

Procédures Opérationnelles Standardisées

Identification et Caractérisation de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*

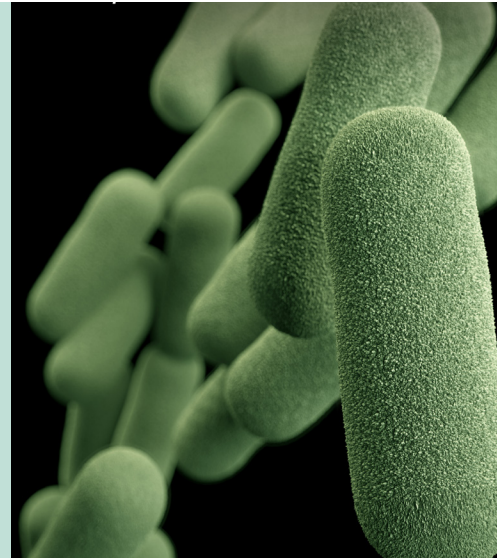


Table des matières

Préface / Résumé	2
Note sur l'Editeur	3
1. Procédure de la cytologie quantitative – énumération des cellules	5
2. Procédure de la cytologie quantitative – formule leucocytaire	10
3. Procédure de la coloration de gram	14
4. Procédure du test de la catalase.....	19
5. Procédure du test de l'oxydase.....	22
6. Procédure du Test o-Nitrophényl β -D-Galactopyranoside (ONPG)	25
7. Procédure du Test Gamma-Glutamyl-Bêta-Naphthylamide (GGT)	28
8. Procédure du Test du Solubilité Biliaire	31
9. Procédure du test de la gélose trypticase cystine (CTA)	35
10. Procédure de l'Optochine	39
11. Procédure du test d'exigence en facteurs X et V.....	42
12. Procédure du test d'agglutination sur lame	46
13. Procédure du test de diffusion en gélose de Kirby-Bauer	52
14. Procédure du test d'Epsilometer (E-Test)	58
15. Procédure de la méthode sensitière de microdilution	64
16. Procédure du test NH d'API®	71

Préface / Résumé

La méningite bactérienne, généralement causée par *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, et *Streptococcus pneumoniae*, constitue une menace pour la santé publique dans le monde entier. Le plus lourd fardeau de la méningite à méningocoque se trouve dans une région de l'Afrique subsaharienne appelée la ceinture de la méningite, qui s'étend du Sénégal à l'Éthiopie. Les pays de la ceinture de méningite connaissent des flambées de méningite saisonnières ponctuées d'épidémies périodiques.¹ Avant l'introduction du vaccin conjugué contre le méningocoque du séro groupe A (MenAfriVac™) en 2010, 90% des cas et des épidémies d'infection à méningocoque étaient causés par le séro groupe A dans la ceinture de la méningite. La vaccination MenAfriVac™ a éliminé les épidémies de méningite causées par le séro groupe A méningococcique.² Cependant, les séro groupes non-NmA, y compris NmW, NmX, et NmC, restent une menace et continuent de provoquer des épidémies et des maladies dans la région. Notamment, une nouvelle souche de NmC a émergé ces dernières années et a été responsable de multiples épidémies.^{3, 4, 5}

Des méthodes rapides et précises pour la détection de ces agents pathogènes sont essentielles pour la surveillance et la riposte aux épidémies. Ce manuel contient un ensemble de procédures opérationnelles standardisées pour l'identification et la caractérisation d'agents pathogènes de la méningite bactérienne provenant du liquide céphalo-rachidien. Ces procédures ont été utilisées lors de deux ateliers de bactériologie tenu à Atlanta (Géorgie) aux États-Unis : un atelier pour les pays francophones d'Afrique en septembre 2017 et un autres pour les pays anglophones d'Afrique et de l'Asie du sud en octobre 2018. Les deux ateliers ont été coparrainé par Association of Public Health Laboratories (APHL), Georgia Public Health Laboratory, et Centers for Disease Control et Prévention des États-Unis (CDC). Ce manuel servira de ressource technique pour les laboratoires aux niveaux nationaux et locaux afin d'améliorer la détection de la méningite bactérienne et la qualité des méthodes de laboratoire.

Citations

1. Lapeyssonnie L. [Cerebrospinal Meningitis in Africa]. Bull World Health Organ 1963; 28 Suppl:1-114.
2. Meyer SA, Novak RT. Effect of a vaccine to prevent serogroup A *N meningitidis* epidemics in Africa. Lancet Infect Dis 2017; 17:789-90.
3. Sidikou F, Zaneidou M, Alkassoum I, et al. Emergence of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup C in Niger, 2015: an analysis of national surveillance data. Lancet Infect Dis 2016; 16:1288-94.
4. Nnadi C, Oladejo J, Yennan S, et al. Large outbreak of *Neisseria meningitidis* serogroup C - Nigeria, December 2016-June 2017. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2017; 66:1352-6.
5. Bozio CH, Vuong J, Dokubo EK, et al. Outbreak of *Neisseria meningitidis* serogroup C outside the meningitis belt-Liberia, 2017: an epidemiological and laboratory investigation. Lancet Infect Dis 2018; 18:1360-1367

Remerciements

Nous remercions le Dr Seydou Diarra d'avoir servi d'éditeur au manuel. Nous remercions également les chefs des laboratoires nationaux de référence pour la méningite, originaires de pays (Prof Rasmata Ouedraogo, Centre Hospitalier Universitaire Pédiatrique Charles de Gaule, Burkina Faso; Prof Abdoul-Salam Ouedraogo, Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou, Burkina Faso; Dr Seydou Diarra, Institut National de Référence de Santé Publique, Mali; Dr Kadidja Gamougam, Hôpital Général de Référence National, Chad; Mr. Didier Mounkoro, Agence de Médecine Préventive), Dr Lesley McGee, CDC *Streptococcus* Laboratory), et des membres présents et passés du laboratoire CDC sur la méningite bactérienne pour avoir la rédaction et la révision critique du manuel (Dr Sama Adnan, Dr Sean Buono, Dr Alicia Feagins, Mme Lena Mutuiri, Dr Mariétou F. Paye, Mme Sarah K Payamps, Dr Caelin Potts, Dr Lorraine D. Rodriguez-Rivera, Dr Yibayiri O. Sanogo, Mme Jeni T. Vuong, Dr Xin Wang et Mme Melissa Whaley). Nous remercions spécialement APHL pour son soutien technique et logistique.

Note sur l'Editeur

Le Dr Seydou Diarra est né à Markala, au Mali. Il a obtenu son baccalauréat et sa maîtrise en biologie à l'Université Babes-Boyai (Cluj-Napoca, Roumanie) en 1979. Il a ensuite obtenu un diplôme de deuxième cycle en microbiologie alimentaire et en hygiène, et un certificat en hématologie à l'Institut Pasteur de Lille, France. Les domaines de recherche de Dr Diarra incluent la méningite bactérienne, les maladies entériques bactériennes et virales, la résistance aux antimicrobiens, et le diagnostic moléculaire.

Le Dr Diarra a été le chef du laboratoire de référence en bactériologie et virologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) du Ministère de la Santé de la République du Mali de 2003 jusqu'à sa retraite en 2017. Il continue toutefois de diriger le programme de l'Agenda Global de Sécurité de Santé (Global Health Security Agenda ; GHSA) axé sur la résistance aux antimicrobiens et le renforcement du système de laboratoire au Mali.

Le Dr Diarra a publié de nombreux articles dans des revues scientifiques nationales et internationales, comme auteur et co-auteur pour manuels tel que les manuels de laboratoire, notamment le Plan de travail du Mali sur l'assurance de la qualité des laboratoires médicaux, le Plan national de travail des laboratoires nationaux de lutte contre le VIH / sida et la Politique malienne de laboratoires nationaux. Plan Stratégique de Laboratoire de 2013. Il a également développé des modules de formation sur l'utilisation des méthodes de diagnostic en laboratoire pour les maladies à potentiel épidémique (<http://www.globe-network.org/fr/maladies-a-potentiel-epidémique>).

Le Dr Diarra a servi comme facilitateur d'un atelier de bactériologie pour les pays francophones d'Afrique utilisant les protocoles publiés dans ce manuel. L'atelier s'est tenu à Atlanta, Géorgie, États-Unis (septembre 2017) et a été coparrainé par l'Association of Public Health Laboratories, Georgia Public Health Laboratory, et Centers for Disease Control and Prevention (CDC). En outre, Dr Diarra a participé à la rédaction du manuel en français en collaboration avec des experts en la matière du CDC, lors d'un congé sabbatique avec le Laboratoire de la Méningite Bactérienne du CDC à Atlanta en 2018.

1. Procédure de la cytologie quantitative – énumération des cellules

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour utiliser un hématimètre et obtenir le nombre de globules blancs d'un liquide céphalo-rachidien (LCR) de patient suspecté de méningite bactérienne.

2.0 Principe

Les comptes de leucocytes (leucocytes) sont effectués chez les patients suspectés de méningite bactérienne, car un nombre accru de leucocytes peut indiquer une infection. Pour cette procédure, les leucocytes sont comptés à l'aide d'un hématimètre (lame de microscope conçue pour faciliter le comptage cellulaire). La chambre à liquide d'un hématimètre contient un volume très précis, permettant de compter un petit nombre représentatif de cellules et de l'utiliser pour calculer la concentration de cellules dans un LCR. La chambre d'hématimètre est aussi gravée de lignes pour faciliter le processus de comptage.

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
LCR	Liquide céphalo-rachidien
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Microscope
3. Pipette de 2-20 µL
4. Pipettes de 20-200 µL et 200-1000 µL - uniquement si des dilutions de LCR sont nécessaires
5. Un hématimètre
6. Lamelles planes pour la cellule de l'hématimètre (une couverture de l'hématimètre a une taille et un poids spécifiques).
 - a. *Remarque* : L'utilisation d'un type de lamelle différent pourrait affecter le volume de la chambre et le décompte final, selon le fabricant.
7. *Optionnelle* : Compteur mécanique

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Eau distillée
2. 70% d'éthanol
3. Solution de 0,85% saline (utilisée uniquement pour les LCRs troubles)
4. Acide acétique, 1N (utilisé uniquement dans les LCRs hématiques)
 - a. Diluer à 0,5% avant utilisation (0,5 mL d'acide acétique 1N dans 100 mL d'eau distillée).

6.0 Consommables

1. Embout pipette de 2-20 µL

Procédure de la cytologie quantitative – énumération des cellules

2. Embouts pipettes de 20-200 μL et 200-1000 μL - uniquement si des dilutions de LCR sont nécessaires
3. Microtubes de 1,5 mL (requis uniquement si des dilutions de LCR sont nécessaires)
4. Sac poubelle biorisque
5. Conteneur biorisque pour objets tranchants, si applicable
6. *Optionnelle* : écouvillon Dracon polyester

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Si applicables, les objets tranchants doivent être mis au rebut dans un conteneur biorisque résistant à la perforation.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits (exemple : acide acétique) pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

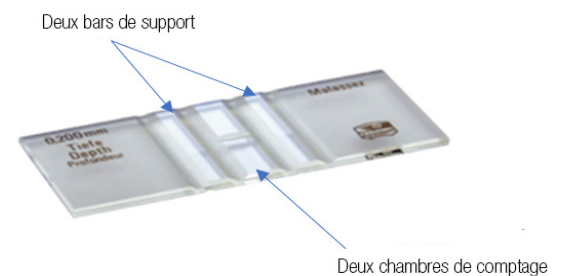
1. LCR fraîchement collecté (analyser dans les 30 minutes qui suivent sa collection).
2. Les propriétés du LCR (turbidité ou présence de globules rouges) détermineront si un traitement supplémentaire est nécessaire avant le comptage.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

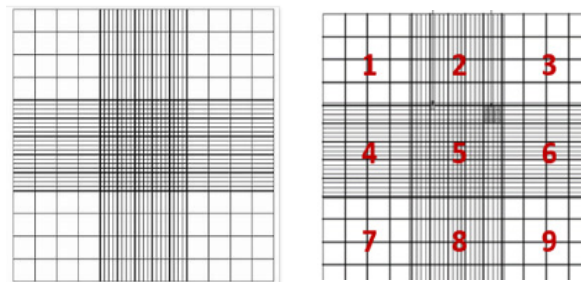
Charger seulement le réactif diluant (solution saline ou d'acide acétique) dans la chambre de l'hématimètre pour confirmer qu'il ne contient ni artefacts ni débris.

10.0 Procédure

1. Préparer et charger le LCR dans l'hématimètre au sein d'un PSM si possible.
2. Préparer le LCR pour le chargement sur l'hématimètre.
 - a. LCR claire : aucun traitement requis.
 - b. LCR turbide : Diluer le LCR à 1 sur 10 avec une solution saline (exemple : 100 μL de CSF dans 900 μL de solution saline).
 - c. LCR hématiche : Pour lyser les globules rouges, diluer le CSF avec 0,5% d'acide acétique en utilisant un facteur de dilution compris entre 1 sur 2 et 1 sur 20.
 - i. Si de l'acide acétique n'est pas disponible, le LCR peut être dilué avec une solution saline. Lors de la sélection d'un facteur de dilution, rappelez-vous que les globules blancs seront également dilués.
3. Charger l'hématimètre
 - a. Placer la chambre d'hématimètre sur une surface plane.



- b. *Optionnelle* : À l'aide d'eau distillée, humidifier les deux bars de support (bords surélevés) de l'hématimètre à l'aide d'un écouvillon légèrement humide pour améliorer l'adhérence de la lamelle à la chambre.
- i. *Remarque* : Ne pas humidifier la chambre elle-même et aucun excès d'eau ne doit être visible dans la chambre.
- c. Mélanger doucement le LCR pour obtenir une solution homogène avant le chargement.
- d. À l'aide d'une pipette, ajouter 10 μL de LCR (ou de LCR dilué) dans la chambre de l'hématimètre (distribution du liquide à la jonction de l'hématimètre et de la lamelle couvre-objet).
- i. *Remarque* : Vérifier qu'il n'y a pas de bulles ni de débordement de la chambre (déversement de liquide dans les creux entre la chambre et les rebords surélevés).
- ii. Si des bulles d'air ou un débordement sont observés, nettoyer la chambre avec de l'éthanol à 70% et recharger la chambre.
4. Effectuer le comptage du nombre de cellules à l'aide d'un microscope
- a. Placer l'hématimètre sur la platine du microscope et observer les cellules à l'aide d'un objectif 40X.
Remarque : il peut être plus facile de rechercher initialement les lignes de la grille de l'hématimètre à l'aide de l'objectif 10X, puis d'augmenter l'objectif à 40X.
- b. Considérations générales pour compter les cellules :
- i. Les globules blancs doivent avoir des bordures cellulaires nettes / définies et une lumière diffracte lorsque la mise au point est ajustée (presque comme une lueur / un halo).
- ii. Les débris cellulaires ou les artefacts peuvent être observés sous forme de taches ne présentant pas de frontières cellulaires claires et ne diffractant pas la lumière. Ceux-ci ne devraient pas être comptés.
- iii. Les globules rouges auront un pigment. Ces artefacts ne doivent pas être comptés comme un globule blanc ; si un échantillon est très sanglant, envisager de le diluer comme décrit ci-dessus.
- iv. Le laboratoire devrait établir une méthode normalisée de calcul du nombre de « cellules agglomérées ».
Par exemple :



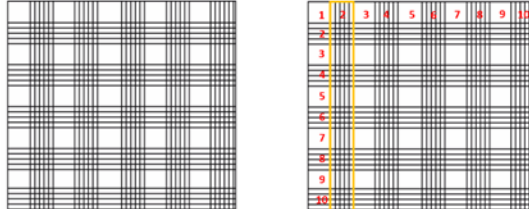
1. Compter chaque cellule dans le bloc.
 2. *Remarque* : en présence de nombreux amas, envisager de mélanger doucement le LCR et de le recharger.
- c. Compter les cellules présentes dans la chambre.
- i. *Remarque* : Vous trouverez ci-dessous des exemples de comptage avec un hématimètre de Neubauer et de Malassez, mais d'autres types peuvent également être utilisés.
- ii. Utilisation d'un hématimètre Neubauer.
1. L'hématimètre a 9 quadrants (marqués en rouge), orientés selon une disposition 3x3 et chaque quadrant contient un volume de 0,1 mm^3 ($\text{mm}^3 = \mu\text{L}$).
 2. Compter les cellules dans au moins quatre quadrants de la chambre de comptage ; si seulement quelques cellules sont présentes, compter les neuf quadrants.
 - a. Si des cellules sont présentes sur les bordures extérieures du quadrant : N'incluez que les cellules touchant les bordures supérieure et gauche. Excluez les cellules touchant les bordures extérieures inférieure et droite.

3. Calculer la concentration de globules blancs en utilisant la formule suivante

$$(\text{Nombre de cellules comptées} \times \text{dillution}) / (\text{nombre de quadrants utilisés} \times 0,1 \text{ mm}^3) = \text{cellules/mm}^3$$

Exemple : Si vous comptez 100 cellules dans 5 quadrants utilisée sans dilution –

$$(100 \text{ cellules} \times 1) / (5 \times 0,1 \text{ mm}^3) = (200 \text{ cellules})/\text{mm}^3$$



iii. Utilisation d'un hématimètre de Malassez.

1. L'hématimètre a 100 quadrants orientés dans une disposition 10x10. Dix quadrants en tout forment une bande dans l'hématimètre (boîte jaune).

a. Le volume total de la grille est de 1 μL ($\text{mm}^3 = \mu\text{L}$), chaque quadrant ayant un volume de 0,01 mm^3 .
Chaque bande contient 10 quadrants ou un volume de 0,1 mm^3 .

2. Compter les cellules dans au moins 50 quadrants (5 bandes) de la chambre de comptage ; si seulement quelques cellules sont présentes, compter les 100 quadrants (10 bandes).

a. Si des cellules sont présentes sur les bordures extérieures du quadrant : Incluez uniquement les cellules touchant les bordures supérieure et gauche. Excluez les cellules touchant les bordures inférieure et droite.

3. Calculer la concentration de globules blancs en utilisant la formule suivante

a. Le comptage des quadrants :

$$(\text{Nombre de cellules comptées} \times \text{dillution}) / (\text{nombre de quadrants utilisés} \times 0,01 \text{ mm}^3) = \text{cellules/mm}^3$$

Exemple : Si vous comptez 100 cellules dans 50 quadrants sans dilution utilisée –

$$(100 \text{ cellules} \times 1) / (50 \times 0,01 \text{ mm}^3) = (200 \text{ cellules})/\text{mm}^3$$

b. Le comptage des bandes :

$$(\text{Nombre de cellules comptées} \times \text{dillution}) / (\text{nombre de bandes utilisés} \times 0,1 \text{ mm}^3) = \text{cellules/mm}^3$$

Exemple : Si vous comptez 100 cellules dans 8 bandes / bandes sans dilution utilisée –

$$(100 \text{ cellules} \times 1) / (8 \times 0,1 \text{ mm}^3) = (125 \text{ cellules})/\text{mm}^3$$

11.0 Interprétation des Résultats

1. Une fois que les nombres de globules blancs ont été obtenues, reportez-vous aux instructions appropriées pour déterminer si les nombres de globules blancs du patient se situent dans les limites. Les directives de l'OMS se trouvent au chapitre 6 de [3].

Remarque : le nombres de globules blancs attendues dans le LCR varient en fonction de l'âge du patient, car les nourrissons n'ont souvent pas de barrière hémato-encéphalique complètement développée.

12.0 Limites du test

1. Si le test n'est pas terminé dans les 30 minutes qui suivent la collecte de LCR, une lyse de globules rouges ou blancs peut déjà s'être produite, ce qui entraîne des interprétations erronées.

2. Les débris cellulaires ou autres artefacts peuvent être interprétés de manière inappropriée comme des cellules, résultant à un nombre de cellules inexact.
3. Lorsque peu de cellules sont présentes dans la chambre, le test est plus sujet aux erreurs d'échantillonnage et peut donner à un nombre de cellules imprécis.
4. Le nombre de cellules peut varier d'un opérateur à l'autre.

13.0 Références

1. Rahimi J, Woehrer A. Overview of cerebrospinal fluid cytology. *Handb Clin Neurol.* 2017;145:563-71.
2. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol.* 2006;13(9):913-22.
3. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.
4. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, et al. Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In: Gilhus NE, Barnes P, Brainin M, editors. *European Handbook of Neurological Management.* 1. 2nd ed: Blackwell Publishing Ltd.; 2011. p. 5-17.

