diminution de sensibilité aux bêta-lactamines: code 5290

Cas des hémocultures: codes 5219 et 5220

- **Cotations supplémentaires** à son initiative:
- **Etude de la sensibilité aux antibiotiques: bactérie aérobie (code 0269), bactérie anaérobie (code 0270).**
- **Note: il ne peut être coté plus de deux antibiogrammes**

Sinon l'antibiogramme intégré dans l'examen bactériologique: processus complexe



Norme NF EN ISO 15189 (2012): contenu

- « Examen: ensemble des opérations destinées à déterminer la valeur ou les caractéristiques d'une propriété »
- « Note1: dans certaines disciplines (par exemple la microbiologie), un examen correspond à la totalité des essais, des observations ou mesures effectuées »
- Examens microbiologiques: **actes médicaux**, démarche diagnostique, thérapeutique, préventive ou épidémiologique.
- Objectifs: mettre en évidence le/les microorganisme(s) impliqué(s) **et le cas échéant l'antibiogramme**.
- Préalable: sélection des bactéries à étudier, critères à définir.
- **Choix des méthodes d'antibiogramme**.
- Identification bactérienne est requise.

Méthodes de détermination de la sensibilité aux antibiotiques: méthode de référence

- **Méthode de référence**: détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).
- **Méthode internationale de référence**: microdilution (Norme ISO 20776-1/2) pour les bactéries non exigeantes à croissance rapide.
- Recommandations: américaines du Clinical and Laboratory Standards Institute (**CLSI**) , européennes de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (**EUCAST**) et France Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CA-SFM**).
- Méthodes utilisées en routine doivent être corrélées.



Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

Recommandations 2014

Coordonnateur :

François JEHL
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
Tel : 03 69 55 14 54 (Hôp.) ;
03 68 85 37 81 (Fac.)
E-mail : jehl@unistra.fr ;
francois.jehl@chru-strasbourg.fr

Secrétaire :

Gérard LINA
CHU de Lyon
Tel : 04 78 86 44 93 (Hôp.) ;
04 78 77 86 57 (Fac.)
E-mail : gerard.lina@univ-lyon1.fr

Membres :

Richard BONNET, Jean-Pierre BRU, François CARON,
Vincent CATTOIR, Hubert CHARDON,
Patrice COURVALIN, Luc DUBREUIL,
Vincent JARLIER, Thierry LAMBERT, Agnès LEFORT,
Audrey MERENS, Marie-Hélène NICOLAS-CHANOINE,
Patrick PLEISIAT, Marie-Cécile PLOY,
Claude-James SOUSSY, Emmanuelle VARON,
Philippe WEBER.

SOMMAIRE

1. DETERMINATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	3
1. 1. Préparation des milieux utiles aux méthodes CA-SFM / EUCAST pour la diffusion en milieu gélosé et la détermination des CMI par microdilution en milieu liquide	3
1.1.1. Diffusion en gélose : milieux	3
1.1.2. Détermination des CMI en milieu liquide (microdilution) : milieux	4
1. 2. Conditions techniques générales pour les méthodes de diffusion	6
1. 3. Contrôle de qualité interne	12
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (NCTC 12973 ; CIP 103429)	14
1.3.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 (NCTC 12977 ; CIP 104340). (Souche de sensibilité intermédiaire à la pénicilline)	15
1.3.3. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (NCTC 12697 ; CIP 103214)	16
1.3.4. <i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8488 (CIP 54.94)	17
1.3.5. <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 (NCTC 11351 ; CIP702)	17
1.3.6. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (NCTC 12241 ; CIP 76.24)	18
1.3.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (NCTC 12903 ; CIP 76110)	19
2. RESISTANCES NATURELLES AUX ANTIBIOTIQUES DES PRINCIPALES ESPECES BACTERIENNES D'INTERET MEDICAL	20
2. 1. Bacilles à Gram négatif non exigeants	20
2.1.1. Entérobactéries	20
2.1.2. <i>Aeromonas</i>	20
2.1.3. Bacilles à Gram négatif non fermentaires	20
2. 2. Bacilles à Gram négatif exigeants	21
2. 3. Coques à Gram positif	21
2. 4. Bacilles à Gram positif	21
2. 5. Coques à Gram négatif	21
2. 6. Bactéries anaérobies strictes	21
3. CONCENTRATIONS CRITIQUES PK/PD NON RELIEES A UNE ESPECE	23
4. TABLEAUX DES CONCENTRATIONS CRITIQUES POUR L'INTERPRETATION DES CMI ET DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION	28
4.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	29
4.2. <i>Pseudomonas</i> spp.	37
4.3. <i>Acinetobacter</i> spp.	40
4.4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	43
4.5. <i>Staphylococcus</i> spp.	45
4.6. <i>Enterococcus</i> spp.	54
4.7. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	60
4.8. Streptocoques des groupes A, B, C ou G	68
4.9. Autres streptocoques	75
4.10. <i>Listeria Monocytogenes</i>	82
4.11. Corynébactéries	84
4.12. <i>Haemophilus influenzae</i>	85
4.13. <i>Moraxella catarrhalis</i>	92
4.14. <i>Pasteurella multocida</i>	96
4.15. <i>Helicobacter pylori</i>	98
4.16. <i>Campylobacter</i> spp.	100
5. ANTIBIOGRAMME VETERINAIRE DU COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE	102