2. Procédure de la cytologie quantitative – formule leucocytaire

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour identifier et compter les différents types de globules blancs (leucocytes) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients suspectés de méningite bactérienne.

2.0 Principe

Le test détermine la formule des leucocytes (le pourcentage de différents types de leucocytes dans le frottis sanguin ou LCR). Pour ce test, les cellules d'un LCR sont placées sur une lame de microscope et colorées avec les réactifs de May-Grünwald et de Giemsa afin de différencier les noyaux cellulaires du cytoplasme. En utilisant la forme de la cellule et le schéma de coloration, différents types de leucocytes (éosinophiles, lymphocytes, et neutrophiles) peuvent être identifiés et comptés. Le type prédominant de leucocytes présents dans le LCR peut indiquer le type d'infection présent (viral ou bactérien).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
LCR	Liquide céphalo-rachidien
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Microscope
3. Pipette de 2-20 µL
4. Micro-centrifugeuse
5. *Optionnelle* : Compteur mécanique
6. *Optionnelle* : Bec Bunsen (requis uniquement si le méthanol n'est pas disponible)

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. 0,85% eau saline
2. Kit de coloration May-Grünwald-Giemsa
3. Méthanol à 70% (si indisponible, la fixation à la chaleur peut être utilisée)

6.0 Consommables

1. Embout pipette de 20-200 µL
2. Lame porte objet
3. Sac poubelle biorisque
4. Conteneur biorisque pour objets tranchants, si applicable

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Si applicables, les objets tranchants doivent être mis au rebut dans un conteneur biorisque résistant à la perforation.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits du kit de coloration May-Grünwald-Giemsa pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

LCR fraîchement collecté (analyser dans les 30 minutes qui suivent sa collection).

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

Charger seulement le réactif diluant (solution saline ou d'acide acétique) dans la chambre de l'hématimètre pour confirmer qu'il ne contient ni artefacts ni débris.

10.0 Procédure

1. Préparer et charger le LCR dans l'hématimètre au sein d'un PSM si possible.
 - a. Centrifuger 1 mL de LCR à 3000 tours / min pendant 5 minutes.
 - b. Sans toucher le culot, transférer le surnageant (la portion liquide) dans un autre tube et conservé pour un test au latex, si applicable
 - c. Re-suspendre le culot dans 200 µL de solution saline
 - d. Étaler 100 µL de la suspension du culot sur une lame porte objet en utilisant la pointe de l'embout d'une pipette.
 - i. *Remarque* : Si la suspension cellulaire est dense, étaler-la en une couche mince. Dans le cas contraire, concentrer en pipettant le volume complet sur une petite partie de la lame.
 - e. Laisser sécher à l'air
 - i. *Important* : les lames doivent être complètement sèches avant de continuer
2. Fixation des lames. La fixation du méthanol doit être réalisée dans un PSM si possible.
 - a. Fixation au méthanol (méthode recommandée)
 - i. Couvrir complètement les cellules sèches (ou inonder la lame) avec 95% de méthanol.
 - ii. Laisser la cellule sèche dans le méthanol pour incuber pendant deux minutes.
 - iii. Jeter tout excès de méthanol et laisser sécher complètement (ne pas toucher la surface frottée).
 - iv. *Remarque* : la fixation au méthanol est préférable car elle préserve mieux l'intégrité de l'échantillon que la fixation à la chaleur.
 - b. Fixation à la chaleur (utiliser cette méthode uniquement si le méthanol n'est pas disponible)
 - i. Passer rapidement la lame à travers une flamme à trois reprises.
 - ii. *Remarque* : Ne surchauffer pas la lame car une surchauffe entraînerait une distorsion ou une destruction importante des cellules.
3. Colorer le frottis avec le May-Grünwald-Giemsa conformément aux instructions du fabricant.
 - a. Les temps d'incubation et les concentrations de coloration exactes varient d'un fabricant à l'autre. Reportez-vous à

Procédure de la cytologie quantitative – formule leucocytaire

la notice du fabricant pour obtenir le protocole exact à utiliser.

- b. Le protocole général comprend :
 - i. Incuber le frottis avec la colorant de May-Grünwald.
 - ii. Diluer la colorant avec un tampon.
 - iii. Incuber le frottis avec une colorant de Giemsa.
 - iv. Rincer la lame avec un tampon approprié.
 - v. Laisser la lame sécher à l'air.
4. Une fois séché, examiner le frottis coloré au microscope avec à l'huile d'immersion utilisant l'objectif 100X.
 - a. *Remarque* : il peut être plus facile de commencer par identifier le plan focal approprié pour le frottis à l'aide d'un objectif 10X, puis de passer à un objectif 100X.
5. Chaque fois que possible, compter au moins 200 cellules sur la lame.
 - a. Dans une cellule, le cytoplasme apparaîtra en rose et le noyau en bleu.
 - b. Compte tenu de la forme des cellules et du schéma de coloration, compter le nombre de lymphocytes polymorphonucléaires (également appelés neutrophiles polymorphonucléaires ou granulocytes), de monocytes, et de lymphocytes.
6. Décontaminer la lame porte objet avec l'eau de javel après chaque utilisation, avant de la jeter dans un conteneur pour déchets biologiques biorisques.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Pour déterminer les différents types de globules blancs, reportez-vous à la notice du fabricant pour obtenir les modèles de coloration attendus. Des images représentatives sont présentes dans [1].
2. Une fois que les types de globules blancs ont été identifiés, vous pouvez déterminer la formule des leucocytes (le pourcentage de différents types de leucocytes dans le frottis). Reportez-vous aux instructions appropriées pour interpréter la formule des leucocytes. Les directives de l'OMS sont fournies au chapitre 6 de [3] et une description générale est donnée ci-dessous :
 - a. Si le LCR contient principalement des lymphocytes polymorphonucléaires (également appelés neutrophiles polymorphonucléaires ou granulocytes), cela peut indiquer une infection bactérienne.
 - b. Si le LCR contient principalement des lymphocytes et des monocytes, cela peut indiquer une infection virale.
 - c. Si le rapport entre les lymphocytes et les monocytes et les lymphocytes polymorphonucléaires est similaire, les résultats ne sont pas concluants.

12.0 Limites du test

1. Si le test n'est pas terminé dans les 30 minutes qui suivent la collecte de LCR, une lyse de globules rouges ou blancs peut déjà s'être produite, ce qui donne des interprétations erronées.
2. Lorsque peu de cellules sont présentes dans le LCR, le test est plus sujet aux erreurs d'échantillonnage et peut conduire à des décomptes inexacts.
3. Le nombre de cellules peut varier d'un opérateur à l'autre.

13.0 Références

1. Rahimi J, Woehrer A. Overview of cerebrospinal fluid cytology. *Handb Clin Neurol.* 2017;145:563-71.
2. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol.* 2006;13(9):913-22.
3. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.
4. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, et al. Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In: Gilhus NE, Barnes P, Brainin M, editors. *European Handbook of Neurological Management.* 1. 2nd ed: Blackwell Publishing Ltd.; 2011. p. 5-17

3. Procédure de la coloration de gram

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour la coloration de Gram sur les isolats bactériens ou directement sur le liquide céphalo-rachidien (LCR).

2.0 Principe

La coloration de Gram est une méthode qui permet de différencier les espèces bactériennes en deux grands groupes basés sur la structure de leur paroi. Les organismes à Gram positif retiennent la couleur du colorant cristal violet en raison du nombre d'acides téichoïques présents dans la paroi cellulaire et d'une perméabilité réduite aux solvants organiques en raison de leur faible nombre de lipides. Bien que les organismes à Gram positif absorbent également le contre-colorant, cela n'affecte pas leur couleur. Étant donné que les organismes à Gram négatif ont un nombre de lipides plus élevé, ils sont perméables aux solvants organiques et perdent le colorant cristal violet lors de l'étape de décoloration. Les bactéries à Gram négatif absorbent et conservent la couleur du contre-colorant, la safranine.

La couleur des bactéries colorées (ci-dessous) et la forme cellulaire peuvent être utilisées pour différencier les espèces bactériennes.

- Gram positif (+) : apparaissent en violet car ils conservent la couleur du premier colorant (cristal violet et complexe d'iode).
- Gram négatif (-) : Apparaît en rose car la couleur du premier colorant est enlevée par le décolorant et le contre-colorant est absorbé (safranine).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
LCR	Liquide céphalo-rachidien
+	Positif
-	Négatif
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.
3. Minuterie
4. Microscope
5. Pipette de 2-20 µL
6. Bec Bunsen (requis uniquement si le méthanol n'est pas disponible)

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. Kit de coloration Gram (conserver à température ambiante)

- a. Crystal Violet
 - b. Iodine
 - c. Décolorant
 - d. Safranine
 - e. *Remarque* : Si la safranine n'est pas disponible, vous pouvez utiliser de la fuchsine ou d'autres colorants. Dissoudre le contre-colorant dans le diluant approprié (varie entre les produits et les fabricants). Reportez-vous à la notice du produit pour préparer la solution
3. 95% Méthanol (si indisponible, la fixation à la chaleur peut être utilisée)
 4. Eau stérile ou eau stérile salinée (0.85% Chlorure de sodium, NaCl)

6.0 Consommables

1. Embout pipette de 2-20 µL
2. Ensemenceurs stériles
3. Conteneur biorisque pour objets tranchants
4. Lame porte objet
5. Crayon (pour étiqueter les lames)
6. Stylo imperméable/crayon de cire
7. Huile à immersion
8. Papier absorbant
9. Sac poubelle biorisque

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols.
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Les lames portes objets doivent être mises au rebut dans un conteneur résistant à la perforation pour les objets tranchants biorisques.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits qui seront utilisés pendant ce test pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. La coloration de Gram peut être réalisée avec les isolats bactériens ou le LCR.
2. Lors de la caractérisation des isolats bactériens, la coloration de Gram doit être effectuée à l'aide d'une sous-culture d'un individuel colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.

Procédure de la coloration de gram

3. Étiqueter la lame porte objet avec le numéro d'identification de l'échantillon.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité.
 - a. Cocci à Gram positif (comme *Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*)
 - b. Bacilles à Gram négatif (tels que *Haemophilus influenzae* ou *Escherichia coli*)
2. Avant leur utilisation, tester chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les organismes de contrôle de qualité doivent être inclus sur chaque lame.

10.0 Procédure

1. En utilisant un PSM chaque fois que possible, étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incubé pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
2. Préparation du frottis. Cette étape devrait être réalisée dans un PSM si possible.
 - a. Préparation d'un frottis à partir d'une culture bactérienne
 - i. Tracer un cercle sur la lame porte objet avec un crayon de cire ou un stylo imperméable.
 1. *Remarque* : Des frottis pour plusieurs isolats peuvent être produits sur une seule lame (un maximum de 3 est recommandé). Cependant, cette pratique augmente les risques de contamination croisée entre les échantillons et ne doit être utilisée que si un opérateur maîtrise parfaitement la méthode.
 - ii. À l'aide d'une pipette, ajouter environ 10 à 20 µL d'eau stérile ou une solution saline au cercle.
 - iii. Utiliser un enseigneur stérile pour prélever une seule colonie du milieu gélose incubé depuis hier.
 - iv. Agiter doucement l'enseigneur dans de l'eau stérile ou la solution saline pour créer une suspension légèrement trouble.
 - v. Laisser sécher à l'air.
 - vi. Répéter les étapes i-v pour d'autres isolats, si nécessaire.
 - b. Préparation d'un frottis à partir de LCR
 - i. Évaluer le volume de LCR disponible et passer à l'étape ii ou iii.
 - ii. Si <1 mL est disponible, garder quelques gouttes de LCR pour la coloration de Gram (aucune centrifugation nécessaire) et directement étaler le reste du LCR sur la gélose pour la croissance bactérienne (incuber pour une nuit à 35-37 °C sous 5% CO₂).
 1. Tracer un cercle sur la lame porte objet avec un crayon à cire ou un stylo imperméable
 2. À l'aide d'une pipette, ajouter quelques gouttes de LCR.
 3. Laisser sécher à l'air.
 - iii. Si > 1 mL est disponible, le LCR doit être centrifugé avant la coloration de Gram.
 1. Centrifuger le LCR pendant 10-15 minutes, 1000 x g
 2. Laissant le culot, transférer le portion liquide dans un autre tube et conserver pour le test au latex, le cas échéant.
 3. Mélanger vigoureusement le culot cellulaire.
 4. Placer 1 goutte (10-20 µL) du culot de LCR sur de la gélose pour la culture et incubé pour une nuit à 35-37 °C sous 5% CO₂.

5. Préparer le frottis de coloration de Gram du culot de LCR
 - a. Tracer un cercle sur la lame porte objet avec un crayon de cire ou un stylo imperméable
 - b. À l'aide d'une pipette, ajouter 1 à 2 gouttes du culot de LCR sur la lame.
 - c. Laisser sécher à l'air.
- iv. Important : les lames doivent être complètement sèches avant de continuer.
3. Fixation des lames. Si possible, la fixation du méthanol devrait être réalisée dans un PSM.
 - a. Fixation au méthanol (méthode recommandée)
 - i. Couvrir complètement la frottie des cellules sèches (ou inonder la lame) avec la solution de 95% méthanol.
 - ii. Incuber pendant deux minutes.
 - iii. Enlever tout excès de méthanol et laisser sécher complètement (ne pas toucher la surface frottie).
 - iv. *Remarque* : la fixation au méthanol est préférable car elle préserve mieux l'intégrité structurelle de la bactérie que la fixation à la chaleur.
 - b. Fixation à la chaleur (utiliser cette méthode uniquement si le méthanol n'est pas disponible)
 - i. Passer rapidement la lame à travers une flamme à trois reprises.
 - ii. *Remarque* : Ne surchauffer pas la lame car une surchauffe crée une distorsion significative ou une destruction des cellules.
4. Coloration des lames
 - a. *Remarque* : Appliquer les réactifs énumérés dans les prochaines étapes directement sur le frottis fixé. Éviter de toucher la lame avec le bout du flacon de réactif.
 - b. Inonder la lame avec du cristal violet pendant 1 minute.
 - c. Rincer à l'eau distillée, puis secouer pour éliminer l'excès d'eau.
 - d. Inonder la lame avec de l'iode de Gram pendant 1 à 2 minutes (voir les instructions du fabricant).
 - e. Rincer avec de l'eau distillée, puis secouer pour éliminer l'excès d'eau.
 - f. Rincer avec un décolorant pendant 5 à 15 secondes (consulter les instructions du fabricant) jusqu'à ce que la solution devienne claire.
 - g. Rincer à l'eau distillée, puis secouer pour éliminer l'excès d'eau.
 - h. Inonder la lame avec safranine pendant environ 1 minute pour contre-colorer.
 - i. Rincer à l'eau distillée, puis secouer pour éliminer l'excès d'eau.
 - j. Essuyer délicatement la lame avec du papier absorbant ou une serviette en papier propre pour éliminer l'excès d'eau et laisser sécher à l'air.
 - k. Une fois séché, examiner le frottis coloré au microscope avec un objectif 100X sous l'immersion dans l'huile.
 - i. *Remarque* : il peut être plus facile de commencer par identifier le plan focal approprié pour le frottis à l'aide d'un objectif 10X, puis de passer à un objectif à immersion dans l'huile 100X.

11.0 Interprétation des Résultats

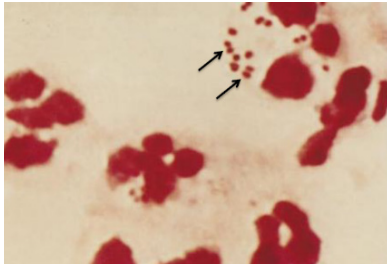
1. L'interprétation de la coloration de Gram nécessite la consignation de la couleur et de la morphologie.

Organisme	Gram	Morphologie	Couleur (Safranine)
<i>N. meningitidis</i>	-	Diplocoques en grain de café	Entre les couleurs rose à rouge
<i>H. influenzae</i>	-	Coccobacilles ou bacilles	Entre les couleurs rose à rouge
<i>S. pneumoniae</i>	+	Diplocoques, cocci, en forme de lancette parfois en courtes chaînettes	Entre les couleurs du bleu au violet

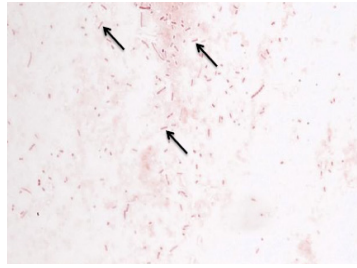
Procédure de la coloration de gram

2. Representative Gram stain images (from [1]).

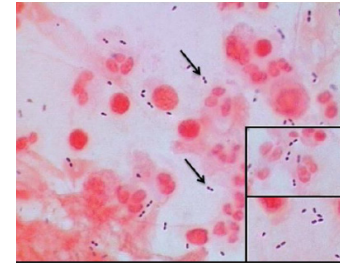
N. meningitidis



H. influenzae



S. pneumoniae



12.0 Limites du test

1. Il est recommandé d'utiliser des bactéries issues d'une culture de 18 à 24 heures sur un milieu non sélectif. Une culture avec une croissance > 24 heures affectera les résultats de la coloration de Gram.
2. Une décoloration insuffisante ou excessive peut affecter l'interprétation.
 - a. Les bactéries Gram (+) peuvent apparaître Gram (-) par décoloration excessive.
 - b. Gram (-) peut apparaître Gram (+) par une décoloration insuffisante.
3. Si le frottis est trop épais, les bactéries Gram (-) peuvent ne pas être complètement décolorées pendant les étapes de décoloration et pourront apparaître comme des bactéries Gram (+).
4. La fixation à une chaleur excessive peut altérer la morphologie cellulaire.
5. Les traitements antibiotiques peuvent affecter la paroi cellulaire, créant des organismes déformés ou extrêmement longs et affecter l'interprétation. Par exemple, des échantillons en forme de coques peuvent apparaître bacillus si le patient suit un traitement antimicrobien.
6. Des formes coccoïdes ou des éléments fongiques, ainsi que d'autres artefacts ou matériaux de fond, peuvent apparaître sur la lame à la suite d'un cristal violet précipité.

13.0 Références

1. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.
2. Principles of Stains and Media. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. 2007. ASM Press.

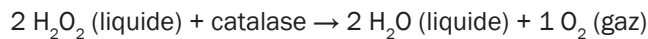
4. Procédure du test de la catalase

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour identifier l'expression de l'enzyme catalase par un organisme.

2.0 Principe

Certaines bactéries produisent de la catalase, une enzyme qui facilite la détoxification cellulaire. La catalase neutralise les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en décomposant H_2O_2 en eau liquide (H_2O) et en oxygène gazeux (O_2). La formation des bulles observé pendant la réaction est dû à la production et à la libération de gaz oxygène, qui représentent une réaction positive de la catalase.



Le test de la catalase peut être utilisé pour distinguer les cocci à Gram positif tels que les *Staphylococcus* (catalase positifs) des *Streptococcus* / *Enterococcus* (catalase négatifs).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO_2
 - a. Si aucun incubateur à CO_2 n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO_2 suffit.

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. Solution de 3% H_2O_2 (conserver dans une bouteille sombre, à l'abri de la lumière, et dans le réfrigérateur)
 - a. Si vous commencez avec la solution de 30 % H_2O_2 , faite une dilution à 1 : 10 avant utilisation.

6.0 Consommables

1. Ensemenceurs stériles ou écouvillons Dracon polyesters
2. Pipette de transfert ou pipette pasteur
3. Tubes d'essai de 5 mL ou lame porte objet
4. Conteneur biorisque pour objets tranchants
5. Sac poubelle biorisque

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.

Procédure du test de la catalase

2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Les lames portes objets doivent être mises au rebut dans un conteneur résistant à la perforation pour les objets tranchants biorisques.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité du produit qui sera utilisé (H_2O_2) pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Lors de la caractérisation des isolats bactériens, ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individuel colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO_2) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Étiqueter la lame porte objet ou les tubes avec le numéro d'identification de l'échantillon.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) - positif (bulle visible, la production d' O_2).
 - b. *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6305) - négatif (pas de formation de bulle d' O_2).
2. Avant leur utilisation, tester chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les souches de CQ doivent être incluses chaque jour où le test est effectué.