© Copyright 2014 - Société Française de Microbiologie

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays. Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle par quelque procédé que ce soit de ce document, faite sans autorisation expresse et écrite du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage du copiste et non-déstinées à une utilisation collective, et d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle).

CA-SFM / EUCAST 2014: recommandations, 114 pages et 5 chapitres

- **1- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques: données techniques pour la réalisation des antibiogrammes.**
- **2- Résistances naturelles aux antibiotiques des principales espèces bactériennes d'intérêt médical:**
- **3- Concentrations critiques PK/PD non reliées à une espèce:**
- **4- Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres des zones d'inhibition:**
- **5- Antibiogramme vétérinaire du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie:**

Conditions techniques modifiées de manière importante:

- Milieux (géloses et bouillons) : Mueller-Hinton (M-H) et MH au sang de cheval défibriné et additionné de béta-NAD (MH-F)
- Condition d'utilisation des milieux en fonction des espèces
- Préparation de l'inoculum : 0,5 McFarland pour toutes les bactéries
- Inoculation des géloses : uniquement par **écouvillon** dans les **15 min. sans jamais dépasser 60 min.**
- Dépôt des disques : dans un délai de **15 min.**
- Incubation des boîtes de Petri : de 16 à 20 heures à **$35 \pm 1^\circ \text{C}$** (± 4 à 6% CO_2), **le nombre de boîtes par pile doit être tracé**
- Lecture des boîtes **après incubation de 16 à 20 h**
- Mesure des zones d'inhibition et catégorisation clinique: **boîte à 30 cm de l'œil, fond noir et lumière réfléchi sauf Staph. /Péni en lumière transmise.....**

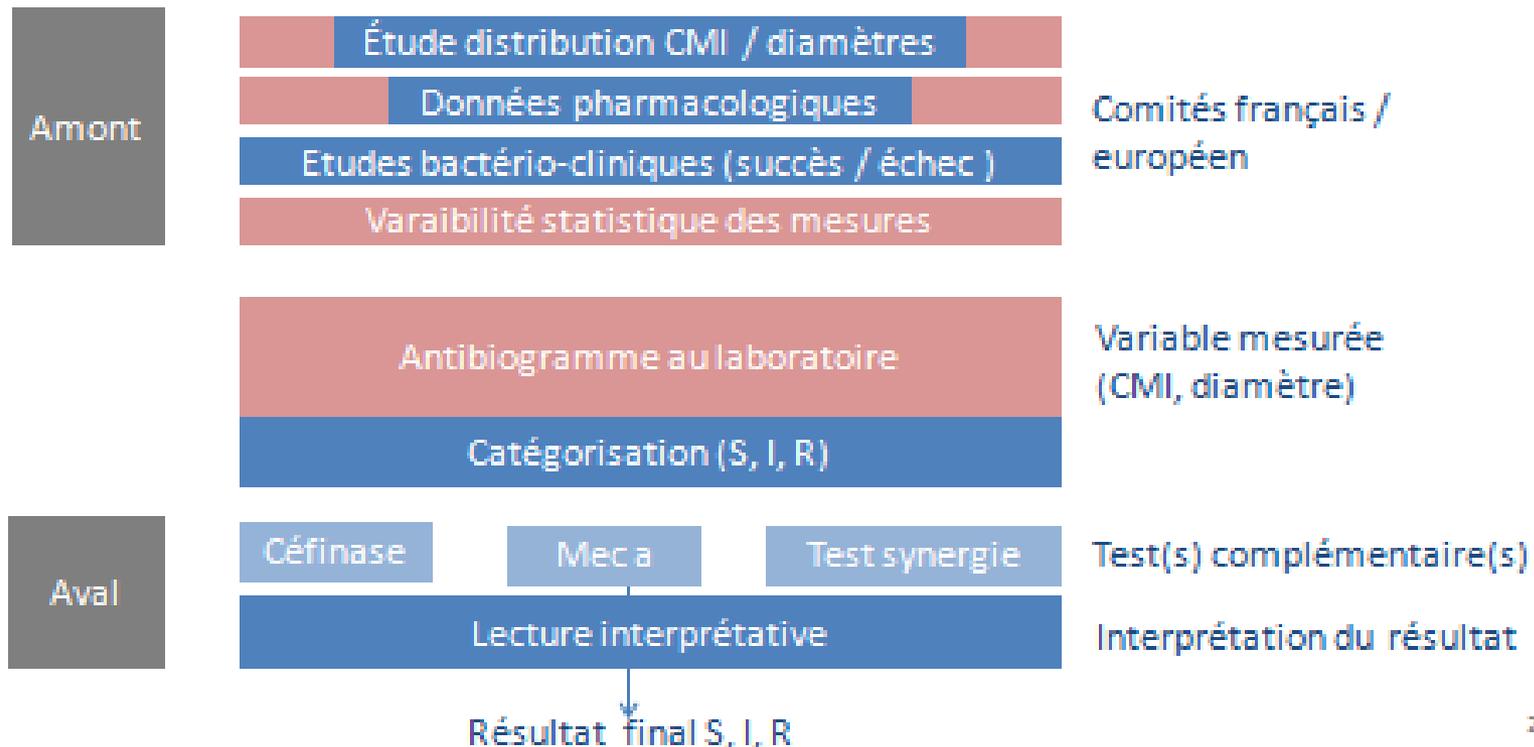
Conditions techniques modifiées de manière importante = dossier de vérification indispensable avant utilisation

- **Contrôle de qualité: 7 souches à utiliser en routine, souches parfois différentes /CA-SFM 2013 comme *S aureus*, Pneumocoque et avec de nouvelles espèces**
- **Milieus: pH à vérifier entre 7.2 et 7.4, épaisseur 4mm \pm 0.5 , vérifier la fertilité des nouveaux lots**
- **Charge des disques parfois différentes en fonction des espèces: exemple pipéracilline entérobactéries (30) acinétobacter (100)**
- **Absence de diamètres critiques pour certaines molécules: exemple Staphylocoque et Pristinamycine**

- Le CA-SFM informe que les recommandations 2013 du CA-SFM et 2014 sont « **opposables** » vis-à-vis de l'accréditation jusqu'au 30 juin 2015.
- Après cette date, seul le CA-SFM/EUCAST le sera.

L'exemple de l'antibiogramme

- Un résultat d'antibiogramme résulte d'un processus complexe



Norme NF EN ISO 15189 (2012): contenu

- **« Note 2: les examens de laboratoire qui déterminent une valeur d'une propriété sont nommés quantitatifs; ceux qui déterminent les caractéristiques d'une propriété sont nommés qualitatifs ».**
- Les mesures, diamètres ou CMI sont interprétées en S,I ou R: de ce fait les techniques d'antibiogramme sont à considérer comme des examens qualitatifs.
- Donnée importante pour les dossiers de validation des méthodes: SH GTA 04 et Fiche Type Qualitatif SH FORM 44.
- **« Gestion du système d'information: chapitre 5.10.3 »**
- Les systèmes experts: rendus indispensables du fait de la complexité des phénomènes observés, attention à la mise en place et aux mises à jour.

Document QUAMIC/SFM: www.sfm-microbiologie .org



COMITE QUALITE
(QUAMIC)
DE LA
SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE

Recommandations 2014

Coordonnateur :

Patrice Laudat
Tours
Tél (33) (0)6 88 30 41 84
Email : plaudat@laboarnaud.fr
ou patrice.laudat@sfr.fr

Groupe de travail:

C. Auvray (Dijon), R. Baraduc (Clermont-Ferrand),
M. Baume (Lyon), A. Bouvet (Paris), F. Canis
(Valenciennes), C. Cattoen (Valenciennes),
S. Charachon (Nîmes), V. Cocquerelle (Strasbourg),
R. Courcol (Lille), C. de Champs (Reims),
M. de Montclos (Lyon), A. Doloy (Paris), C. Eloy (Troyes),
A. Ferroni (Paris), N. Fonsale (St-Etienne),
N. Hidri (Limoges), J.L. Galinier (Toulouse),
F. Grobost (La Ferté Bernard), J. Izopet (Toulouse),
B. Jaulhac (Strasbourg), C. Kauffmann-Lacroix (Poitiers),
B. Lamy (Montpellier), P. Laudat (Tours),
C. Lawrence (Garches), C. Menard (Stasbourg),
C. Muller (Paris), P. Pischedda (Lille),
M.E. Reverdy (Lyon), J. Ritter (Lyon),
CJ Soussy (Créteil), A. Tachet (Pau),
S. Tigaud (Lyon), F. Toubais (Paris)