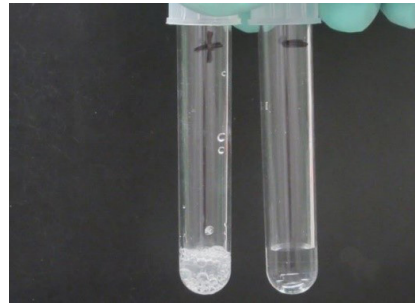
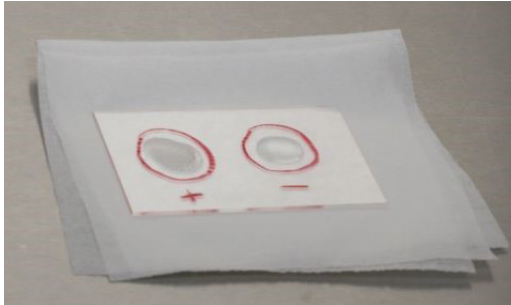
10.0 Procédure

1. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
2. Étaler les bactéries sur le milieu gélose approprié et incubé pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO_2 .
3. Méthode du tube (fortement recommandée pour des raisons de biosécurité. La réaction catalase produit des aérosols, qui sont mieux contenus dans un tube que sur une lame)
 - a. À l'aide d'un ensemenceur, collecter quelques colonies d'une culture pure incubée depuis hier et étaler-les à la base du tube d'essai.
 - i. Veillez à NE PAS transférer de gélose au sang (voir les limites du test).
 - b. Ajouter 4-5 gouttes de 3% de H_2O_2 dans chaque tube d'essai.
 - c. Fermer rapidement le tube.
 - d. Observer immédiatement la présence de bulles d' O_2 .
4. Méthode sur lame porte objet (utiliser cette méthode uniquement si des tubes de 5 mL ne sont pas disponibles)
 - a. Utilisant un ensemenceur, collecter quelques colonies d'une culture pure incubée depuis hier et étaler les bactéries sur une lame porte objet.
 - i. Veillez à NE PAS transférer de gélose au sang (voir les limites du test).

- b. Ajouter 1-2 gouttes de 3% H_2O_2 à la lame.
- c. Observer immédiatement la présence de bulles.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Catalase Positif : Présence de bulles immédiatement après l'ajout d' H_2O_2 .
2. Catalase Négatif : Absence de bulles 20 secondes après l'ajout d' H_2O_2 .



12.0 Limites du test

1. La catalase n'est exprimée que dans des cultures viables. Par conséquent, ne testez pas les cultures de plus de 24 heures, car cela pourrait donner des résultats faux négatifs.
2. Les globules rouges des milieux géloses au sang expriment l'enzyme catalase. Pour éviter les résultats faussement positifs, ne collectez pas de la gélose au sang avec les bactéries.
3. La sélection de colonies avec un ensemenceur en métal peut conduire à des faux positifs.

13.0 Références

1. Algorithm for Identification of Aerobic Gram-Positive Cocci. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. 2007.
2. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.

5. Procédure du test de l'oxydase

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour effectuer le test de l'oxydase sur des isolats bactériens.

2.0 Principe

Le test oxydase détecte la présence de l'enzyme cytochrome oxydase et est utile pour différencier entre les espèces *Neisseria* et *Haemophilus* des espèces *Streptococcus*. Les espèces *Haemophilus* et *Neisseria* expriment l'enzyme cytochrome oxydase (oxydase positive), tandis que les espèces de *Streptococcus* (oxydase négative). Dans ce test d'oxydo-réduction, le dichlorhydrate de *N, N, N', N'*-tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD) sert de donneur d'électrons à la cytochrome oxydase. Si un organisme exprime l'enzyme cytochrome oxydase, le TMPD est oxydé, produisant un changement de couleur immédiat du clair au bleu (ou violet foncé).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. Bandelettes d'oxydase (Hardy Diagnostics, Catalogue No. Z93)
 - a. Si les bandes d'oxydase ne sont pas disponibles, vous aurez besoin :
 - i. Bandes de papier filtre (Whatman n ° 2 ou équivalent)
 - ii. Une boîte de Pétri ou une lame porte objet
 - iii. Réactif oxydase (par exemple, réactif de Kovac)
 - b. Ne pas utiliser de réactifs périmés ou décolorés.

6.0 Consommables

1. Ensemenceurs stériles, plastique ou platine seulement
2. Sac poubelle biorisque
3. Papier absorbant

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols

3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité du produit qui sera utilisé pour les informations de stockage, de manipulation et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Lors de la caractérisation des isolats bactériens, ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individuel colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) - oxydase positive
 - b. *Escherichia coli* (ATCC 51739) - négatif pour l'oxydase
2. Avant leur utilisation, tester chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les souches de CQ doivent être incluses chaque jour où le test est effectué.

10.0 Procédure

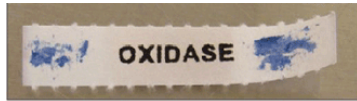
1. Préparer des bandelettes d'oxydase (passer à l'étape 2 si vous avez des bandelettes d'oxydase commercial déjà disponibles)
 - a. Placer une bande de papier filtre sur une lame porte objet ou dans une boîte de Pétri.
 - b. Imbiber le papier filtre avec quelques gouttes de réactif oxydase.
 - c. Laisser sécher le papier filtre à l'air avant de l'utiliser.
2. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
3. Étaler les bactéries sur le milieu gélose approprié et incubé pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
4. Pour minimiser la propagation potentiel de la contamination, placer une bande d'oxydase sur une serviette en papier.
5. Utiliser un enseigneur stérile pour prélever une seule colonie du milieu gélose incubé depuis hier.
6. Appliquer les bactéries sur la bandelette d'oxydase et observer le changement de couleur dans les 30 secondes qui suivent.
 - a. *Remarque* : Plusieurs isolats peuvent être testés sur une seule bandelette d'oxydase - veillez à étaler la bactérie sur des portions distinctes de la bandelette.
7. Une fois terminée, jeter la bandelette et l'essuie dans un sac poubelle biorisque.

11.0 Interprétation des Résultats

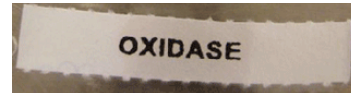
1. Oxydase positive : changement de couleur bleu ou violet foncé dans les 30 secondes qui suivent.
2. Oxydase négatif : pas de changement de couleur dans les 30 secondes qui suivent. Un changement de couleur après 30 secondes est également interprété comme un résultat négatif.

Procédure du test de l'oxydase

3. *Remarque* : Si vous préparez des bandelettes d'oxydase pour ce protocole (étapes 1a-c), reportez-vous aux instructions du fabricant du réactif oxydase dont vous utilisez pour confirmer le duration/temps d'incubation nécessaire pour l'interprétation des résultats.



Positive



Négative

Remarque : Les images des bandes positives et négatives pour l'oxydase ont été obtenues à partir de [1].

Organisme	Gram
<i>N. meningitidis</i>	+
<i>H. influenzae</i>	+
<i>S. pneumoniae</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	+
<i>E. coli</i>	-

12.0 Limites du test

1. N'utiliser pas d'ensemencement nichrome ou fer pour sélectionner une colonie, car cela pourrait donner des résultats faussement positifs.
2. La synchronisation est essentielle à la précision des tests. Les colonies âgées de plus de 18 à 24 heures peuvent produire des faibles réactions.
3. Les bactéries doivent être cultivées sur un milieu gélose approprié avant de procéder au test de l'oxydase.
 - a. Le test de l'oxydase ne doit pas être effectué sur des colonies cultivées sur un milieu contenant une concentration élevée de glucose, car la fermentation du glucose peut inhiber l'activité de l'oxydase.
 - b. Utiliser des supports non sélectifs et non différentiels pour garantir des résultats de test valides.

13.0 Références

1. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.
2. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. 2007.
3. Hardy Diagnostics. OxiStrips™ Oxidase Strips and OxiSticks™ Oxidase Swabs Available at: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/OxiStripsOxisticks.htm. Accessed October 30, 2019.

6. Procédure du Test o-Nitrophényl β-D-Galactopyranoside (ONPG)

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour identifier l'expression de l'enzyme β-galactosidase par un organisme.

2.0 Principe

Les disques de o-nitrophényl β-D-galactopyranoside (ONPG) détectent l'expression de la β-galactosidase et peuvent être utilisés pour différencier *Neisseria meningitidis* des autres espèces de *Neisseria*. La structure chimique de l'ONPG est similaire à celle du lactose et peut donc être clivée par l'enzyme β-galactosidase. Après clivage, ONPG produit du galactose et de l'o-nitrophénol, ce qui présente une couleur jaune à un pH physiologique (7,5) ou supérieur. *Neisseria lactamica* exprime l'enzyme β-galactosidase (produit un changement de couleur jaune), mais pas *Neisseria meningitidis* (aucun changement de couleur ne serait observé).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
ONPG	o-nitrophényl β-D-galactopyranoside
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C, sans CO₂
3. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.
4. Pipette de 200-1000 µL

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. o-Nitrophényl β-D-galactopyranoside (ONPG) Diatabs (Key Scientific, Rosco Diagnostica R050311, 50 disque/tube).
3. 0,85% solution de l'eau saline

6.0 Consommables

1. Tubes d'essai stérile de 5 mL
2. Support pour les tubes d'essai
3. Pipette de transfert ou pipette pasteur
4. Embout pipette de 200-1000 µL
5. Ensemenceurs stériles
6. Pince

Procédure du Test ONPG

7. Standard de turbidité McFarland 4,0
8. Sac poubelle biorisque
9. Conteneur biorisque pour objets tranchants

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Si applicables, les objets tranchants doivent être mis au rebut dans un conteneur biorisque résistant à la perforation.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité du produit ONPG pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individu colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultivez une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Étiquetez les tubes avec le numéro d'identification de l'échantillon et « ONPG ».

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utilisez les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Neisseria lactamica* (ATCC 23970) – ONPG positif
 - b. *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077) – ONPG négatif
2. Avant leur utilisation, testez chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les souches de CQ doivent être incluses à chaque fois que le test est effectué.
4. La solution saline doit être soumise à un contrôle de stérilité par CQ avant son utilisation dans les préparations des suspensions de bactéries.
 - a. Strier la solution saline sur le milieu gélose approprié et incubé dans des conditions de croissance normales. Confirmez qu'aucune croissance ne se produit avant le test.

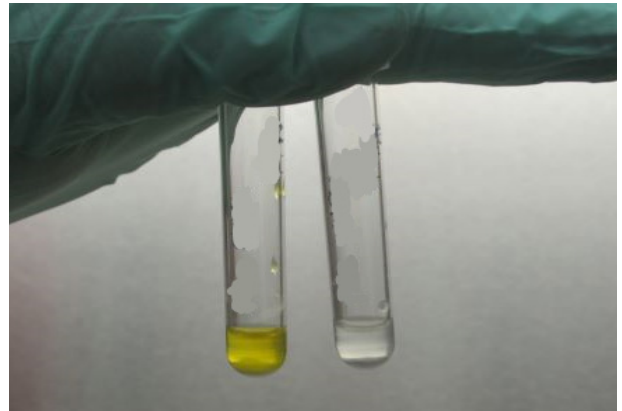
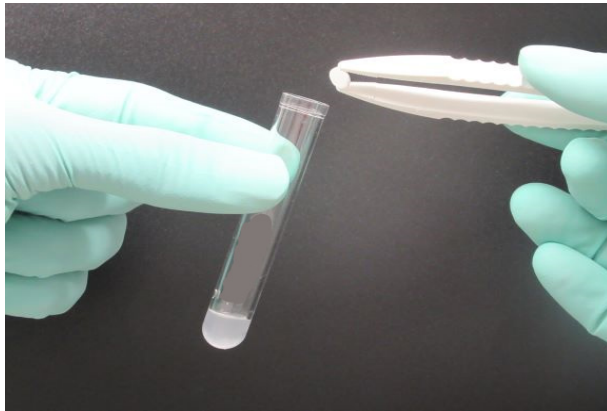
10.0 Procédure

1. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
2. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incubé pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
3. Ajouter 250 µL de solution saline dans un tube de 5 mL.
4. En utilisant un ensementeur et la culture bactérienne incubée depuis hier (étape no. 2), préparez une suspension bactérienne épaisse dans le tube, équivalente à un standard de turbidité McFarland 4,0.
5. Utilisant une pince, déposez délicatement une Diatab ONPG dans le tube.

6. Fermez le tube avec un capuchon sans complètement serrer.
7. Incuber à 35 - 37 ° C (sans CO₂) pendant 4 heures.
8. Vérifiez s'il y a pour un changement de couleur et enregistrez la lecture préliminaire (voir Interprétation des résultats).
9. Incuber pour une nuit à 35 et 37 ° C (sans CO₂).
10. Vérifiez s'il y a un changement de couleur le lendemain matin et enregistrez la lecture finale.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Les changements de couleur observés après 4 heures ou une incubation d'une nuit sont interprétés comme des résultats positifs.
2. ONPG positif : observation d'une couleur jaune.



3. ONPG négative : aucun changement de couleur ne serait observé.

12.0 Limites du test

1. Si la culture bactérienne semble naturellement avoir une couleur jaune, l'isolat ne doit pas être testé sur ONPG. Une suspension de la bactérie (sans comprimé ajouté) peut être utilisée comme contrôle pour confirmer que tout changement de couleur observé n'est pas dû à la culture elle-même.
2. Le pH de la réaction est important pour des interprétations précises.
 - a. Si la solution saline est tamponnée, les résultats risquent d'être inexacts.
 - b. Les réactions ne produiront pas de changement de couleur dans des conditions acides.

13.0 Références

1. Product insert with general instructions for use of Rosco Diagnostics Diatabs (Key Scientific). [https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Print%20Insert%20-%20Eng\(3\).pdf](https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Print%20Insert%20-%20Eng(3).pdf)
2. User's Guide Diatabs: Diagnostic tablets for bacterial identification (Key Scientific, procedure on p. 62 and additional information beginning on p. 71). <https://www.keyscientific.com/files/Other%20Manufacturers/Rosco/DiaTabs/Rosco%20DiaTabs.pdf>

7. Procédure du Test Gamma-Glutamyl-Bêta-Naphthylamide (GGT)

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour le gamma-glutamyl-bêta-naphthylamide (GGT) sur les isolats bactériens.

2.0 Principe

Le test GGT détecte l'expression de l'enzyme γ -glutamyl aminopeptidase. GGT est utile pour différencier *Neisseria meningitidis* des autres espèces de *Neisseria*. La décomposition de la GGT par la γ -glutamyl aminopeptidase produit de la β -naphthylamine, qui donne une couleur rouge en présence de p -diméthyl-amino-cinnamaldéhyde et de conditions acides (réactif PEP). *Neisseria meningitidis* exprime la γ -glutamyl aminopeptidase (GGT positive) et produira par conséquent une couleur rouge en présence du substrat GGT.

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
GGT	Gamma-glutamyl-bêta-naphthylamide
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C, sans CO₂
3. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.
4. Pipette de 200-1000 μ L

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. 0,85% solution de l'eau saline
3. Gamma-glutamyl-bêta-naphtylamide (GGT) Diatabs (Key Scientific - Rosco Diagnostica R046711, 50 disques / tube)
4. Réactif PEP (p -diméthyl-amino-cinnamaldéhyde dans l'acide chlorhydrique)
 - a. *Remarque* : Ce réactif peut être fourni avec les disques GGT. Sinon, utilisez Key Scientific - Rosco Diagnostica R092231, 3 mL / bouteille)

6.0 Consommables

1. Tubes à essai stérile de 5 mL
2. Support pour les tubes d'essai
3. Pipette de transfert ou pipette pasteur
4. Embout pipette de 200-1000 μ L

5. Ensemenceurs stériles
6. Pince
7. Standard de turbidité McFarland 4,0
8. Sac poubelle biorisque
9. Conteneur biorisque pour objets tranchants

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Si applicables, les objets tranchants doivent être mis au rebut dans un conteneur biorisque résistant à la perforation.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits GGT et PEP pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Lors de la caractérisation des isolats bactériens, ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individuel colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultivez une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Étiquetez les tubes avec le numéro d'identification de l'échantillon et « GGT ».

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utilisez les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Neisseria lactamica* (ATCC 23970) – GGT négatif
 - b. *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077) – GGT positif
2. Avant leur utilisation, testez chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les souches de CQ doivent être incluses à chaque fois que le test est effectué.
4. Le solution saline doit être soumise à un contrôle de stérilité par CQ avant son utilisation dans les préparations en suspension bactérienne.
 - a. Strier la solution saline sur le milieu gélose approprié et incuber dans des conditions de croissance normales. Confirmez qu'aucune croissance ne se produit avant le test.

10.0 Procédure

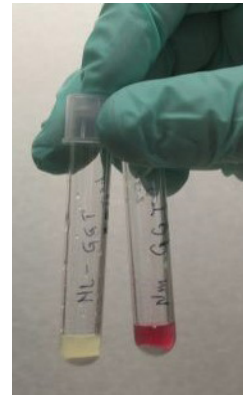
1. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
2. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incuber pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
3. Ajouter 250 µL de solution saline dans un tube de 5 mL.

Procédure du Test GGT

4. En utilisant un ensementeur et la culture bactérienne incubée depuis hier (étape no. 2), préparez une suspension bactérienne épaisse dans le tube, équivalente à un standard de turbidité McFarland 4,0.
5. Utilisant une pince, déposez délicatement une Diatab GGT dans le tube.
6. Fermez le tube avec un capuchon sans complètement serrer.
7. Incuber à 35 - 37 ° C (sans CO₂) pendant 4 heures.
8. Après les 4 heures d'incubation, ajouter trois gouttes de réactif PEP.
9. Incuber pour une nuit à une température entre 35 et 37 ° C (sans CO₂).
10. Observez le changement de couleur dans les cinq minutes suivant l'ajout du réactif PEP.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Les changements de couleur observés après 4 heures et l'ajout du réactif PEP sont interprétés comme des résultats positifs.
2. GGT positif : observation d'une couleur rouge dans 5 minutes suivant l'ajout du réactif PEP.
3. GGT négative : aucun changement de couleur ne serait observé dans les 5 minutes suivant l'ajout du réactif PEP.



12.0 Limites du test

1. Si la culture bactérienne semble naturellement avoir une couleur rose, l'isolat ne doit pas être testé sur GGT. Une suspension de la bactérienne (sans comprimé ajouté) peut être utilisée comme contrôle pour confirmer que tout changement de couleur observé n'est pas dû à la culture elle-même.
2. Le pH de la réaction est important pour des interprétations précises.
 - a. Si la solution saline est tamponnée, les résultats risquent d'être inexacts.
 - b. Les réactions ne produiront pas de changement de couleur dans des conditions acides.

13.0 Références

1. Product insert with general instructions for use of Rosco Diagnostics Diatabs (Key Scientific). [https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Print%20Insert%20-%20Eng\(3\).pdf](https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Print%20Insert%20-%20Eng(3).pdf)
2. User's Guide Diatabs: Diagnostic tablets for bacterial identification (Key Scientific, procedure p. 13-15). <https://www.keyscientific.com/files/Other%20Manufacturers/Rosco/DiaTabs/Rosco%20DiaTabs.pdf>

8. Procédure du Test du Solubilité Biliaire

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions permettant de distinguer *Streptococcus pneumoniae* de tous les autres *Streptococci* alpha-hémolytiques à l'aide du test de solubilité biliaire.

2.0 Principe

Le test de solubilité biliaire est une procédure qualitative basée sur l'observation selon laquelle *Streptococcus pneumoniae* se lyse en présence des sels biliaires dans des conditions de temps et de température spécifiques, tandis que d'autres streptocoques alpha-hémolytiques sont insoluble. Le mécanisme du test n'est pas complètement compris. Il est théorisé que la lyse dépend de la présence d'une enzyme autolytique intracellulaire, une amidase produite par *Streptococcus pneumoniae*. Les sels biliaires abaissent la tension superficielle entre la membrane cellulaire bactérienne et le milieu, accélérant ainsi le processus autolytique naturel de l'organisme ; Les sels biliaires activent également l'enzyme autolytique qui induit la disparition/ l'élimination de la bactérie. Le test de solubilité biliaire peut être effectué à l'aide d'une suspension bactérienne ou en appliquant le réactif des sels biliaires directement sur une colonie bactérienne.