Document QUAMIC/SFM:

SOMMAIRE

A. PRE-ANALYTIQUE	5
<i>A venir</i>	
B. ANALYTIQUE	8
1. CONTROLE INTERNE DE LA QUALITE DE L'ANTIBIOGRAMME	10
2. CONTRÔLE INTERNE DE QUALITÉ EN BACTÉRIOLOGIE (CIQ) (HORS ANTIBIOGRAMME, BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET SÉROLOGIE INFECTIEUSE).	18
3. CONTROLE EXTERNE DE LA QUALITE EN BACTERIOLOGIE MEDICALE (METHODES CONVENTIONNELLES)	22
4. HÉMOCULTURE ET ACCRÉDITATION	27
5. EXAMEN CYTOBACTÉRIOLOGIQUE DES URINES (ECBU) ET ACCRÉDITATION	39
6. ANTIBIOGRAMME : NORME NF EN ISO 15189, VALIDATION DE MÉTHODE ET TYPE DE MÉTHODE	55
7. ETUDE QUALITATIVE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES: ANTIBIOGRAMME AUTOMATISE EN MILIEU LIQUIDE	62
8. VERIFICATION D'UNE METHODE QUALITATIVE DE PCR EN TEMPS REEL BACTERIENNE	69
9. IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	79
10. EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DES SELLES	85
11. EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN (LCR)	97
12. EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT : (NUMÉRATION CELLULAIRE ET RECHERCHE DE MICROORGANISMES DANS UN LIQUIDE BIOLOGIQUE AVANT COLORATION)	104
13. ENSEMENCEMENT, CULTURE ET RECONNAISSANCE DES COLONIES	113
14. ANTIBIOGRAMME PAR LA METHODE DE DIFFUSION	122
15. DETECTION QUALITATIVE D 'ADN OU D 'ARN VIRAL PAR PCR TEMPS REEL	131
16. DETECTION QUANTITATIVE DE GENOMES VIRAUX PAR PCR EN TEMPS REEL (CHARGES VIRALES)	137
C. POST-ANALYTIQUE	148
1. LA PRESTATION DE CONSEILS EN MICROBIOLOGIE	150

Portée/SH INF 50 et SH REF 08 (A/B): Sous-domaine: Microbiologie- Famille: Bactériologie (BACTH).

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (limitations,....
BA6	Tout échantillon biologique d'origine humaine Dispositifs implantables Culture bactérienne	Dosage microbiologique des antibiotiques Etude qualitative et quantitative de la sensibilité aux antibiotiques Type: antibiogramme standard par diffusion, détermination	Méthode de type qualitatif et quantitatif Méthode de diffusion en gradient de concentration en milieu gélosé Inhibition de croissance en présence d'une certaine concentration d'antibiotique(s), après incubation Inhibition de croissance en milieu liquide en présence	Méthodes reconnues adoptée (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	Exemple: CMI, E-test

Validation : SH GTA 04 et SH FORM 44

- **1-Méthodes en place depuis plusieurs mois, parfois années:** dossier à établir à partir des données accumulées, exploitation des CIQ et EEQ qui rendent compte de la reproductibilité et de l'exactitude.
- **2-Nouvelle méthode:** doit être évaluée et donner des résultats satisfaisants avant utilisation.
 - Méthode reconnue (DM-DIV marqué CE) adoptée: vérification sur site
 - **Vérification sur site:** essais de reproductibilité sur un nombre limité de souches (souches CIQ) et de comparaison de résultats avec la technique en place sur sélection de souches représentatives (SARM, EBLSE, EPC, ERV.....) .
 - **Remplir une fiche SH FORM 44:** par méthode d'antibiogramme.