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C, sans CO₂
3. Incubateur à 35–37°C avec 5% de CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.
4. Équipement pour la méthode du tube à essai uniquement
 - a. Pipette de 200-1000 µL
 - b. Vortex

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. 0,85% solution de l'eau saline
3. Sels biliaires (la concentration requise dépend de la méthode utilisée).
 - a. Méthode du tube : désoxycholate de sodium à 2% (à conserver entre 15 et 30 °C, à l'abri de la lumière)
 - i. Si aucune solution à 2% n'est disponible, dissolvez 0,2 g de désoxycholate de sodium dans 10 mL d'eau stérile.
 - b. Méthode directe sur milieu gélose : désoxycholate de sodium à 10% (à conserver entre 15 et 30 °C, à l'abri de la lumière).
 - i. Si la solution à 10% n'est pas disponible, elle peut être préparée à partir de la poudre. Dissolvez 10 g de désoxycholate de sodium dans 100 mL d'eau stérile.

Procédure du Test du Solubilité Biliaire

- c. Si vous utilisez un réactif commercial de sel biliaire, reportez-vous à la notice du fabricant pour obtenir des informations sur la concentration et les exigences (exemple : réactif pour les sels biliaires, Hardy Diagnostics, Cat # Z61).

6.0 Consommables

1. Sac poubelle biorisque
2. Pipette de transfert ou pipette pasteur
3. Matériels spécifiques à la méthode du tube
 - a. Tubes d'essai stérile de 5 mL
 - b. Écouvillons Dacron Polyester
 - c. Standard de turbidité McFarland de 0,5 ou 1,0
 - d. Embouts pipette de 200-1000 µL

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM).
4. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité du produit qui sera utilisé pendant ce test pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individuel colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultivez une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Si vous utilisez la méthode du tube à essai, étiquetez deux tubes avec le numéro d'identification de l'échantillon et « Biliaire » pour chaque isolat.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utilisez les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) – Sel Biliaire soluble
 - b. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) or *Streptococcus mitis* (ATCC 49456)– Sel biliaire insoluble
2. Avant leur utilisation, testez chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les souches de CQ doivent être incluses à chaque fois que le test est effectué.
4. La solution saline doit être soumise à un contrôle de stérilité par CQ avant son utilisation dans les préparations des suspensions de bactéries.
 - a. Strier la solution saline sur le milieu gélose approprié et incuber dans des conditions de croissance normales. Confirmez qu'aucune croissance ne se produit avant le test.

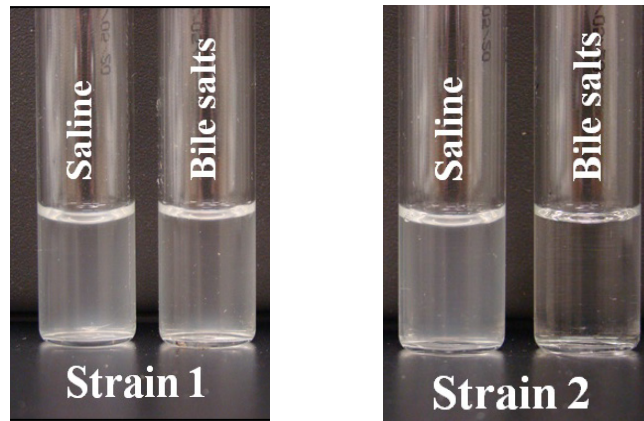
10.0 Procédure

1. *Remarque* : le stockage du réactif désoxycholate à des températures plus basses peut provoquer son épaissement. Réchauffez le flacon de réactif dans un incubateur à 37 °C (sans CO₂ et non utilisé pour la culture d'agents pathogènes) avant utilisation.
2. Il est fortement recommandé que les étapes suivantes (pour la méthode du tube à essai et la méthode du milieu gélose directe) soient complétées dans un PSM, si possible.
3. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incubé pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
4. Méthode du tube d'essai (méthode préférée)
 - a. Pipeter 1 mL de solution saline stérile à 0,85% dans un tube d'essai.
 - b. À l'aide d'un écouvillon, collecter les bactéries et les remettre en suspension dans le tube de solution saline pour préparer une suspension équivalente à un standard de turbidité McFarland de 0,5 à 1,0.
 - c. Transférer la moitié de la suspension bactérienne (0,5 mL) dans un deuxième tube contenant le numéro d'identification de l'échantillon.
 - d. Identifiez un tube "TEST" et l'autre "CONTROL".
 - e. Ajouter 0,5 mL de désoxycholate de sodium à 2% (sel biliaire) dans le tube étiqueté "TEST".
 - f. Ajouter 0,5 mL de solution saline à 0,85% dans le tube étiqueté "CONTROL".
 - g. Mélanger doucement chaque tube.
 - h. Incuber les tubes à 35 - 37 ° C (le CO₂ est préférable, mais on peut utiliser du non-CO₂) pendant 10 minutes. Observez le tube "TEST" pour noter la disparition de toute turbidité par rapport au tube "CONTROL".
 - i. Continuez à incuber les tubes pendant 2-3 heures maximum si le test est négatif au bout de 10 minutes. Observez le tube "TEST" pour noter la disparition de toute turbidité par rapport au tube "CONTROL".
5. Méthode de milieu gélose directe
 - a. *Remarque* : les résultats obtenus avec la méthode du milieu gélose directe peuvent être difficiles, raison pour laquelle la méthode de tube à essai est préférée.
 - b. Déposez une goutte de réactif sel biliaire (désoxycholate à 10%) près (ou sur) une colonie qui est âgée de 18 à 24 heures et est présumée d'être une colonie *Streptococcus pneumoniae*.
 - i. Ne touchez pas la surface de la gélose avec le bout du compte-gouttes de réactif biliaire.
 - c. Inclinez doucement la boîte de milieu gélose pour faire rouler la goutte sur plusieurs de ces colonies.
 - i. Veillez à ne pas déloger les colonies.
 - d. Incuber le milieu gélose ne mettant pas la boîte de milieu gélose à l'envers (le côté gélose devrait être vers le bas) à 35 - 37 °C pendant 30 minutes (sans CO₂).
 - e. Lorsque le réactif sur les colonies suspectes est sec, lisez, interprétez et enregistrez les résultats.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Méthode du tube à essai : Examinez le tube "TEST" pour détecter une perte de turbidité ou une perte de turbidité par rapport au tube "CONTROL" dans les deux à trois heures suivant l'incubation.
 - a. Résultats positifs : La solubilité dans le sel biliaire est démontrée par la disparition ou la perte de turbidité dans le tube "TEST" par rapport au tube "CONTROL".
 - i. *Remarque* : La disparition partielle (solubilité partielle) n'est pas considérée comme positive pour l'identification de *Streptococcus pneumoniae*. Les souches partiellement solubles avec leurs zones d'inhibition inférieures à 14 mm par le test optochine ne sont pas considérées comme des pneumocoques.

- b. Résultats négatifs : L'insolubilité dans la bile est démontrée par manque de changement ou un changement faible de la turbidité dans le tube «TEST» par rapport au tube «CONTROL».



Sel Biliaire Insoluble (-)

Sel Biliaire Soluble (+)

Figure 1: Image de la méthode du tube venant de [1].

2. Méthode par milieu gélose directe : Examiner le milieu gélose pour détecter la désintégration ou l'aplatissement des colonies traitées et / ou l'apparition d'une zone alpha-hémolytique sur le milieu dans les 30 minutes qui suivent l'incubation.
 - a. Résultats positifs : désintégration ou aplatissement des colonies et / ou apparition d'une zone alpha-hémolytique sur le milieu dans la zone traitée avec les sels biliaires.
 - b. Résultats négatifs : Aucun changement dans l'intégrité des colonies et / ou absence de zone alpha-hémolytique sur le milieu dans la zone traitée avec les sels biliaires.
 - c. Des images facilitant l'interprétation de la méthode du milieu gélose directe sont fournies dans [2].

12.0 Limites du test [2]

1. Une culture avec une croissance > 24 heures peut affecter les résultats du test car l'enzyme active risque d'être perdue et de donner un faux négatif. Par conséquent, Il est recommandé d'utiliser des bactéries issues d'une culture de 18 à 24 heures pour la préparation des suspensions salines.
2. L'autolyse normale de *Streptococcus pneumoniae* peut être inhibée si une concentration trop élevée en sels biliaires est utilisée. L'évaporation peut rendre le réactif plus concentré, ce qui affecte le test.
3. Lorsque vous effectuez le test du tube de solubilité du sel biliaire avec une solution saline ou un bouillon sans tampon, il est essentiel d'ajuster le pH à la neutralité avant de créer une suspension de bactérie et d'ajouter le réactif afin d'éviter les réactions faussement négatives.
4. Lors de l'utilisation de la méthode du milieu gélose, veillez à ne pas déloger les colonies testées, ce qui peut créer des résultats faussement positifs. Si le milieu gélose directe est difficile à interpréter, l'essai doit être répété en utilisant la méthode du tube d'essai.

13.0 Références

1. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.
2. Procedure and additional references are available in the product insert: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/bilespotrnt.htm

9. Procédure du test de la gélose trypticase cystine (CTA)

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour différencier les organismes exigeants, tels que les espèces *Neisseria*, en fonction de leur capacité à utiliser les glucides.

2.0 Principe

Le test utilise cinq glucides ou sucres différents et détecte la capacité de l'organisme à utiliser chaque sucre indépendamment : glucose (également appelé dextrose), maltose, lactose, fructose et saccharose. Les glucides sont ajoutés individuellement à une base de gélose à la cystine trypticase (CTA) pour obtenir une concentration finale de 1%. Un indicateur rouge de phénol est également inclus dans le milieu, qui développe une couleur jaune en présence de production d'acide ($\text{pH} \leq 6,8$). Si l'organisme est capable d'utiliser les glucides par oxydation (et non par fermentation), un acide sera produit, générant un changement de couleur (rouge à jaune) dans le milieu en gélose. Ainsi, ce test permet de distinguer plusieurs espèces de *Neisseria* en identifiant la combinaison unique des 5 glucides pouvant être utilisés. Par exemple, *N. meningitidis* oxyde le glucose et le maltose, mais pas le lactose, le fructose, ou le saccharose.

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
CTA	Gélose cystine trypticase
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C, sans CO₂
3. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. Si les bases géloses commerciales ci-dessous ne vous êtes pas disponible, préparez chacune base dans son propre tube d'essai.
 - a. Gélose à la cystéine trypticase (base uniquement, sans glucide)
 - b. Gélose à la cystéine trypticase avec 1% de glucose (également appelée dextrose)
 - c. Gélose à la cystéine trypticase avec 1% de maltose
 - d. Gélose à la cystéine trypticase avec 1% de saccharose
 - e. Gélose à la cystéine trypticase avec 1% de lactose

6.0 Consommables

1. Ensemenceurs stériles

Procédure du test de la CTA

2. Support pour les tubes d'essai
3. Conteneur biorisque pour les objets tranchants
4. Sac poubelle biorisque

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Si applicable, les objets tranchants doivent être mis au rebut dans un conteneur résistant à la perforation pour les objets tranchants biorisques.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des tubes CTA pour les informations de stockage, de manipulation et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individu colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultivez une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Étiquetez les tubes avec le numéro d'identification de l'échantillon.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utilisez les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Neisseria lactamica* (ATCC 23970) utilisera du glucose, du maltose, et du lactose, mais pas le saccharose et le fructose.
 - b. *Neisseria sicca* (ATCC 13077) utilisera du glucose, du saccharose, du maltose, et du fructose, mais pas de lactose.
2. Avant leur utilisation, testez chaque nouveau lot de réactif en utilisant deux organismes pour chaque sucre et incluez des contrôles de stérilité.
 - a. Contrôle de la stérilité : desserrez les capuchons pour un ensemble complet de sucres CTA (base CTA contrôle et chaque sucre) et placez-les dans un incubateur sans CO₂ pendant 72 heures pour confirmer la stérilité.
 - i. Les tubes de stérilité doivent tous rester d'une couleur rougeâtre et ne présenter aucune croissance visible.
3. Lors des tests, une base CTA de contrôle doit être inoculée avec chaque test. Les organismes de contrôle de qualité ne sont pas requis pour chaque test.

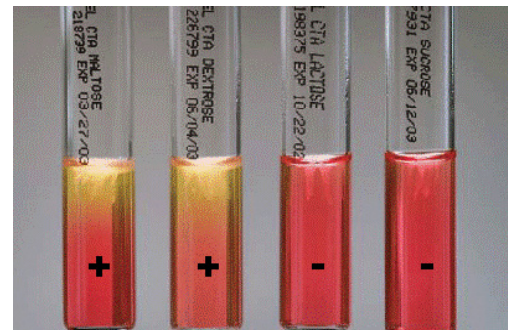
10.0 Procédure

1. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un BSC si possible.
2. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incubé pendant une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
3. Avant de commencer le test, retirer les tubes de sucre du réfrigérateur et laissez-les équilibrer à la température ambiante.

4. Inoculer un ensemble de tubes (1 base + 5 glucides = 6 tubes au total) pour chaque souche.
 - a. *Remarque* : Assurez-vous de changer l'ensemencement entre chaque sucre pour éviter tout report. Si vous utilisez des ensemencement métalliques, bien nettoyer et stériliser-les à la flamme entre chaque sucre.
 - b. Placer une série complète de CTA sur le support des tubes d'essai
 - c. Pour chaque tube d'une série :
 - i. Utilisez un ensemencement pour prélever une anse de colonies issue de la culture incubée depuis hier (étape no. 2 ; âgée de 18-24 heures).
 - ii. Inoculer le glucide en piquant à plusieurs reprises (environ 8 fois) dans le tiers supérieur (10 mm) de la gélose.
 - iii. Fermez les tubes sans serrer.
 - d. Incuber à 35 - 37 ° C dans un incubateur (sans CO₂) pendant 24 à 72 heures.
5. Répétez l'étape 4 pour tous les isolats testés ce jour-là.
6. Examiner chaque tube chaque jour (jusqu'à 72 heures) pour rechercher des preuves de l'utilisation du sucre, indiquée par un changement de couleur et une croissance bactérienne.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Lors de l'interprétation du changement de couleur, il est utile de prendre en compte les éléments suivants :
 - a. Les espèces de *Neisseria* produisent généralement de l'acide dans le tiers supérieur du milieu (autour du site d'inoculation), créant un changement de couleur.
 - b. Changement de couleur jaune observé sur le milieu entier (tube entier et des sites non inoculés) peut indiquer une contamination.
2. Le contrôle de base CTA ne contient pas de glucides et ne devrait donc pas changer de couleur. Si un changement de couleur est observé dans ce tube, celui-ci est contaminé.
 - a. Envisager de répéter les tests et de jeter les résultats si une contamination est suspectée.
 - i. Pour déterminer si le produit est contaminé, incuber la base de CTA non inoculée pendant 72 heures et observer si un changement de couleur se produit.
 - ii. Si aucun changement de couleur n'est observé, procéder à un nouveau test.
3. Positif : La couleur jaune à la surface du milieu (du sucre a été utilisé, produisant un acide qui a changé de couleur du rouge au jaune) et la croissance (visualisée sous forme de turbidité) à partir de la ligne d'inoculation.
4. Négatif : couleur orange / rouge à la surface du support (aucun changement de couleur n'est observé). Un changement de couleur jaune sans croissance visible est également considéré comme un résultat négatif.



Organisme	Production d'acide à partir de :				
	Glucose	Maltose	Lactose	Saccharose	Fructose
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	-	-	-
<i>Neisseria lactamica</i>	+	+	+	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+/-	-	-	-	-
<i>Neisseria sicca</i>	+	+	-	+	+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	-	-

12.0 Limites du test

1. Ne pas inoculer au fond du tube ; Une inoculation inappropriée peut générer des réactions d'acide faible, rendant l'interprétation difficile.
2. L'incubation aérobie est nécessaire. L'incubation avec du CO₂ peut conduire à des résultats erronés.
3. L'absence d'inoculum insuffisant peut conduire à de faux négatifs.
4. Bien qu'extrêmement rares, des souches de *N. meningitidis* capables d'utiliser le glucose ou le maltose, mais pas les deux, ont été rapportées.

13.0 Références

1. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.

10. Procédure de l'Optochine

1.0 But

Cette procédure donne des instructions pour différencier *Streptococcus pneumoniae* des autres espèces de *Streptococcus* α -hémolytiques en fonction de leur capacité à se propager en présence d'optochine.

2.0 Principe

Le test de sensibilité à l'optochine est basé sur la sensibilité différentielle de *Streptococcus pneumoniae* et d'autres streptococcus α -hémolytiques à l'optochine (chlorhydrate d'éthylhydrocupréine). Les organismes sensibles à l'optochine formeront une zone sans croissance (appelée zone d'inhibition) autour d'un disque d'optochine ; les organismes résistants se propageront sans inhibition. Pour cet essai, un disque en papier filtre contenant 5 μ g d'optochine est placé à la surface d'une culture pure (sans contamination) et la zone d'inhibition est quantifiée. *Streptococcus pneumoniae* est sensible à l'optochine (présence d'une zone d'inhibition) mais les autres streptococcus α -hémolytiques sont résistants (aucune inhibition de la croissance observée).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
GS	Gélose au sang de mouton
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.
3. Pied à coulisse ou règle graduée (en mm)

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. Disque Optochine de 6 mm (P-disk) (5 μ g disponibles chez la plupart des fournisseurs)
 - a. S'il n'est pas disponible, une dilution à 1: 4000 de 100% chlorhydrate d'éthylhydrocupréine (optochine) peut être appliquée sur des disques de papier filtre stériles de 6 mm.
3. Boîte de gélose au sang (GS, 5% de sang de mouton)
 - a. *Remarque* : l'utilisation des milieux autres que 5% de sang de mouton n'est pas recommandée, car cela pourrait réduire l'inhibition et donner une interprétation incorrecte.

6.0 Consommables

1. Ensemenceurs stériles
2. Pince stérile
3. Sac poubelle biorisque

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols.
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM).
4. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité du produit qui sera utilisé pendant ce test pour les informations de stockage, de manipulation et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individu colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultivez une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Étiqueter chaque boîte le numéro d'identification de l'échantillon et « Optochine ».

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) – Zone d'inhibition ≥ 14 mm
 - b. *Streptococcus mitis* (ATCC 49456) – Pas de zone inhibition
2. Avant leur utilisation, tester chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les souches de CQ doivent être incluses au moins une fois par semaine. Si le test est infréquent, les souches de CQ doivent être incluses à chaque jour que le test est effectué.

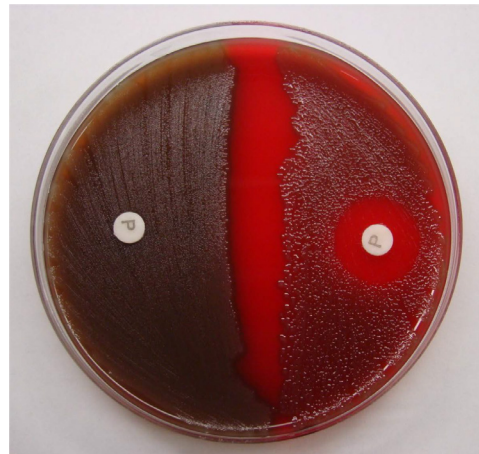
10.0 Procédure

1. Il est recommandé que les étapes suivantes soient complétées dans un BSC si possible.
2. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incuber pour nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
3. Laisser le milieu GS s'acclimater à la température ambiante.
4. En utilisant un ensementeur, sélectionner une colonie isolée de l'organisme α-hémolytique à partir d'une culture âgée de 18-24 heures.
5. Étaler la colonie isolée sur une boîte GS fraîche dans au moins deux directions différentes pour obtenir une croissance confluyente.
 - a. *Remarque* : Deux isolats différents peuvent être testés sur la même boîte de milieu gélose, mais vous devez vous assurer que les deux stries ne se touchent pas. Le chevauchement ajoutera des cultures mixtes et des résultats invalides.
6. À l'aide d'une pince, placer le disque d'optochine dans la zone striée du milieu gélose. Appuyer légèrement sur le disque pour vous assurer qu'il adhère fermement à la boîte de milieu gélose.
 - a. *Remarque* : stériliser la pince entre les isolats si vous utilisez du matériel non jetable.
7. Incuber le GS pendant 18 à 24 heures à 35 - 37 °C sous 5% CO₂.

8. Observer la croissance entourant le disque et mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle millimétrique ou d'un pied à coulisse.
 - a. Le diamètre peut être mesuré en plaçant la règle ou le pied à coulisse au centre de la zone d'inhibition.
 - b. *Remarque* : Une culture présentant une croissance confluyente autour du disque aura une zone d'inhibition égale au diamètre du disque lui-même.