Remplir une fiche SH FORM 44 par technique:

- Description de la méthode:
 - **Analyte/Mesurande:** souche bactérienne, détermination de la sensibilité aux antibiotiques
 - **Principe de la mesure:** méthode automatisée ou manuelle de type qualitatif
 - **Méthode de la mesure:** inhibition de la croissance en milieu liquide ou solide en présence de différentes concentrations d'antibiotiques après incubation, marquage CE (oui).
- **Mise en œuvre:** définir les opérateurs habilités, le protocole, la période, prévoir la date de mise en service après validation.
- **Maîtrise des risques:** diagramme de causes et effets d'Ishikawa
- **Causes des variations nombreuses:** résumées par la méthode des 5 M

Maîtrise des risques/ Antibiotogramme

Techniques, consommables, milieux,
réactifs, pratiques

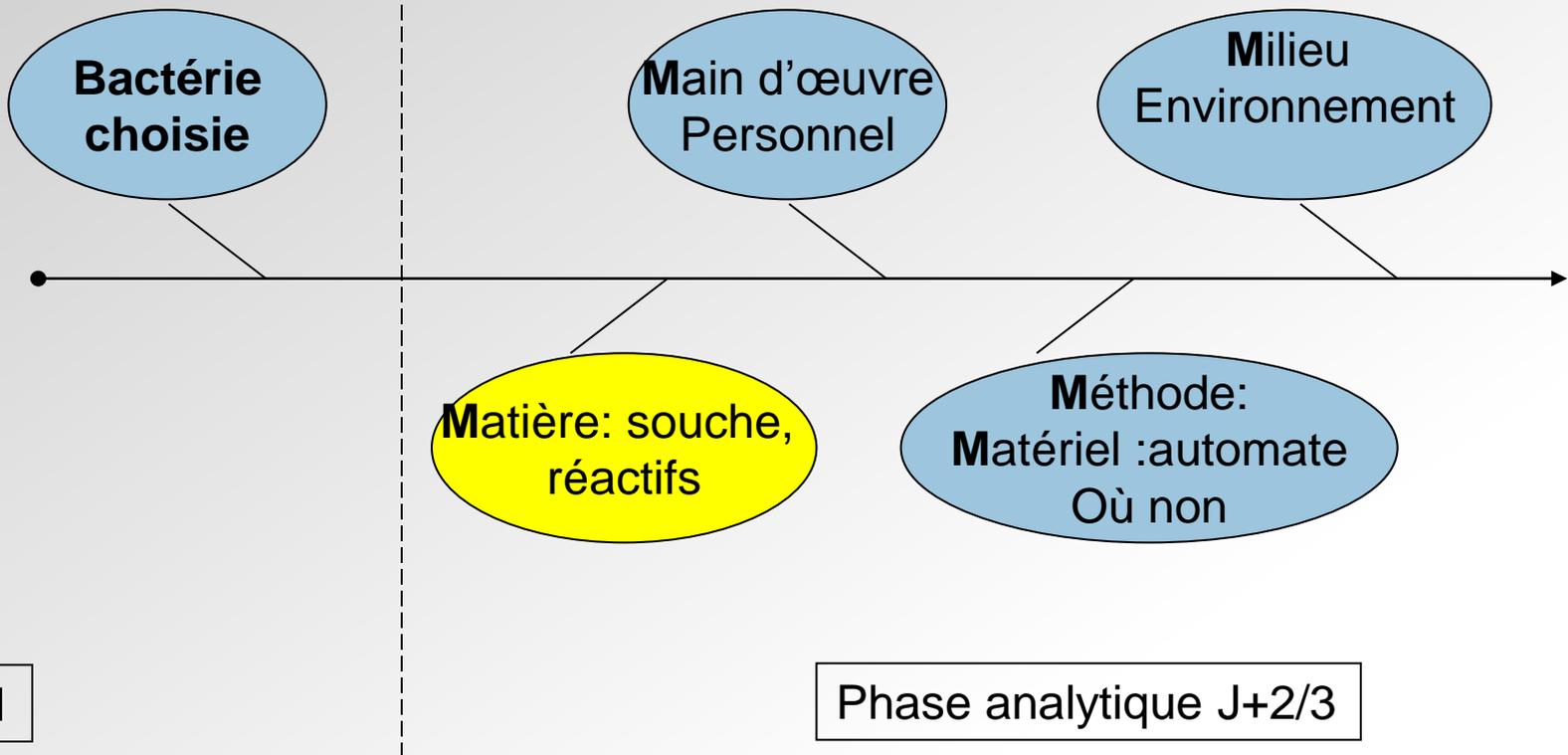


Diagramme d'Ishikawa

Evaluation des performances de la méthode:

- **Cas portée A: vérification sur site méthode adoptée CE IVD**

Paramètre à vérifier et/ou connaître	Bibliographie	Vérification sur site
Spécificité	Oui	Non
Sensibilité	Oui	Non
Contamination entre échantillons	Oui	Oui si risque
Stabilité des réactifs	Oui	Non
Robustesse	Oui	Non ou OUI
Comparaison avec méthode de référence	Oui	Non
Comparaison avec méthode du laboratoire	Oui	Oui si possible
Conclusion sur l'aptitude		Oui

Vérification en 4 étapes: SH GTA 04

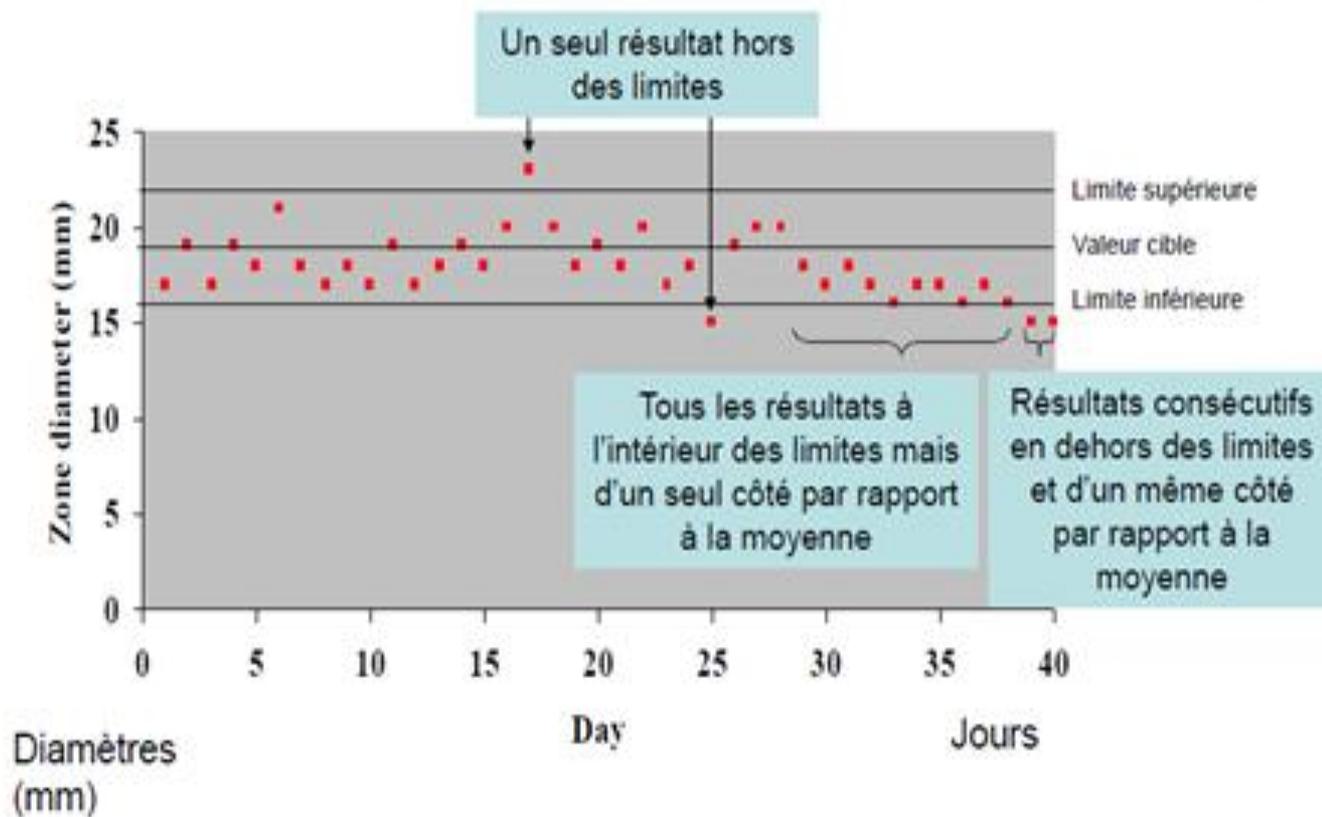
- **1-Bibliographie:** documents CA-SFM et EUCAST, ouvrage « L'antibiogramme » ESKA et QUAMIC/SFM.
- **2-Maitrise des risques:** voir QUAMIC
- **3-Détermination des critères de performance et limites d'acceptabilité:** les intervalles de référence des matériaux de référence (souches ATCC) sont ceux de l'EUCAST
- -exploitation en **concordances catégorielles (CC)** (S,I ou R) et DTM, DM et dm
- -ou **concordances essentielles (CE)**, diamètre ou CMI, pourcentage de CMI variant au plus d'une dilution de raison 2/méthode de référence
- -**critères:** exigence FDA , **CC et CE** $\geq 90\%$ avec DTM $\leq 1.5\%$, DM $\leq 3\%$ et dm $\leq 10\%$.