11.0 Interprétation des Résultats

1. La taille de la zone d'inhibition autour d'un disque de 6 mm peut être interprétée à l'aide des critères suivants :
 - a. Résultats positifs (sensibles à l'optochine) : la zone d'inhibition est ≥ 14 mm
 - b. Résultats négatifs (résistant à l'optochine) : aucune zone d'inhibition n'est observée
 - c. Résultats équivoques : Un organisme présentant une zone d'inhibition entre 7 et 14 mm ne peut être interprété. Un test de solubilité sel biliaire doit être effectué pour déterminer si la bactérie est *Streptococcus pneumoniae*.
2. *Remarque* : pour un disque d'optochine de 10 mm, 5 μ g, utiliser comme zone de diamètre d'inhibition ≥ 16 mm.
 - a. Les pneumocoques auront une zone d'inhibition ≥ 16 mm. Tout organisme présentant une inhibition de croissance inférieure à 16 mm doit être testé par le test de solubilité sel biliaire.
3. Une image représentative est montrée ci-dessous (à partir de [1]).



Resistant Susceptible

12.0 Limites du test

1. Une zone d'inhibition faible (<14 mm) indique que le test de solubilité dans le sel biliaire est nécessaire.
2. Les isolats de *Streptococcus pneumoniae* doivent être incubés dans un environnement enrichi en CO_2 , car certains isolats ne pousseront bien ou pas du tout en l'absence de CO_2 . Des conditions de croissance médiocres pourraient affecter l'interprétation de la zone d'inhibition.

13.0 Références

1. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.

11. Procédure du test d'exigence en facteurs X et V

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour différencier les espèces d'*Haemophilus*, y compris *Aggregatibacter aphrophilus*, en fonction de leurs besoins des facteurs de croissance X (hémine) et V (nicotinamide adénine dinucléotide, NAD).

2.0 Principe

Parce que différentes espèces d'*Haemophilus* ont besoins de différents facteurs de croissance X et V, ce test permet de les différencier. Les isolats suspectés d'être *Haemophilus* sont cultivés sur un milieu limitant non capable de soutenir la croissance d'*Haemophilus* sans les facteurs de croissance. Les facteurs de croissance sont imprégnés dans un de trois types de disques (X uniquement, V uniquement ou X et V ensemble) et déposés à la surface de la gélose. Les facteurs de croissance se diffusent dans le milieu à partir des disques, permettant une croissance autour du disque. En utilisant ce test, vous pouvez déterminer si l'espèce *Haemophilus* a besoin d'hémine, de NAD, ou des deux pour sa croissance.

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide,
Facteur X	Hémine
Facteur V	NAD
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. 0,85% solution de l'eau saline
3. Milieu de croissance sans facteur de croissance
 - a. Gélose tryptique au soja (TSA) (Cat No. G60, Hardy Diagnostics)
 - b. Gélose avec infusion de cerveau et de cœur (BHI) (Cat No. W15)
 - c. Gélose Mueller Hinton (MHA) (Cat No. G45)
4. Disques de facteurs de croissance (température ambiante comprise entre -20 °C et 8 °C)
 - a. Facteur X (réf. Cat Z7031, Hardy Diagnostics)
 - b. Facteur V (N ° de cat. Z7041, Hardy Diagnostics)
 - c. Facteur XV (Cat No. Z7051, Hardy Diagnostics)

6.0 Consommables

1. Tubes d'essai stérile de 5 mL et support pour les tubes d'essai
2. Pipette de transfert ou pipette pasteur
3. Standard de turbidité McFarland 0,5
4. Écouvillons Dacron Polyester
5. Pince stérile
6. Sac poubelle biorisque
7. Conteneur biorisque pour objets tranchants

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Si applicable, objets tranchants et en verres doivent être mises au rebut dans un conteneur résistant à la perforation pour les objets tranchants biorisques.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits qui seront utilisés pendant ce test pour les informations de stockage, de manipulation et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individuel colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Étiqueter chaque boîte avec le numéro d'identification de l'échantillon.

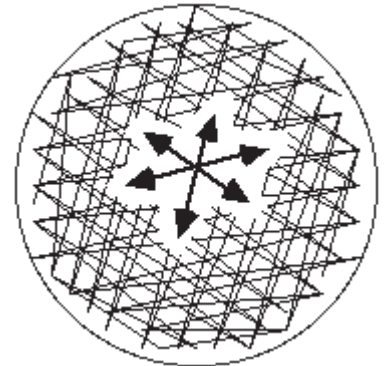
9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Haemophilus influenzae* (ATCC 10211) – Facteurs X et V : Pas de croissance ; Facteur XV : croissance
 - b. *Aggregatibacter aphrophilus* (ATCC 33389) – Facteurs X, V, XV : Croissance
2. Avant leur utilisation, tester chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les souches de CQ doivent être incluses chaque jour où le test est effectué.
4. Le solution saline doit être soumis à un contrôle de stérilité par CQ avant son utilisation dans les préparations des suspensions de bactéries.
 - a. Strier la solution saline sur le milieu gélose approprié et incuber dans des conditions de croissance normales. Confirmer qu'aucune croissance ne se produit avant le test.

10.0 Procédure

Procédure du test d'exigence en facteurs X et V

1. *Remarque* : ce protocole est spécifique aux produits Hardy Diagnostics, bien qu'il puisse être applicable à d'autres fabricants. Quelle que soit la marque, consulter toujours les directives du fabricant pour s'informer de la procédure appropriée et à jour (Hardy Diagnostics, 2017).
2. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
3. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incubé pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
4. Créer la suspension bactérienne
 - a. Mettre 1,0 mL de solution saline stérile dans un tube d'essai de 5 mL à l'aide d'une pipette Pasteur.
 - b. Utiliser un écouvillon stérile pour sélectionner plusieurs colonies isolées et préparer une suspension dans la solution saline équivalente à un standard de turbidité McFarland 0,5.
5. Strie pour la croissance confluyente
 - a. Tremper un écouvillon stérile propre dans la suspension saline de bactérie.
 - b. Enlever l'excès de liquide en tournant l'écouvillon au long des parois internes du tube au-dessus de la solution.
 - c. Ensemencer la suspension sur toute la surface Du milieu limitant en striant dans trois directions différentes et en faisant pivoter la boîte de milieu gélose à un angle de 60 degrés après chaque strie (strie pour la confluent).
 - d. Éviter de toucher les côtés de la boîte de milieu gélose pour éviter les aérosols. Enfin, passer un écouvillon stérile sur le bord de la gélose pour éliminer toute humidité excessive.
 - e. Laisser la surface du milieu sécher pour 3-5 minutes.
6. Appliquer les disques de facteur de croissance sur le milieu gélose
 - a. En utilisant des pinces stériles, appliquer des disques autour du milieu gélose (environ 1-2 cm du bord du milieu).
 - i. *Remarque* : stériliser la pince entre chaque isolat si vous utilisez une pince non jetable.
 - b. Appliquer les disques dans les positions suivantes :
 - i. *Remarque* : Espacer les disques autant que possible pour que la diffusion des facteurs de croissance de chaque disque ne se chevauche pas sur la gélose.



Disque de Facteur X	12 : 00
Disque de Facteur V	04 : 00
Disque Facteur XV	08 : 00

7. Incuber les milieux inoculés pour 18-48 heures à 35–37 °C sous 5% CO₂

11.0 Interprétation des Résultats

1. Observer la croissance sur la gélose, en particulier autour des disques du facteur de croissance, jusqu'à 48 heures après l'inoculation.
2. Modèles de croissance attendus :
 - a. Organismes qui nécessitent les deux facteurs de croissance, X et V
 - i. La croissance ne sera observée que autour des disques XV.
 - ii. *H. influenzae*, *H. aegyptius*, et *H. haemolyticus* présenteront ce type de croissance.
 - b. Organismes qui nécessitent uniquement le facteur X pour leur croissance
 - i. Croissance équivalente observée autour des disques X et XV.
 - ii. Les espèces d'*Haemophilus* sous cette catégorie présenteront un schéma de croissance compatible avec un seul

facteur de croissance.

c. Organismes ne nécessitant qu'un facteur V pour la croissance

i. Croissance équivalente observée autour des disques V et XV.

ii. Les espèces d'*Haemophilus* sous cette catégorie présenteront un schéma de croissance compatible avec un seul facteur de croissance.

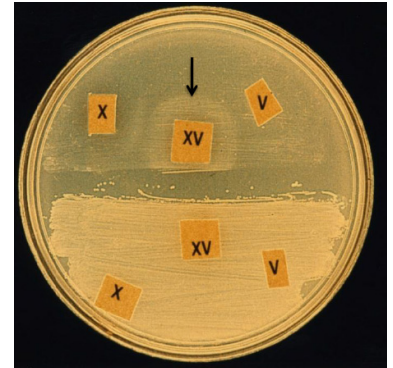
d. Organismes ne nécessitant ni facteur X ni facteur de croissance

i. La croissance sera confluyente à travers le milieu inoculé y incluse autour des trois disques.

3. Une image représentative est montrée ci-dessous (de [2]).

La culture bactérienne au-dessus nécessite les deux facteurs X et V : la croissance est uniquement observée autour du disque XV.

La culture bactérienne au-dessous ne nécessite aucun facteur de croissance : la croissance est observée sur toute la gélose inoculée y incluse autour de chaque disque.



12.0 Limites du test

1. Faites attention lors de l'inoculation de la gélose pour éviter le transfert des éléments nutritifs.
2. La densité de la culture et les conditions de croissance sont importantes pour obtenir des résultats précis (le CO₂ est essentiel à la croissance d'*Haemophilus*).
3. Si les disques sont placés trop près de l'un des autres, les facteurs de croissance peuvent se mélanger de la gélose, ce qui peut générer des résultats inexacts.
4. Comme les besoins en facteurs de croissance des espèces d'*Haemophilus* sont similaires, il n'est pas recommandé que cette procédure soit le seul critère d'identification des espèces. Des tests supplémentaires peuvent être nécessaires.

13.0 Références

1. Hardy Diagnostics. X- AND V-FACTOR DISKS Available at: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/XVFactorDisks.htm. Accessed October 30, 2019.
2. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.
3. *Haemophilus*. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. 2007. ASM Press.

12. Procédure du test d'agglutination sur lame

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour effectuer l'agglutination sur lame des isolats de *Neisseria meningitidis* (Nm) pour le sérogroupage et des isolats de *Haemophilus influenzae* (Hi) pour le sérotypage.

2.0 Principe

Neisseria meningitidis et *Haemophilus influenzae* peuvent exprimer une capsule de polysaccharide souvent associée à la virulence. Les sérogroupes Nm incluent A, B, C, Z'/E, W, X, Y et Z ; les sérotypes Hi sont a, b, c, d, e, et f. Dans le test d'agglutination sur lame, une suspension bactérienne est mélangée avec un antisérum (anticorps). Lorsque les anticorps interagissent avec les antigènes à la surface des cellules bactériennes, des amas bactériens agrégés se forment ; cette formation est appelée agglutination et est visible à l'œil nu. Lors de la détermination du séro groupe Nm ou du sérotype Hi, un isolat est souvent évalué à l'aide de plusieurs réactions d'agglutination sur lame pour les sérogroupes / sérotypes généralement associés à la maladie dans cette région.

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
EPP	Équipement de Protection Personnel
Nm	<i>Neisseria meningitidis</i>
Hi	<i>Haemophilus influenzae</i>
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Hotte chimique
3. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.
4. Pipettes de 1-10 µL, 2-20 µL, et 200-1000 µL
5. Vortex
6. Minuterie
7. Pipette électrique ou ampoule pour pipettes sérologiques
8. *Optionnelle* : lampe à lumière directe

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. Les antisérums suivants sont commercialement disponibles pour Nm et Hi:
 - a. Nm : A, B, C, Z' / E, W, X, Y, Z
 - b. Hi : a, b, c, d, e, f
 - c. Les antisérums doivent être conservés au réfrigérateur (4 °C)

3. 0,85% solution de l'eau saline
4. Solution de formaldéhyde à 37%

6.0 Consommables

1. Lames portes objets de 2 pouces x 3 pouces (50 x75 mm)
2. Stylo PAP
3. Embouts pipettes (1-10 µL, 2-20 µL, et 200-1000 µL)
4. Microtubes de 1,5 mL ou 2 mL
5. Écouvillons Dacron Polyester
6. Standard de turbidité McFarland 4,0
7. Pipette sérologique (5 mL, 100 mL)
8. Bécher de 200 mL
9. Sac poubelle biorisque
10. Conteneur biorisque pour objets tranchants

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Si applicable, objets tranchants et verres doivent être mises au rebut dans un conteneur résistant à la perforation pour les objets tranchants biorisques.
5. Les antisérums contiennent 0,1% d'azide de sodium. Pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées, reportez-vous à la fiche de données de sécurité du produit contenant de l'azide de sodium.
6. Le formaldéhyde est une substance hasardeuse. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité du formaldéhyde pour les informations son stockage, sa manipulation et son élimination appropriés.
 - a. Même si les bactéries sont en suspension dans une solution de formaldéhyde, le temps de contact au cours du processus d'essai n'est pas suffisant pour les inactiver. Ainsi, les suspensions bactériennes doivent être traitées comme des matières infectieuses.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

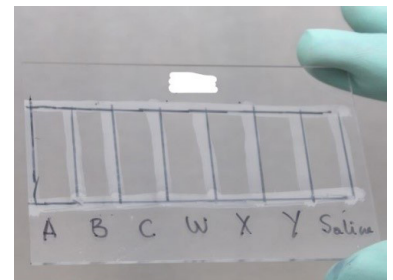
1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individuel colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Étiqueter le numéro d'identification de l'échantillon sur chaque 1,5-2,0 mL microtubes contenant des aliquotes de solution saline formalisée.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser au moins un organisme de contrôle positif et négatif ainsi qu'un contrôle contenant uniquement la solution saline (sans bactérie) lors du contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées doivent être utilisées pour le contrôle qualité.
 - a. Si possible, un panel de souches représentatif de tous les sérogroupes / sérotypes devrait être utilisé. Le contrôle négatif (contenant uniquement une solution saline) est utilisé pour tester l'auto agglutination.
 - b. Une souche de *Neisseria meningitidis* pour chaque séro groupe
 - i. Confirmer que les antisérums s'agglutinent avec le séro groupe prévu et qu'aucune agglutination n'est observée avec les sérogroupes non prévus.
 1. Exception : l'antisérum NmE/Z' réagit avec NmZ.
 - ii. *Remarque* : Une souche non groupable (NmNG) ne devrait s'agglutiner avec aucun des antisérums énumérés au-dessus.
 - c. Une souche d'*Haemophilus influenzae* pour chaque sérotype
 - i. Confirmer que les antisérums s'agglutinent avec le sérotype prévu et qu'aucune agglutination n'est observée avec les sérotypes non prévus.
 - ii. *Remarque* : une souche non typable (NTHi) ne devrait s'agglutiner avec aucun des antisérums énumérés au-dessus.
2. Avant leur utilisation, tester chaque nouveau lot de réactif avec des contrôles positifs et négatifs (comme décrit ci-dessus).
 - a. Le CQ doit être effectué tous les six mois pour s'assurer qu'il fonctionne comme prévu.
 - b. Le CQ doit être répété autant de fois que nécessaire si un flacon a été exposé à des températures supérieures à 4 °C ou s'il y a des raisons de penser que le flacon a été contaminé.
3. Lors des tests, un contrôle contenant uniquement une solution saline doit être inclus avec chaque test.
 - a. Si un type d'agglutination inattendu ou ambigu est observé, il peut être utile de répéter le test avec des souches de CQ pour faciliter l'interprétation.

10.0 Procédure

1. *Remarque* : Cette procédure ne doit être effectuée que sur des isolats bactériens confirmés d'être *N. meningitidis* ou *H. influenzae* par d'autres tests.
2. Préparation d'une solution saline formalisée
 - a. Effectuer les étapes 2b à 2c dans un PSM, si possible.
 - b. Dans une hotte chimique, ajouter 5 mL de la solution de 37% formaldéhyde à 95 mL de la solution 0,85% saline dans un bécher de 200 mL pour obtenir une solution à 5% de formaldéhyde (formol ou solution saline formalisée).
 - c. Mélanger en pipetant et refoulant prudemment à l'aide d'une pipette sérologique.
 - d. Dans un PSM stérile (si possible), distribuer des aliquotes de 500 µL dans des microtubes de 1,5 mL ou 2,0 mL. Conserver à la température ambiante pour 3 mois maximum.
3. Préparer les lames pour les réactions d'agglutination
 - a. *Optionnelle* : Nettoyer la lame porte objet avec l'alcool (nécessaire uniquement si les lames ne sont pas préalablement nettoyées par le fabricant).
 - b. Diviser la lame pour créer des sections/chambres égales utilisant un stylo étanche ou PAP.
 - i. *Remarque* : chaque isolat nécessitera une section/chambre distincte pour chaque antisérum testé, ainsi que le contrôle négatif (la solution saline).



4. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un BSC si possible.
5. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incubé pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
6. Préparer la suspension bactérienne
 - a. Utiliser un écouvillon stérile pour prélever des colonies isolées du milieu gélose incubé depuis hier.
 - b. Ajouter les colonies dans une suspension de solution saline formalisée en mélangeant doucement et le frottant contre le bord du tube utilisant l'écouvillon.
 - i. La suspension bactérienne doit avoir une densité équivalente à un Standard de turbidité McFarland 4,0 ou plus.
 - c. Mélanger la suspension en pipetant ou en vortexant brièvement.
 - d. *Remarque* : Il est important de s'assurer que la suspension ne contient pas des amas de bactéries.
 - i. La suspension doit être utilisée dans les 15 minutes suivant sa préparation.
7. Procédure d'agglutination sur lame
 - a. Déterminer quels antisérums seront utilisés pour les tests. Considérer le suivant :
 - i. Ne tester que les antisérums applicables à l'organisme.
 - ii. Envisager d'abord de tester les sérogroupes / sérotypes prévalents dans la région.
 - iii. Rappelle: un contrôle négatif salin est toujours requis.
 - b. Utiliser une pipette pour transférer 10 µL de la suspension bactérienne dans la partie inférieure de chaque chambre préparée de la lame.
 - c. Dans la partie supérieure de chaque chambre de la lame, ajouter 10 µL de l'antisérum ou de la solution saline approprié.
 - i. *Remarque* : N'utiliser pas le compte-gouttes fourni avec les antisérums, car il fournit des quantités plus élevées que nécessaire et peut facilement être contaminé.
 - ii. *Remarque* : si une micropipette et les embouts ne sont pas disponibles, un ensemenceur stérile de 10 µL, à usage unique, peut être utilisée pour transférer 10 µL d'antisérum. Cependant, les ensemenceurs ne fournissent souvent pas les quantités précises.
 - d. Important : Après chaque utilisation, éliminer les embouts/ensemenceurs déjà utilisés lors du transfert de l'antisérum afin d'éviter toute contamination de l'antisérum. Si le flacon d'antisérum est contaminé, utiliser un nouveau flacon.
 - e. Incliner/Secouer délicatement la lame pour mélanger la suspension bactérienne avec l'antisérum dans chaque section pendant 1 min (en l'inclinant d'un mouvement de va-et-vient pour mélanger efficacement la suspension bactérienne avec l'antisérum).
 - i. *Remarque* : ne faites pas de mouvement circulaire. Cela peut mélanger des antisérums entre les chambres, provoquant une contamination et nécessitant la répétition du test.
 - f. Au bout d'une minute, examiner les réactions d'agglutination à la lumière vive et sur un fond noir.
 - g. Utiliser le guide d'interprétation de la figure 1 pour documenter la quantité d'agglutination observée.
 - h. *Remarque* : Retourner les antisérums au réfrigérateur dès que le test est terminé pour éviter la perte d'activité.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Évaluer l'intensité des réactions d'agglutination
 - a. Un résultat positif est désigné par 3 + ou 4 + (forte agglutination), sauf pour le séro groupe B, qui est considéré comme positif avec une note de 2 + (ou plus).
 - b. Un résultat négatif est désigné par 0, + / -, 1+ ou 2+ (agglutination faible).

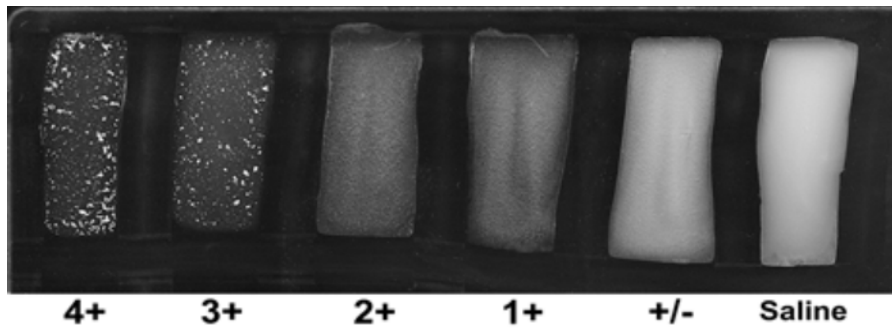


Figure 1 : Évaluation de l'intensité du test d'agglutination (Image de [1]).