Vérification en 4 étapes: SH GTA 04 suite

- **4-Vérification expérimentale sur site**: selon la procédure établie par le LBM avec exploitation des résultats et conclusion sur l'aptitude de la méthode:
 - - **répétabilité**: non à priori sauf si la diffusion est nouvellement implantée dans le laboratoire: but maîtrise de l'inoculum
 - - **fidélité intermédiaire**: CIQ quotidien pendant 20 jours/critères EUCAST exploitation en **concordances essentielles**
 - - **approche de l'exactitude**: exploitation des EEQ et **sur sélection de souches représentatives (SARM, EBLSE, EPC, ERV.....)** exploitation en **concordances catégorielles**
 - - **comparaison de méthodes**: avec méthode en vigueur
 - - **contamination**: habilitation du personnel
 - - **robustesse**: en cas de modification des exigences EUCAST: durée d'incubation par exemple

APPRECIATION DE LA PERFORMANCE DES MESURES selon EUCAST

2

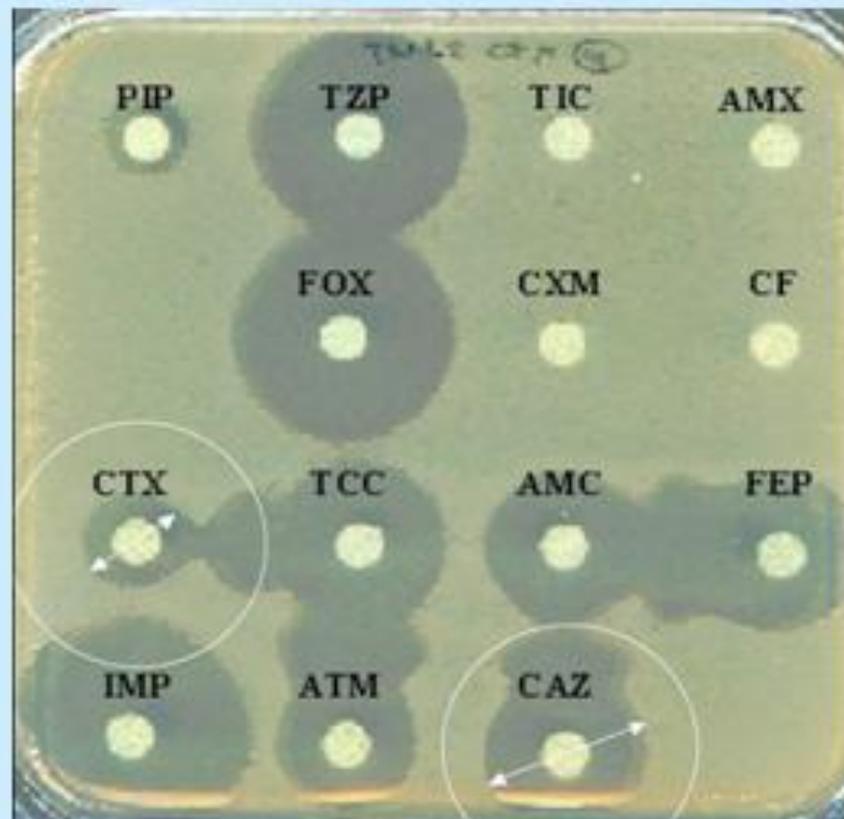


Nouvelles exigences norme NF EN ISO 15189 (2012): réactifs , essais d'acceptation

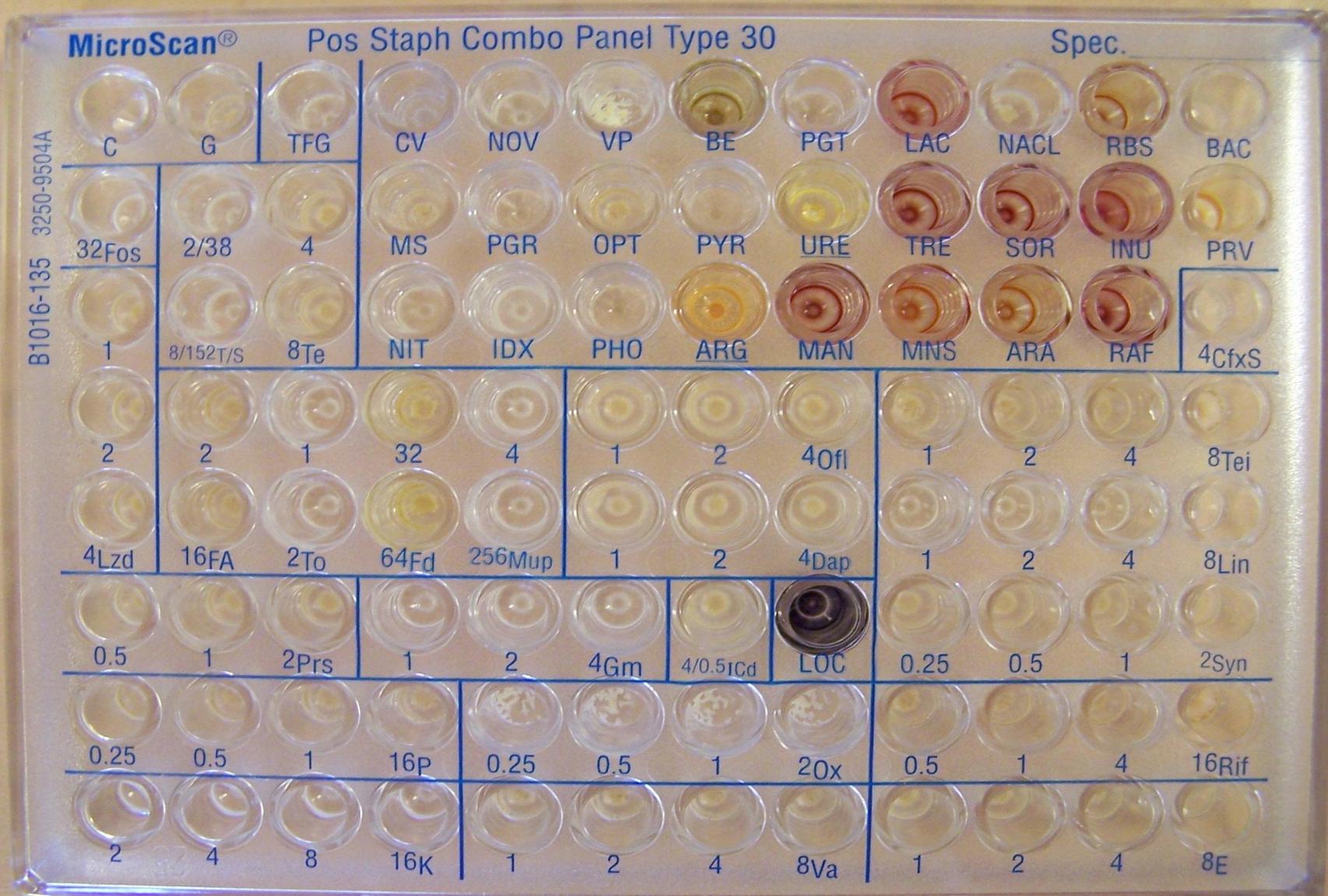
- **« 5.3.2.3: Chaque nouvelle formulation de trousse de réactif prêts à l'emploi résultant de modification de réactifs ou de procédure, un nouveau lot de fabrication ou une nouvelle expédition doit être vérifiée en termes de performance avant leur utilisation »**
- **« 5.3.2.7: les enregistrements doivent être conservés.....confirmant... l'aptitudede performance... »**
- **Conséquences: réaliser les contrôles nécessaires avant utilisation, idéalement à réception**

Méthodes manuelles : ex. 14 disques et 1 milieu = 15 réactifs

E. Coli BLSE CTX-M



Méthodes automatisées : 1 réactif Microscan (SIEMENS), Phoenix(BD), Vitek (bioMérieux)



Tests de sensibilité à partir de liquides biologiques:

- **Légitime dans les cas d'urgence** où la vie du patient est menacée: septicémie, méningite.
- Tenter d'obtenir un antibiogramme directement à partir du prélèvement avec examen direct positif (voire identification connue): hémocultures, LCR par exemple.
- **Conditions de réalisation éloignées des conditions standards:** charge d'inoculum, pureté
- Pratique non validée par les fournisseurs et L'EUCAST
- Validation en interne nécessaire: portée B

Conclusion:

- **Antibiogramme issu d'un processus complexe:** résultante composite de plusieurs résultats issus de plusieurs méthodes choisies en fonction de chaque couple bactérie-antibiotique et d'une « lecture interprétative » comportant une part de subjectivité.
- **Vérification des méthodes:** approche privilégiant l'analyse des risques, les programmes de contrôle de qualité, l'évaluation des compétences des personnels concernés.
- **Rôle primordial du microbiologiste:** traitements des échantillons, critères d'interprétation conduisant à la réalisation des antibiogrammes, connaissance des recommandations, les choix des méthodes, expertise et validation du résultat
- **Etape postanalytique:** avec le conseil thérapeutique

Tout ce qui est simple est faux et tout ce qui est complexe est inutilisable: Paul Valéry