4+	Toutes les cellules s'agglutinent et la suspension cellulaire est limpide
3+	75% des cellules s'agglutinent et la suspension cellulaire est légèrement trouble
2+	50% des cellules s'agglutinent
1+	25% des cellules s'agglutinent
+/-	Moins de 25% des cellules s'agglutinent et de fines particules se forment
0	Pas d'agglutination visible ; La suspension reste trouble et lisse

2. Détermination du sérotype / sérotype

- a. Le sérotype est déterminé lorsqu'un résultat positif apparaît avec un antisérum spécifique et non avec la solution saline.
 - i. Exceptions : Les sérotypes E/Z' et Z du méningocoque peuvent chacun s'agglutiner dans l'antisérum E/Z'. Pour identifier, de manière concluante, le sérotype, les isolats suspectés d'être du sérotype E/Z' ou Z doivent être testés avec chacun des deux antisérums spécifiques de Z et d'E/Z'.
- b. L'isolat est signalé comme non typable (NT) pour Hi ou non groupable (NG) pour Nm si l'une des observations suivantes est faite (informations supplémentaires dans le tableau) :
 - i. Ne réagit pas avec les antisérums spécifiques du sérotype ou du sérotype
 - ii. Réagit avec 2 antisérums ou plus
 - iii. Agglutinats avec contrôle négatif salin

Résultat de l'agglutination sur lame	Observations sur l'agglutination :	
	Saline	Antisera
Sérotype / sérotype	Négatif	Positif avec 1 antisérum
NT / NG : Non-réactif	Négatif	Négatif
NT / NG : Auto-agglutinant	Positif	Négatif or Positif
NT / NG : Poly-agglutinant	Négatif	Positif avec plus d'un antisérum

3. Dépannage

- a. Si les résultats de l'agglutination ne sont pas clairs, essayer les étapes suivantes.
 - i. Répéter le test en utilisant la suspension d'origine.
 - ii. Faites une nouvelle suspension cellulaire et répéter le test.
 - iii. Ajouter 20 µL d'antisérums et de solution saline directement dans chaque chambre de la lame, puis ajouter une anse d'organisme dans chacune d'elles sans diluer l'isolat dans la solution saline formalisée.

- iv. Si les résultats sont toujours non conclusifs, ensemencer une colonie isolée, incuber pour une nuit à 35–37 °C sous 5% CO₂, et refait le test le lendemain avec la nouvelle culture bactérienne.
 1. *Remarque* : Si la gélose d'origine contient des colonies de tailles différentes, créer une sous-culture pour chaque type de colonie et tester chaque type le jour suivant.
 2. Il est également recommandé d'étaler les souches de CQ pour les retester avec les isolats présentant une agglutination ambiguë ou inattendue.

12.0 Limites du test

1. Des réactions croisées ont été observées avec des organismes d'autres espèces. Il est donc important de confirmer l'identité l'espèce par des tests biochimiques avant de procéder à des tests sérologiques.
2. Des résultats de faux négatifs peuvent être observés si la suspension bactérienne n'a pas une densité suffisante.
3. Les isolats Nm et Hi sont sujets à la variabilité (petites contre grandes colonies, encapsulées, contre non-encapsulées, croissance lente contre rapide, et forte contre agglutination faible) et l'agglutination peut être ambiguë ou difficile à interpréter.

13.0 Références

1. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.

13. Procédure du test de diffusion en gélose de Kirby-Bauer

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour la méthode de diffusion de Kirby-Bauer, qui évalue la sensibilité aux antimicrobiens.

2.0 Principe

Les tests de sensibilité aux antimicrobiens évaluent la capacité d'un organisme à se développer en présence de divers agents antimicrobiens. Pour la méthode de diffusion Kirby Bauer, les isolats bactériens sont ensemencés à confluence sur un milieu gélose (observée comme une croissance confluyente de bactéries). Avant l'incubation de croissance, des disques de papier filtre, préparés commercialement et imprégnés d'une concentration unique d'un agent antimicrobien, sont placés sur la gélose et diffusent dans le milieu de croissance entourant immédiatement le disque. Si la croissance de l'organisme n'est pas inhibée, la croissance sera confluyente autour du disque. Si l'organisme est sensible à l'agent antimicrobien, il ne pourra pas se développer autour du disque, créant une zone d'inhibition. Le diamètre de la zone d'inhibition peut être mesuré et utilisé pour déduire la susceptibilité de l'organisme à l'aide de tableaux d'interprétation, qui définissent les seuils pour les interprétations sensibles, intermédiaires, non sensibles, ou résistantes.

Il est important de noter que la taille de la zone d'inhibition est influencée par le taux de diffusion et d'autres propriétés physiques spécifiques de chaque agent antibactérien. Ainsi, l'interprétation de diffusion sur disque sera distincte pour chaque combinaison d'agent antimicrobien et d'espèce et ne pourra être identifiée qu'en se référant aux tableaux d'interprétation publiés. Les critères d'interprétation et les exigences de méthode pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens, y compris la diffusion sur disque, sont publiés par le CLSI et par le Comité Européen sur les Tests de Sensibilité aux Antimicrobiens (EUCAST).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
EPP	Équipement de Protection Personnel
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
EUCAST	Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens
UFC	Des unités formant des colonies
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre de bougies ou des paquets de CO₂ suffit.
3. Incubateur à 35–37°C, sans CO₂ – nécessaire pour la croissance de l'organisme *E. coli* (pour QC)
4. Pied à coulisse ou règle graduée (en mm)
5. Source de lumière
6. Vortex
7. *Optionnelle* : Turbidimètre
8. *Optionnelle* : appareil pour distribuer multiples disques antibiotiques

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Pour chaque organisme spécifique à tester, le milieu approprié doit être disponible.
 - a. Milieu de croissance : une gélose qui soutient la croissance
 - b. Bouillon de dilution : utilisé pour l'inoculation du test de sensibilité aux antimicrobiens
 - c. Milieu d'essai : utilisé pour la croissance en présence de l'agent antimicrobien
 - d. Le tableau ci-dessous donne les spécifications spécifiques au CLSI.
 - i. *Remarque* : les méthodes EUCAST peuvent différer. Reportez-vous au manuel.

	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Milieu de croissance	Gélose au chocolat	Gélose au chocolat	Gélose au sang	Gélose au sang
Bouillon de dilution	Bouillon Mueller Hinton	Bouillon de milieu d'essai Haemophilus	Bouillon Mueller Hinton	Eau stérile déminéralisé
Test du milieu*	Gélose Mueller Hinton avec 5% de sang de mouton	Gélose milieu d'essai Haemophilus	Gélose Mueller Hinton avec 5% de sang de mouton	Bouillon Mueller Hinton

1. Milieu d'essai *: Des plaque/boites de milieu gélose ayant un diamètre de 100 ou 150 mm peuvent être utilisées, en fonction du nombre d'agents antimicrobiens à tester.
 - a. Utiliser un maximum de 4 disques sur une boîte de 100 mm et 9 disques sur une boîte de 150 mm.
2. Disques antimicrobiens
 - a. Reportez-vous au document CLSI / EUCAST pour obtenir la liste complète des disques antimicrobiens ainsi que les critères d'interprétation pour l'organisme spécifique à tester.
 - b. Pour assurer une activité optimale des disques antimicrobiens, conserver-les à -20 °C ou moins dans un congélateur sans givre (ou selon les instructions du fabricant).

6.0 Consommables

1. Standard de turbidité McFarland 0,5
2. Écouvillons Dacron Polyesters (préférés) ou ensemenceurs
3. Pincettes stériles
4. Sac poubelle biorisque
5. Conteneur biorisque pour objets tranchants

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
 - a. *Remarque* : Si les boîtes de milieu gélose doivent être ouverts lors de la lecture de la zone d'inhibition, il est recommandé d'effectuer les lectures dans un PSM.
4. Si applicable, objets tranchants et verres doivent être mis au rebut dans un conteneur résistant à la perforation pour

les objets tranchants biorisques.

5. Si une règle ou un pied à coulisse touche la gélose ou les bactéries pendant la mesure de la zone d'inhibition, décontaminer-la complètement.
6. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits qui seront utilisés pendant ce test pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individu colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
 - b. *Remarque* : si l'isolat à tester provient d'un stock congelé,
 - i. Étaler l'isolat sur un milieu gélose approprié et permettre la croissance pendant la nuit.
 - ii. Sous-cultiver une seule colonie sur un milieu gélose frais et permettre la croissance pendant la nuit avant de commencer d'un test de diffusion de Kirby-Bauer suivant les conditions de croissance du CLSI.
2. Étiqueter les boîtes de milieu gélose et les tubes de bouillon avec le numéro d'identification de l'échantillon.

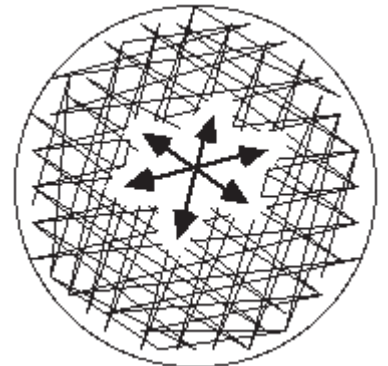
9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle de qualité recommandés par CLSI ou EUCAST. Seules les souches ATCC doivent être utilisées pour le contrôle de qualité. Pour chaque organisme d'intérêt, les souches de CQ routine suggérée par le CLSI sont énumérées ci-dessous.
2. Les souches de routine recommandées par le CLSI sont listées ci-dessous pour chaque organisme d'intérêt :
 - a. *N. meningitidis* : *S. pneumoniae* ATCC 49619 et *E. coli* ATCC 25922
 - b. *H. influenzae* : *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, et *E. coli* ATCC 35218
 - c. *S. pneumoniae*: *S. pneumoniae* ATCC 49619
 - d. *Remarque* : les recommandations des souches QC d'EUCAST peuvent différer. Consulter le manuel.
3. Avant leur utilisation, tester la stérilité et la capacité de croissance de chaque nouveau milieu de croissance.
 - a. Effectuer un test de stérilité (incuber le milieu non inoculé dans des conditions de croissance normales pour confirmer l'absence de croissance).
 - b. Inoculer les nouveaux milieux de croissance avec une souche de contrôle de qualité pour vous assurer qu'ils peuvent soutenir une croissance normale.
4. Lors des tests, les souches de contrôle de qualité doivent être incluses chaque semaine que le test est effectué afin de confirmer la qualité / performance du disque et l'intégrité globale du processus de test (voir CLSI / EUCAST pour des recommandations supplémentaires).
 - a. Pour que les résultats obtenus au cours de la journée soient considérés comme valides, les résultats des tests des organismes de contrôle de qualité doivent être dans les limites indiqués dans les manuels du CLSI / EUCAST.

10.0 Procédure

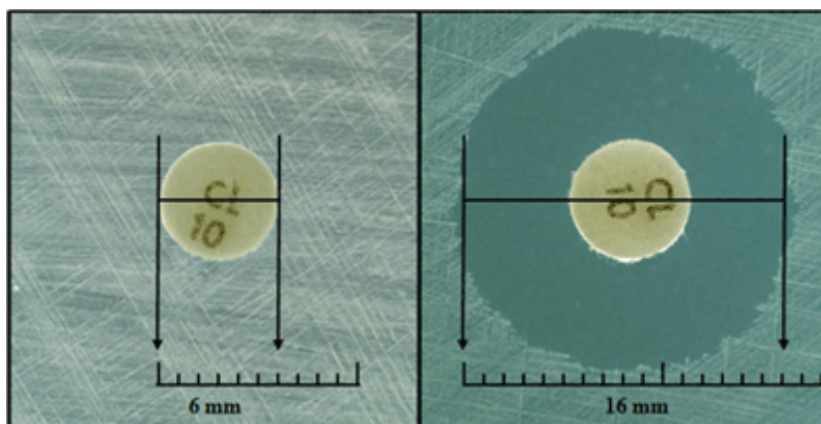
1. Laisser les milieux géloses et les disques s'équilibrer à la température ambiante avant utilisation.
 - a. Les milieux géloses peuvent être placés dans un incubateur à 35–37 ° C (sans CO₂ et non utilisé pour la culture d'agents pathogènes).
 - b. La surface de la gélose doit être humide, mais aucune gouttelette d'eau ne doit être visible sur la gélose ou sur le couvercle lors de l'inoculation.

- c. Pour éviter une condensation excessive dans la boîte de disques, n'ouvrir pas la cartouche jusqu'à ce qu'elle atteigne la température ambiante.
2. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
3. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incubé pour une nuit.
 - a. Si vous commencez d'un stock d'isolats gelés, voir « 8.0 Information sur l'échantillon / Traitement » de cette procédure.
 - b. Les conditions de croissance du CLSI sont énumérées ci-dessous :
 - i. *H. influenzae* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - ii. *N. meningitidis* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iii. *S. pneumoniae* : 18-20 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iv. *E. coli* : 18-24 heures, 35 ± 2 °C, air ambiant
4. Préparation d'inoculum utilisant la méthode de suspension directe de colonies
 - a. À l'aide d'un écouvillon, sélectionner plusieurs colonies isolées dans une culture d'une nuit et remettre-les en suspension dans le bouillon de dilution approprié pour l'organisme testé.
 - b. Vortexer jusqu'à ce que la suspension soit uniforme et a une concentration équivalente à celle d'un standard de turbidité McFarland 0,5 (1x10⁸ à 2x10⁸ UFC / mL).
 - i. Si disponible, un turbidimètre peut également être utilisé pour confirmer la densité de la suspension.
 - c. Si nécessaire, ajuster la densité de la suspension bactérienne.
 - i. Ajouter des bactéries supplémentaires pour augmenter la turbidité
 - ii. Diluer avec un bouillon de dilution stérile pour réduire la turbidité.
5. Inoculation de milieu gélose
 - a. Important : Inoculer le milieu gélose dans les 15 minutes suivant la préparation de la suspension.
 - b. Tremper un écouvillon stérile en polyester dans le tube d'inoculum et faites-le tourner au-dessus du liquide et contre la paroi du tube pour éliminer l'excès de liquide.
 - c. Ensemencer toute la surface entière de la gélose à trois reprises, en la faisant pivoter d'environ 60° entre les stries pour assurer une répartition uniforme (stries pour une croissance confluyente de bactéries).
 - d. Éviter de toucher les côtés de la boîte du milieu gélose pour éviter les aérosols. Enfin, passer l'ensemencement sur le bord de la gélose pour éliminer toute humidité excessive.
 - e. Laisser sécher la milieu gélose inoculée pendant 3 à 5 minutes avant d'appliquer les disques.
6. Application de disques
 - a. Une fois que le milieu gélose est sèche, appliquer les disques sur la surface de la gélose à l'aide d'un distributeur ou manuellement à l'aide d'une pince stérile.
 - i. Utiliser au maximum 4 disques (boîte de 100 mm) ou 9 disques (boîte de 150 mm).
 - ii. Les disques ne peuvent pas être à moins de 24 mm du centre au centre.
 - iii. Si la pince touche la surface de la gélose, décontaminer-la avant de continuer.
 - b. Une fois qu'un disque est mis en contact avec la surface de la gélose, ne le déplacer pas. Le mouvement rend la zone d'inhibition impossible à interpréter.



Procédure du test de diffusion en gélose de Kirby-Bauer

- i. Si nécessaire, placer un nouveau disque à un autre emplacement sur la gélose.
 - c. Appliquer une légère pression sur chaque disque à l'aide de la pince stérile pour assurer un contact complet avec la gélose (certains distributeurs le font automatiquement).
7. Incubation
- a. Inverser les boîtes de milieu gélose et incuber dans les 15 minutes suivant l'application du disque.
 - b. Incuber les milieux géloses conformant aux recommandations du CLSI / EUCAST. Les conditions d'incubation du CLSI sont énumérées ci-dessous :
 - i. *H. influenzae* : 16-18 h, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - ii. *N. meningitidis* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iii. *S. pneumoniae* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iv. *E. coli* : 16-20 heures, air ambiant à 35 ± 2 °C
8. Mesurer la zone d'inhibition
- a. Considérations importantes
 - i. Si la croissance est intermittente, l'inoculum n'est pas suffisant et la procédure doit être répétée. Ne lire que les milieux géloses qui sont au moins presque uniformes (ayant une croissance confluyente de bactéries sur le milieu gélose).
 - ii. Si des milieux géloses doivent être ouvertes lors de la mesure de la zone d'inhibition, il est recommandé d'utiliser un PSM.
 - iii. Lors du test d'organismes hémolytiques, mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance et non la zone d'inhibition de l'hémolyse.
 - iv. Si la croissance est confluyente autour du disque, la zone d'inhibition sera le diamètre du disque lui-même.
 - b. Utiliser un pied à coulisse ou une règle pour mesurer et enregistrer le diamètre de la zone d'inhibition au millimètre. La marge de la zone doit être considérée comme la zone ne présentant aucune croissance évidente et visible pouvant être détectée à l'œil nu.
 - i. *Remarque* : L'utilisation de la lumière d'une lampe avec une surface noire à l'arrière-plan peut faciliter les mesures.
 - ii. Les images représentatives de [1] sont présentées ci-dessous.



- c. L'opacité du support affectera la façon dont le milieu gélose est lue.
 - i. Milieu d'essai translucide (ex : milieu d'essai Haemophilus)
 - 1. Mesurer la zone d'inhibition peut être faite à partir de l'arrière du milieu gélose lorsqu'il est fermé.
 - ii. Milieux d'essai opaques (ex : Mueller Hinton avec 5% de sang de mouton)
 - 1. Mesurer la zone d'inhibition à partir du devant de du milieu gélose. Ne toucher pas la gélose ni la croissance bactérienne avec la règle pendant que vous prenez des mesures.
 - 2. Les milieux géloses opaques peuvent être éclairées de l'arrière pour faciliter la lecture.

11.0 Interprétation des Résultats

- 1. Une fois que les mesures de la zone d'inhibition ont été obtenues, reportez-vous aux manuels du CLSI ou d'EUCAST pour interpréter la susceptibilité et obtenir les résultats catégoriels (sensible (S), intermédiaire (I), résistant (R) ou non sensible (NS)).
- 2. Considérations supplémentaires
 - a. Enregistrer les résultats du CQ en premier. Si la souche de contrôle de qualité n'est pas dans les limites prévues, le test n'est pas valide et doit être répété.
 - b. Lorsque vous mesurez des zones pour les sulfamides (triméthoprimé ou triméthoprimé-sulfaméthoxazole), ne tenir pas compte de la croissance légère (20% ou moins de la croissance). Mesurer la marge la plus évidente pour déterminer la zone d'inhibition.

12.0 Limites du test

- 1. Ce test dépend des critères d'interprétations spécifiques. Le strict respect du protocole et des directives CLSI / EUCAST est nécessaire pour garantir des résultats précis.
- 2. Les facteurs qui influent sur les résultats comprennent la taille de l'inoculum, le taux de croissance, la formulation et le pH du milieu, l'environnement d'incubation, la durée de l'incubation, la qualité du disque et le taux de diffusion de l'antibiotique.

13.0 Références

- 1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing - EUCAST disk diffusion method version 6.0: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2017.
- 2. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.
- 3. Clinical Laboratory Standards Institute M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition (M100S28E edition). January 2018.
- 4. Clinical Laboratory Standards Institute M7-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 9th Edition (M7-A9 edition). January 2012
- 5. Murray et al. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. ASM Press. 2007.

14. Procédure du test d'Epsilometer (E-Test)

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour effectuer le test epsilometer (E-test) pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des agents antimicrobiens.

2.0 Principe

Le test epsilometer (E-Test) évalue la capacité d'un organisme à se développer en présence des agents antimicrobiens. Les isolats bactériens sont ensemencés à confluence (une croissance confluyente de bactéries) sur un milieu gélose. Avant l'incubation, une bandelette E-test, contenant un gradient de concentration d'un seul antibiotique (à des dilutions de 2), est appliquée sur la gélose. L'agent antimicrobien se diffuse dans la gélose et constitue un défi de croissance pour l'organisme. Après une nuit d'incubation, une ellipse d'inhibition de croissance sera observée autour de la bandelette de E-test, qui peut être utilisée pour définir la concentration minimale inhibitrice (CMI) définie comme la concentration d'agent antimicrobien à l'endroit où l'ellipse d'inhibition de croissance touche la bandelette.

Remarque : le E-test n'est pas considéré comme une méthode de référence par le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) et le Comité Européen sur les Tests de Sensibilité aux Antimicrobiens (EUCAST). Néanmoins, selon le fabricant, les valeurs de CMI obtenues par l'E-test peuvent être comparées aux tableaux d'interprétation du CLSI afin de déterminer l'interprétation de la susceptibilité (sensible, intermédiaire, non sensible ou résistant).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
EPP	Équipement de Protection Personnel
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
EUCAST	Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens
UFC	Des unités formant des colonies
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.
3. Source de lumière
4. Vortex
5. *Optionnelle* : appareil pour distribuer multiples bandes antibiotiques
6. *Optionnelle* : Turbidimètre
7. *Optionnelle* : Mini Grip-It™

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Pour chaque organisme spécifique à tester, le milieu approprié doit être disponible.

- a. Milieu de croissance : une gélose qui soutient la croissance
- b. Bouillon de dilution : utilisé pour l'inoculation du test de sensibilité aux antimicrobiens
- c. Milieu d'essai : utilisé pour la croissance en présence de l'agent antimicrobien
- d. Le tableau ci-dessous donne les spécifications des milieux de croissance. Reportez-vous à la notice de E-test ou aux documents CLSI pour vérifier les spécifications du milieu.

	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Milieu de croissance	Gélose au chocolat	Gélose au chocolat	Gélose au sang	Gélose au sang
Bouillon de dilution	Bouillon Mueller Hinton	Bouillon milieu d'essai <i>Haemophilus</i>	Bouillon Mueller Hinton	Eau stérile déméralisé
Test du milieu*	Gélose Mueller Hinton avec 5% de sang de mouton	Milieu gélose d'essai <i>Haemophilus</i>	Gélose Mueller Hinton avec 5% de sang de mouton	Bouillon Mueller Hinton

1. Milieu d'essai *: Des plaques/boîtes de milieu gélose ayant un diamètre de 100 ou 150 mm peuvent être utilisées, en fonction du nombre d'agents antimicrobiens à tester.

- a. Utiliser un maximum de 2 bandes sur une boîte de 100 mm et 6 bandes sur une boîte de 150 mm.

2. Bandes E-test :

- a. Reportez-vous au document CLSI / EUCAST pour obtenir la liste complète des bandes antimicrobiens ainsi que les critères d'interprétation pour l'organisme spécifique à tester.
- b. Pour assurer une activité optimale des bandes de E-test, stocker en fonction de la température indiquée sur l'emballage jusqu'à la date d'expiration.

6.0 Consommables

1. Standard de turbidité McFarland 0,5
2. Écouvillons Dacron Polyesters (préférés) ou ensemenceurs
3. Pincettes stériles
4. Sac poubelle biorisque
5. Conteneur biorisque pour objets tranchants

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
 - a. *Remarque* : Si les boîtes de milieu gélose doivent être ouvertes lors de la lecture de la zone d'inhibition, il est recommandé d'effectuer les lectures dans un PSM.
4. Si applicable, objets tranchants et verres doivent être mis au rebut dans un conteneur résistant à la perforation pour les objets tranchants biorisques.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits qui seront utilisés pendant ce test pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individu colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.

Remarque : si l'isolat à tester provient d'un stock congelé :

 - i. Étaler l'isolat sur un milieu gélose approprié et permettre la croissance pendant la nuit.
 - ii. Sous-cultiver une seule colonie sur un milieu gélose frais et permettre la croissance pendant la nuit avant de commencer d'un test par la méthode E-test suivant les conditions de croissance du CLSI.
2. Étiqueter les boîtes de milieu gélose et les tubes de bouillon avec le numéro d'identification de l'échantillon.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle de qualité recommandés par CLSI ou EUCAST. Seules les souches ATCC doivent être utilisées pour le contrôle de qualité. Pour chaque organisme d'intérêt, les souches de CQ routine suggérée par le CLSI sont énumérées ci-dessous.
2. Les souches de CQ routine recommandées par le CLSI sont listées ci-dessous pour chaque organisme d'intérêt :
 - a. *N. meningitidis* : *S. pneumoniae* ATCC 49619 et *E. coli* ATCC 25922
 - b. *H. influenzae* : *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, et *E. coli* ATCC 35218
 - c. *S. pneumoniae*: *S. pneumoniae* ATCC 49619
 - d. *Remarque* : les recommandations des souches QC d'EUCAST peuvent différer. Consulter le manuel.
3. Avant leur utilisation, tester la stérilité et la capacité de croissance de chaque nouveau milieu de croissance.
 - a. Effectuer un test de stérilité (incuber le milieu non inoculé dans des conditions de croissance normales pour confirmer l'absence de croissance).
 - b. Inoculer les nouveaux milieux de croissance avec une souche de contrôle de qualité pour vous assurer qu'ils peuvent soutenir une croissance normale.
4. Lors des tests, les souches de contrôle de qualité doivent être incluses chaque semaine que le test est effectué afin de confirmer la qualité / performance des bandelettes et l'intégrité globale du processus de test (voir CLSI / EUCAST pour des recommandations supplémentaires).
 - a. Pour que les résultats obtenus au cours de la journée soient considérés comme valides, les résultats des tests des organismes de contrôle de qualité doivent être dans les limites indiqués dans les manuels du CLSI / EUCAST.

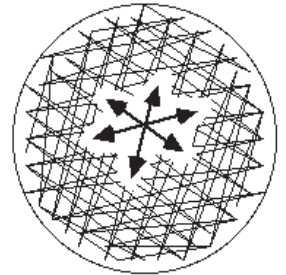
10.0 Procédure

1. Laisser les milieux géloses et les bandes d'E-test s'équilibrer à la température ambiante avant utilisation.
 - a. N'équilibrer que le nombre de bandelettes de E-test nécessaires pour la journée (y compris quelques extra) et remettre immédiatement les bandelettes d'E-test à la température de stockage appropriée.
 - b. Les milieux géloses peuvent être placés dans un incubateur à 35–37 °C (sans CO₂ et non utilisé pour la culture d'agents pathogènes).
 - c. La surface de la gélose doit être humide, mais aucune gouttelette d'eau ne doit être visible sur la gélose ou sur le couvercle lors de l'inoculation.
2. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
3. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incuber pour une nuit.
 - a. Si vous commencer d'un stock d'isolats gelés, voir « 8.0 Information sur l'échantillon / Traitement » de cette procédure.

- b. Les conditions de croissance du CLSI sont énumérées ci-dessous :
 - i. *H. influenzae* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - ii. *N. meningitidis* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iii. *S. pneumoniae* : 18-20 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iv. *E. coli* : 18-24 heures, 35 ± 2 °C, air ambiant
4. Préparation d'inoculum utilisant la méthode de suspension directe de colonies
 - a. À l'aide d'un écouvillon, sélectionner plusieurs colonies isolées dans une culture d'une nuit et remettre-les en suspension dans le bouillon de dilution approprié pour l'organisme à tester.
 - b. Vortexer.
 - c. Confirmer que la suspension est uniforme et est une concentration équivalente à celle d'un standard de turbidité McFarland 0,5 (1x10⁸ à 2x10⁸ UFC / mL).
 - i. Si disponible, un turbidimètre peut également être utilisé pour confirmer la densité de la suspension.
 - d. Si nécessaire, ajuster la densité de la suspension bactérienne.
 - i. Ajouter des bactéries supplémentaires pour augmenter la turbidité
 - ii. Diluer avec un bouillon de dilution stérile pour réduire la turbidité.

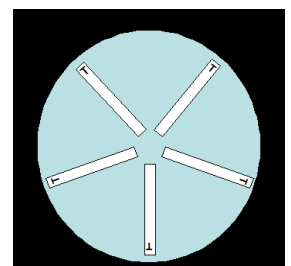
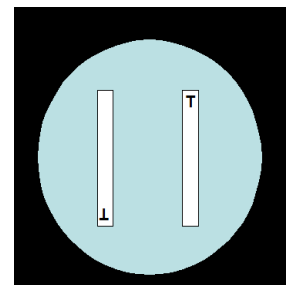
5. Inoculation de milieu gélose

- a. Important : Inoculer le milieu gélose dans les 15 minutes suivant la préparation de la suspension.
- b. Tremper un écouvillon stérile en polyester dans le tube d'inoculum et faites-le tourner au-dessus du liquide et contre la paroi du tube pour éliminer l'excès de liquide.
- c. Ensemencer toute la surface entière de la gélose à trois reprises, en la faisant pivoter d'environ 60° entre les stries pour assurer une répartition uniforme (stries pour une croissance confluyente de bactéries).
- d. Éviter de toucher les côtés de la boîte du milieu gélose pour éviter les aérosols. Enfin, passer l'ensemencement sur le bord de la gélose pour éliminer toute humidité excessive.
- e. Laisser sécher le milieu gélose inoculée pendant 15 à 20 minutes avant d'appliquer les bandes d'E-test. La surface doit être complètement sèche avant d'appliquer les bandes de dégradé E-test.



6. Application de bandes

- a. *Remarque* : utiliser au maximum 2 bandes (boîte de 100 mm) ou 6 bandes (boîte de 150 mm). Assurez-vous que les valeurs CMI imprimées sont orientées vers le haut (pour assurer que les antibiotiques sont en contact avec la gélose).
- b. Une fois que le milieu gélose est sèche, appliquer les bandes sur la surface de la gélose à l'aide d'un appareil pour distribuer multiples bandes antibiotiques ou manuellement à l'aide d'une pince stérile.
 - i. Pour une boîte de 100 mm, deux bandes d'E-test sont placées dans une orientation opposée. Le «T» désigne le haut de la bande.
 - ii. Pour une boîte de 150 mm, la concentration d'antibiotique la plus faible est orientée vers le centre du milieu gélose pour les 6 bandes. Le «T» désigne le haut de la bande.
 - iii. Les images viennent de [1].
- c. Une fois le milieu gélose est sèche, appliquer les bandes sur la surface de la gélose à l'aide d'un doseur ou manuellement à l'aide d'une pince stérile.
 - i. Si la pince touche la surface de la gélose, décontaminer-la avant de continuer.



- d. Une fois qu'une bande est mise en contact avec la surface de la gélose, ne la déplacer pas. Le mouvement rend la zone d'inhibition impossible à interpréter.
 - i. Si nécessaire, placer une nouvelle bande à un autre emplacement sur la gélose.
 - e. Appliquer une légère pression sur chaque bande à l'aide de la pince stérile pour assurer un contact complet avec la gélose (certains distributeurs le font automatiquement).
7. Incubation
- a. Inverser les milieux géloses et incuber dans les 15 minutes suivant l'application du disque.
 - b. Incuber les milieux géloses conformément aux recommandations du CLSI / EUCAST. Les conditions d'incubation du CLSI sont énumérées ci-dessous :
 - i. *H. influenzae* : 16-18 h, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - ii. *N. meningitidis* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iii. *S. pneumoniae* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iv. *E. coli* : 16-20 heures, air ambiant à 35 ± 2 °C
8. Mesurer la zone d'inhibition
- a. Considérations importantes
 - i. Si la croissance est intermittente, l'inoculum n'est pas suffisant et la procédure doit être répétée. Ne lire le CMI que sur des milieux géloses au moins presque confluentes.
 - ii. Lors du test d'organismes hémolytiques, mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance et non la zone d'inhibition de l'hémolyse.
 - b. Lire le CMI comme la valeur où l'inhibition complète de toute croissance croise la bande d'E-test (là où l'inhibition complète commence).
 - i. Si aucune inhibition de croissance n'est observée, indiquer que la CMI est supérieure à la valeur la plus élevée sur la bande.
 - ii. Si vous observez une croissance incertaine, reportez-vous au guide de lecture pour vous aider à interpréter la CMI (effets spécifiques à l'organisme, effets liés à l'antibiotique, effets liés au mécanisme de résistance, etc.). Il fournit également des conseils pour les problèmes techniques généraux et de manipulation tels que comme : (1) inhibition coupant la bande entre deux valeurs de CMI ou (2) croissance inégale des deux côtés de la bande (http://www.illexmedical.com/files/ETEST_RG.pdf)
 - iii. *Remarque* : L'utilisation de la lumière d'une lampe avec une surface noire à l'arrière-plan peut faciliter les mesures. Une loupe peut également être utilisée.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Une fois que les CMIs ont été obtenues, le fabricant d'E-test recommande d'utiliser les critères spécifiés par le CLSI pour interpréter la susceptibilité et obtenir les résultats catégoriels (sensible (S), intermédiaire (I), résistant (R) ou non sensible (NS)).
2. Considérations supplémentaires
 - a. Enregistrer les résultats du CQ en premier. Si la souche de contrôle de qualité n'est pas dans les limites prévues, le test n'est pas valide et doit être répété.
 - b. Noter toutes les observations imprévues telles qu'une zone de mise à mort incomplète (points de terminaison) ou des colonies individuelles poussant dans l'ellipse.

12.0 Limites du test

1. Ce test dépend de critères d'interprétations spécifiques. Le strict respect du protocole et des directives CLSI / EUCAST est nécessaire pour garantir des résultats précis.

2. Les facteurs qui influent sur les résultats comprennent la taille de l'inoculum, le taux de croissance, la formulation et le pH du milieu, l'environnement d'incubation, la durée de l'incubation, la longueur de la bande E-test, la qualité de la bande et le taux de diffusion de l'antibiotique.

13.0 Références

1. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention US. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization 2011.
2. Biomerieux. ETEST APPLICATION GUIDE. Available at: https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/supplementary_inserts_-_16273_-_b_-_en_-_eag_-_etest_application_guide-3.pdf. Accessed October 30, 2019.

15. Procédure de la méthode sensible de microdilution

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour la méthode de microdilution en bouillon pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

2.0 Principe

Les tests de sensibilité aux antimicrobiens évaluent la capacité d'un organisme à se développer en présence de divers agents antimicrobiens. Pour la méthode de microdilution en bouillon, les isolats bactériens sont inoculés dans un bouillon contenant un agent antimicrobien. Les dosages de microdilution en bouillon sont préparés dans des plaques à 96 puits, avec des concentrations multiples (dans des dilutions de 2) pour chaque agent antimicrobien présent sur le panel. Si la croissance de l'organisme n'est pas inhibée, un culot bactérien sera visible au fond du puits. Si l'organisme est sensible à l'agent antimicrobien, le bouillon sera clair car aucune croissance ne se sera produite. La CMI est la plus faible concentration d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance macroscopique d'une bactérie. Une fois que les CMI ont été obtenues, la susceptibilité de l'organisme peut être déduite à l'aide de tableaux d'interprétation, qui définissent les seuils pour les interprétations : sensibles, intermédiaires, non sensibles, ou résistantes.

Les critères d'interprétation et les exigences de méthode applicables aux tests de sensibilité aux antimicrobiens, y compris la microdilution en bouillon, sont publiés par le CLSI et par le Comité Européen sur les Tests de Sensibilité aux Antimicrobiens (EUCAST).

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
EPP	Équipement de Protection Personnel
TSA	Tests de sensibilité aux antimicrobiens
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
EUCAST	Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens
UFC	Des unités formant des colonies
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CQ	Contrôle de Qualité
BMH	Bouillon Muller Hinton
SCL	Sang de cheval lysé

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou des paquets de CO₂ suffit.
3. Incubateur à 35–37°C, sans CO₂
4. Vortex
5. Sensititre AutoInoculator (AIM)
6. Sensititre Nephelometer™

7. Pipettes (2-20 µL et 200-1000 µL)
8. Supports pour tube de 20 mL
9. Boîte à miroir
10. Support pour les tubes d'essai

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Pour chaque organisme spécifique à tester, le milieu approprié doit être disponible.
 - a. Milieu de croissance : une gélose qui soutient la croissance
 - b. Bouillon de dilution : utilisé pour l'inoculation du test de sensibilité aux antimicrobiens
 - c. Milieu d'essai : utilisé pour la croissance en présence de l'agent antimicrobien
 - d. Le tableau ci-dessous donne les spécifications des milieux de croissance. Reportez-vous à la notice de E-test ou aux documents CLSI pour vérifier les spécifications du milieu.

	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Milieu de croissance	Gélose au chocolat	Gélose au chocolat	Gélose au sang	Gélose au sang
5 mL de Bouillon de dilution	Bouillon Mueller Hinton (Remel; Catalog No. YT3462-05)	Bouillon Mueller Hinton (Remel; Catalog No. YT3462-05)	Bouillon Mueller Hinton (Remel; Catalog No. YT3462-05)	Eau stérile déminéralisé (Remel; Catalog No. YT3339)
11 mL du Test du milieu*	Mueller Hinton avec 5% de sang de cheval lysé (Remel; Catalog No. YCP112-10)	Bouillon d'essai <i>Haemophilus</i> (Remel; Catalog No. YT3470)	Bouillon Mueller Hinton avec 5% de sang de cheval lysé (Remel; Catalog No. YCP112-10)	Bouillon Mueller Hinton (Remel; Catalog No. YT3462)

1. Milieu d'essai *: Les tubes de bouillon auront besoin de 11 mL pour l'inoculation de la plaque à 96 puits
2. Les panneaux d'agents antimicrobiens peuvent être obtenus commercialement ou préparés à l'aide de poudres d'agents antimicrobiens et de milieux.
 - a. Exemple de panneau commerciale disponible : panneau Sensititre HPB1 (*Haemophilus influenzae* / *Streptococcus pneumoniae*) (Remel ; numéro de catalogue YHPB1)
 - b. Pour décider quels agents antimicrobiens à tester, reportez-vous au manuel CLSI / EUCAST pour obtenir la liste complète des agents antimicrobiens ainsi que les CMI avec les catégories d'interprétation pour l'organisme d'intérêt.
 - c. Les panneaux peuvent être conservés à -20 °C ou selon les instructions du fabricant.

6.0 Consommables

1. Standard de turbidité McFarland 0,5 (Remel; Catalog No. E1041)
2. Ensemenceurs (1 µL et 10 µL)
3. Têtes de dosage Sensititre (Remel; numéro de catalogue YT-E3010)
4. Écouvillons Dacron Polyesters
5. Embouts de pipette extra-longues (20-200 µL) (Référence catalogue Rainin 17008887)
6. Embouts de pipette (2-20 µL)

7. Films transparents non collants (numéro de catalogue Remel YG523M)
8. Kim Lingettes
9. Conteneur biorisque pour objets tranchants
10. Sac poubelle biohazard

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
 - a. *Remarque* : Si les films transparents doivent être retirés pendant la lecture du MIC, il est recommandé d'effectuer la lecture dans un PSM.
4. Si applicable, objets tranchants et verres doivent être mis au rebut dans un conteneur résistant à la perforation pour les objets tranchants biorisques.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits qui seront utilisés pendant ce test pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individu colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
 - b. *Remarque* : si l'isolat à tester provient d'un stock congelé :
 - i. Étaler l'isolat sur un milieu gélose approprié et permettre la croissance pendant la nuit.
 - ii. Sous-cultiver une seule colonie sur un milieu gélose frais et permettre la croissance pendant la nuit avant d'inoculer un panneau de CMI suivant les conditions de croissance du CLSI.
2. Étiqueter les boîtes de milieu gélose et les tubes de bouillon avec le numéro d'identification de l'échantillon.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle de qualité recommandés par CLSI ou EUCAST. Seules les souches ATCC doivent être utilisées pour le contrôle de qualité. Pour chaque organisme d'intérêt, les souches de CQ de routine suggérée par le CLSI sont énumérées ci-dessous.
2. Les souches de routine recommandées par le CLSI sont listées ci-dessous pour chaque organisme d'intérêt :
 - a. *N. meningitidis* : *S. pneumoniae* ATCC 49619 et *E. coli* ATCC 25922
 - b. *H. influenzae* : *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, et *E. coli* ATCC 35218
 - c. *S. pneumoniae*: *S. pneumoniae* ATCC 49619
 - d. *Remarque* : les recommandations des souches QC d'EUCAST peuvent différer. Consulter le manuel.
3. Avant leur utilisation, tester la stérilité et la capacité de croissance de chaque nouveau milieu de croissance.
 - a. Effectuer un test de stérilité (incuber le milieu non inoculé dans des conditions de croissance normales pour confirmer l'absence de croissance).
 - b. Inoculer les nouveaux milieux de croissance avec une souche de contrôle de qualité pour vous assurer qu'ils

peuvent soutenir une croissance normale.

4. Lors des tests, les souches de contrôle de qualité doivent être incluses chaque semaine que le test est effectué afin de confirmer la qualité / performance des panneaux d'antimicrobiens et l'intégrité globale du processus de test (voir CLSI / EUCAST pour des recommandations supplémentaires).
 - a. Sur chaque panel de tests de sensibilité aux antimicrobiens (TSA), des puits de contrôle positif (dépourvus d'agents antimicrobiens) sont inoculés pour vérifier que le bouillon est toujours capable de soutenir la croissance.
 - b. Pour que les résultats obtenus au cours de la journée soient considérés comme valides, les résultats des tests des organismes de contrôle de qualité doivent être dans les limites indiqués dans les manuels du CLSI / EUCAST.
 - c. Pour assurer la pureté des bactéries inoculées, des boîtes de milieu gélose (boîte de pureté) et le comptage de colonies sont utilisés.
 - i. Après l'inoculation de chaque panel TSA, 1 µL d'un puits de contrôle positif est étalé sur la gélose appropriée et incubé pendant une nuit dans des conditions adaptées à l'organisme. Environ ≥ 100 colonies pures doivent être détectées.
 - ii. Périodiquement, un comptage officiel des colonies doit être effectué en prélevant 1 µL d'un puits de contrôle positif et en le diluant dans 50 µL d'eau stérile. Ensuite, 1 µL de cette dilution est étalé sur la gélose appropriée et incubé jusqu'au lendemain dans des conditions adaptées à l'organisme. Après l'incubation, effectuer un comptage des colonies pour confirmer que l'inoculum est entre les limites (2×10^5 - 7×10^5 UFC / mL).

10.0 Procédure

1. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
2. Étaler les bactéries sur un milieu gélose approprié et incubé pour une nuit.
 - a. Si vous commencez d'un stock d'isolats gelés, voir « 8.0 Information sur l'échantillon / Traitement » de cette procédure.
 - b. Les conditions de croissance du CLSI sont énumérées ci-dessous :
 - i. *H. influenzae* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - ii. *N. meningitidis* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iii. *S. pneumoniae* : 18-20 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iv. *E. coli* : 18-24 heures, 35 ± 2 °C, air ambiant
3. Laisser les boîtes de milieu gélose, milieu de dilution, et bouillon s'équilibrer à la température ambiante avant utilisation.
 - a. Les milieux géloses peuvent être placés dans un incubateur à 35–37 °C (sans CO₂ et non utilisé pour la culture d'agents pathogènes).
4. Calibrer le Néphélomètre™ :
 - a. Inverser le tube de standard de turbidité McFarland 0,5 pour 5 à 6 fois. Essuyer le bas du tube avec un KimWipe. (Remarque: NE PAS vortexer le McFarland)
 - b. Insérer le tube dans le néphélomètre.
 - c. Appuyer sur le bouton « CAL » sur le panneau.
 - d. Attendre que les lumières du panneau deviennent vertes et puis arrête de clignoter (cela indique que l'appareil a été étalonné).
 - e. Si les lumières ne tournent pas vertes mais sont rouges, essuyer le bas du tube et répéter les étapes précédentes (4a-d).
5. Préparer la suspension bactérienne
 - a. Dévisser le couvercle du tube de bouillon de dilution de 5 mL.

- b. À l'aide d'un écouvillon, sélectionner plusieurs colonies isolées dans une culture d'une nuit et remettre-les en suspension dans le bouillon de dilution approprié pour l'organisme à tester.
 - i. *H. influenzae* : Bouillon Mueller Hinton
 - ii. *N. meningitidis* : Bouillon Mueller Hinton
 - iii. *S. pneumoniae* : Bouillon Mueller Hinton
 - iv. *E. coli* : Eau stérile
 - c. Fermer le couvercle sans trop serrer.
 - d. Vortexer tube de bouillon de dilution pendant 10 secondes pour créer une solution homogène.
 - e. Placer le tube dans le néphélomètre (turbidimètre) pour confirmer que la concentration est équivalente à un standard de turbidité McFarland 0,5 (1×10^8 à 2×10^8 UFC / mL).
 - i. *Remarque* : pour lire chaque tube utilisant le néphélomètre, placer simplement le tube dans le support et n'appuyer sur aucun bouton. Les lumières vont changer et afficher en vert si la suspension est correcte.
 - f. Si nécessaire, ajuster la densité de la suspension bactérienne.
 - i. Ajouter des bactéries supplémentaires pour augmenter la turbidité
 - ii. Diluer avec un bouillon de dilution stérile pour réduire la turbidité.
6. Inoculation du panneau antibiotique
- a. Important : Inoculer le milieu gélose dans les 30 minutes suivant la préparation de la suspension pour assurer que la distribution de l'inoculum précis.
 - b. Déboucher la suspension bactérienne et le bouillon de 11 mL de milieu de test.
 - c. À l'aide d'un embout extra-longue, transférer le volume approprié de la suspension bactérienne dans le tube de 11 mL de milieu de test. Le milieu de test doit donner un inoculum de 1×10^5 UFC / mL pour *E. coli* et de 5×10^5 UFC / mL pour *H. influenzae*, *N. meningitidis* et *S. pneumoniae*.
 - d. Placer une tête de dosage sur le tube contenant le milieu de test et fermer-le en bien serrant. Inverser le tube de milieu de test 6 à 8 fois pour bien mélanger.
 - i. *Remarque* : veiller à ne pas toucher l'extrémité de la tête de dosage, ce qui pourrait contaminer la culture.
 - e. Insérer le tube dans le support de la machine à auto-inoculation (AIM) et stabiliser-le à l'aide du bouton.
 - f. Appuyer deux fois sur l'écran pour lancer l'AIM et distribuer le volume approprié.
 - i. La quantité de volume à distribuer dépend du panneau CMI utilisé. Par exemple, distribuer 100 µL par puits lorsque vous utiliser le panneau HPB1 de Remel.
 - ii. *Remarque* : le volume et la disposition des panneaux pour la distribution par l'AIM peuvent être modifiés. Par conséquent, avant de commencer le test, assurez-vous que vous avez défini le plan des panneaux et les paramètres de volume appropriés.
 - g. Retirer le tube de bouillon de milieu de test de l'AIM et jeter le tube de manière appropriée (utiliser un récipient pour objets tranchants si des tubes de verre sont utilisés).
 - i. *Remarque* : Il est important de retirer le tube dans les 30 secondes qui suivent la distribution pour éviter toute fuite.
 - h. Insérer un enseigneur de 1 µL dans un puits de contrôle positif et étaler pour la croissance sur une gélose spécifique de l'organisme, qui servira de boîte de pureté pour cet isolat bactérien.
 - i. *Remarque* : les colonies sur ce milieu gélose seront comptées. Tracer une ligne sur la gélose avec l'enseigneur. Puis, étaler sur toute la surface, dans plusieurs directions afin de maximiser la propagation de la colonie.
 - ii. Pour effectuer le compte officiel des colonies, voir la section « 9.0 Contrôle de qualité », N° 4.

- i. En fonction des conditions d'incubation (avec ou sans CO₂), sceller les panneaux en conséquence.
 - i. *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, et *E. coli* nécessitent des incubations sans CO₂. Sceller les panneaux avec un film plastique (non collants) et incuber pendant le temps approprié.
 - 1. *Remarque* : assurez-vous que le film transparent est bien appuyé contre le bord des puits et que des plis ne sont pas formés. Cela empêchera les échanges de gaz.
 - ii. *N. meningitidis* a besoin de CO₂ pendant l'incubation. Les milieux géloses doivent être placés dans des sacs presque complètement scellés afin de protéger des aérosols tout en permettant les échanges gazeux.
 - 1. *Remarque* : Une évaluation des risques spécifique au site doit être effectuée pour garantir que cette opération peut être effectuée en toute sécurité.
 - j. Incuber les panels d'antibiotiques en conformant aux recommandations du CLSI / EUCAST. Les conditions d'incubation du CLSI sont énumérées ci-dessous :
 - i. *H. influenzae* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C, air ambiant
 - ii. *N. meningitidis* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C sous 5% CO₂
 - iii. *S. pneumoniae* : 20-24 heures, 35 ± 2 °C, air ambiant
 - iv. *E. coli* : 16-20 heures, air ambiant à 35 ± 2 °C
 - k. Placer les boîtes de pureté dans un incubateur approprié (CO₂ ou non CO₂) pour la croissance, pour une nuit.
7. Lecture des panels d'antibiotiques et confirmation de la pureté
- a. Placer chaque panneau d'antibiotiques sur une boîte miroir pour enregistrer manuellement le CMI.
 - i. La CMI sera la plus faible concentration d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance d'un isolat dans un puits.
 - ii. La croissance apparaît sous forme de turbidité ou de dépôt de cellules au fond du puits.
 - iii. *Remarque* : L'utilisation d'un fond sombre ou d'une lampe peut faciliter la lecture précise du CMI.
 - b. Vérifier les boîtes de pureté pour chaque isolat afin de confirmer qu'aucune contamination ne s'est produite lors de la configuration de l'essai.
 - i. Le nombre de colonies présentes peut être compté pour en déduire le nombre de colonies dans le bouillon de test utilisé, mais il n'est pas le nombre officiel de colonies (voir la section « 9.0 Contrôle la qualité », N° 4).
 - c. Si applicable, remplir un compte officiel de colonies.

11.0 Interprétation des Résultats

1. Pour lire les résultats, il peut être nécessaire de retirer le film transparent. Si le film doit être enlevé, il est recommandé de lire les CMI dans un PSM.
2. Vérifier que les puits de contrôle positif sur le panneau ont une croissance. Si les puits du contrôle positif n'ont pas de croissance, le test de ce panneau ne sont pas valides et doivent être répétés.
3. Enregistrer les résultats du CQ en premier. Si la souche de contrôle de qualité n'est pas dans les limites prévues, le test n'est pas valide et doit être répété.
4. La CMI peut être enregistrée comme <, =, ou ≥ la valeur de l'antibiotique dans le puits où aucune croissance n'est observée.
 - a. Si aucune croissance n'est observée dans les puits avec la plus faible concentration d'antibiotique, la CMI est <cette valeur (ex : <2, si le spectre de la concentration de l'antibiotique était entre 2 et 16).

- b. Si aucune croissance n'est observée dans un puits qui n'est pas la concentration la plus basse de l'antibiotique, la CMI est = cette valeur (ex : = 4 ou = 16, si le spectre de la concentration de l'antibiotique était comprise entre 2 et 16).
 - c. Si la croissance est observée dans les puits avec la concentration la plus élevée d'un antibiotique, la CMI est \geq cette valeur (ex : ≥ 16 si le spectre de la concentration de l'antibiotique était entre 2 et 16).
5. Utiliser les critères spécifiés du CLSI ou EUCAST pour interpréter le résultat catégoriel comme sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R) pour chaque agent antimicrobien.

12.0 Limites du test

1. Le strict respect du protocole et des directives CLSI / EUCAST est nécessaire pour garantir des résultats précis.
2. La lecture du CMI peut être difficile, en particulier si la croissance se produit sous la forme d'une turbidité diffuse.

13.0 Références

1. Manual Antimicrobial Susceptibility Testing | Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/.../antimicrobial-susceptibility-testing>
2. CLSI M100 Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100S27E edition).
3. CLSI M7-A9 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically (M7-A9 edition).
4. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing - EUCAST disk diffusion method version 6.0: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2017.

16. Procédure du test NH d'API®

1.0 But

Cette procédure fournit des instructions pour l'identification rapide des espèces de *Neisseria* et *Haemophilus* (et des genres apparentés), ainsi que de *Moraxella catarrhalis* à l'aide de bandelettes API *Neisseria* / *Haemophilus* (NH).

2.0 Principe

Les bandelettes de test API NH sont une série de puits (cupules) contenant des substrats déshydratés pour des tests biochimiques distincts. Chaque cupule détecte une activité enzymatique ou une fermentation du sucre par les organismes inoculés. Après chaque réaction biochimique, un changement de couleur est produit spontanément ou après l'ajout de réactifs supplémentaires à la cupule. Les résultats de tous les tests biochimiques ensemble sont pris en compte lors de la détermination de l'identification de l'espèce.

3.0 Définitions

Terme	Définition
PSM	Poste de sécurité microbiologique
NH	<i>Neisseria</i> /Haemophilus
EPP	Équipement de Protection Personnel
CQ	Contrôle de Qualité

4.0 Équipement

1. Poste de sécurité microbiologique (PSM) Classe IIA
2. Minuterie
3. Pipette de 20-200 µL
4. Incubateur à 35–37°C, sans CO₂
5. Incubateur à 35–37°C avec 5% CO₂
 - a. Si aucun incubateur à CO₂ n'est disponible, un incubateur à 35–37 °C complété par une jarre à bougie ou un paquet de CO₂ suffit.

5.0 Réactifs et milieux de culture

1. Milieux géloses appropriés pour la croissance bactérienne
2. Inclus dans le kit de bandelette NH d'API
 - a. Bandelettes NH d'API
 - b. 2 mL d'ampoule de NaCl à 0,85%
 - c. Boîtes d'incubations et couvercles d'incubation
 - d. Réactif James (expire un mois après son ouverture ; doit être protégé de la lumière)
 - e. Réactif Zym B (expire deux semaines après son ouverture)

6.0 Consommables

1. Écouvillons en polyester Dacron
2. Embout pipette de 20-200 µL
3. Huile minérale

4. Standard de turbidité McFarland 4,0
5. Sac poubelle biorisque
6. Conteneur biorisque pour objets tranchants

7.0 Mesures de sécurité

1. Porter les EPP appropriés, y compris gants et blouse de laboratoire.
2. Toutes les procédures doivent être prudemment effectuées afin de minimiser les éclaboussures et / ou les aérosols
3. Idéalement, toutes les procédures pouvant créer l'aérosolisation d'un organisme vivant devraient être effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Si aucun PSM n'est disponible, l'utilisation d'un respirateur N95 est recommandée.
4. Si applicables, les objets tranchants doivent être mis au rebut dans un conteneur biorisque résistant à la perforation.
5. Reportez-vous à la fiche de données de sécurité des produits qui seront utilisés pour les informations de stockage, de manipulation, et d'élimination appropriées.

8.0 Informations sur l'échantillon / traitement

1. Lors de la caractérisation des isolats bactériens, ce test doit être effectué à l'aide d'une sous-culture d'un individuel colonie pure ne datant plus de 24 heures.
 - a. Si la croissance obtenue ne consiste pas en une culture pure d'une morphologie, sous-cultiver une autre colonie isolée (à 35–37°C sous 5% CO₂) jusqu'à ce qu'une culture pure soit disponible avant de procéder aux tests.
2. Étiqueter chaque bandelette NH d'API avec le numéro d'identification de l'échantillon.

9.0 Contrôle de Qualité (CQ)

1. Utiliser les organismes de contrôle positifs et négatifs suivants pendant le contrôle de qualité. Seules les souches bien caractérisées comme les souches ATCC devraient être utilisées pour le contrôle de qualité. Reportez-vous à la notice du fabricant du test pour une liste complète des souches ATCC recommandées.
 - a. *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 31426) : PEN / GLU / ProA (+), tous les autres (-).
 - b. *Haemophilus influenzae* (ATCC 10211) : GLU / ODC / URE / PAL / IND (+), variable FRU, tous les autres (-).
 - c. *Aggregatibacter* (autrefois *Haemophilus*) *paraphrophilus* (ATCC 49917) : GLU / FRU / MAL / SAC / PAL / GAL / GGT (+), tous les autres (-).
2. Avant leur utilisation, tester chaque nouveau lot de réactif avec un contrôle positif et négatif.
3. Lors de l'essai, les souches de CQ doivent être incluses à chaque fois que le test est effectué.

10.0 Procédure

1. Équilibrer une solution de 0,85%, saline, les bandelettes NH d'API, et les réactifs à la température ambiante.
2. Les étapes suivantes devraient être effectuées dans un PSM si possible.
3. Étaler les bactéries sur un milieu gélose appropriée et incubé pour une nuit à 35–37°C sous 5% CO₂.
4. Préparer l'inoculum
 - a. Ouvrir une ampoule de 2 mL de 0,85% NaCl en utilisant le protecteur de l'ampoule.
 - b. À l'aide d'un écouvillon, collecter plusieurs colonies isolées et remettre en suspension dans l'ampoule de solution saline.

- c. Confirmer que la suspension est uniforme et a une concentration équivalente à un standard de turbidité McFarland 4,0.
5. Inoculer chaque cupule avec la suspension bactérienne immédiatement après sa préparation.
 - a. *Remarque* : Veiller à éviter les éclaboussures et la formation de bulles lors de l'inoculation.
 - b. Pipeter 50 µL de suspension bactérienne dans les 7 premières cupules (de PEN à URE).
 - c. Pipeter 150 µL de la suspension bactérienne dans les 3 dernières cupules (LIP / ProA, PAL / GGT et βGAL / IND).
 - d. Ajouter 1 à 2 gouttes d'huile minérale dans chacune des 7 premières cupules (de PEN à URE).
6. Couvre la boîte d'incubation avec le couvercle.
7. Incuber la boîte d'incubation contenant la bandelette NH pendant 2 heures +/- 15 minutes à 35–37 °C dans des conditions aérobies (incubateur sans CO₂).
8. Après l'incubation, lire la bandelette et enregistrer les résultats (voir « Interprétation des résultats »).
9. Pour les 3 dernières cupules (LIP / ProA, PAL / GGT et βGAL / IND), deux réactions sont enregistrées.
 - a. Noter les résultats des premières réactions (LIP, PAL, βGAL).
 - b. Ajouter 1-2 gouttes de réactif Zym B dans les cupules 8 et 9 (étiquetées LIP / ProA et PAL / GGT)
 - i. Si la réaction LIP est bleue, n'ajouter pas de réactif Zym B. Enregistrer la réaction ProA comme négative.
 - c. Ajouter 1-2 gouttes de réactif James dans la cupule 10 (marquée βGAL / IND).
 - d. Incuber pendant 3 minutes. Lire les résultats en vous référant à "Interprétation des résultats".

11.0 Interprétation des Résultats

1. Lire et noter les résultats sous la forme (+) ou (-) pour toutes les cupules sur la fiche fournie dans le kit.
 - a. Important : Les trois dernières cupules contiennent deux réactions à enregistrer (LIP / ProA, PAL / GGT, et βGAL / IND).

Détection des résultats positifs et négatifs par cupule dans la bandelette NH d'API	
Couleur attendue après l'inoculation seulement	
Couleur attendue après l'incubation si toutes les cupules sont négatives	
Couleur attendue après l'incubation si toutes les cupules sont positives	
Couleur attendue après l'incubation des réactifs Zym B et James. Les cupules 8-10 sont positives pour la seconde réaction	

2. L'identification des espèces est obtenue à l'aide d'un profil numérique.
 - a. Pour identifier le profil numérique, on attribue à chaque test / cupule une valeur de 1, 2 ou 4, les tests étant regroupés en ensembles de trois.
 - b. Au sein de chaque groupe, ajouter les valeurs correspondant aux réactions positives (comme indiqué dans le tableau ci-dessous) pour générer le profil numérique à 4 chiffres.

Enregistrement sur la feuille de résultat	ID de la feuille
	3424

- c. Comparer le profil numérique à la « Table d'identification » en annexe de la notice de l'API NH.
 - i. *Remarque* : L'identification de l'espèce et le pourcentage peuvent être obtenus à partir du logiciel d'identification en ligne API NH. (<https://apiweb.biomerieux.com/?action=prepareLogin>)

12.0 Limites du test

1. La lecture de réactions enzymatiques au-delà de la limite de temps autorisée peut affecter l'interprétation des résultats.
 - a. Si, après une période d'incubation de 2 heures, plusieurs réactions (fermentation, pénicillinase) sont douteuses, incuber de nouveau la bandelette pendant 2 heures supplémentaires et relire les réactions.
 - b. Important : Les tests enzymatiques ne doivent pas être relus après l'incubation supplémentaire.
2. Des faux résultats négatifs peuvent être observés si la suspension bactérienne n'a pas une densité suffisante.
3. Des résultats faussement négatifs ou positifs peuvent être observés en cas de distribution imprécise de la suspension bactérienne.
4. Du fabricant :
 - a. Le système API NH vise uniquement l'identification des espèces figurant dans le tableau d'identification, c'est-à-dire celles appartenant aux genres *Neisseria* et *Haemophilus* (et genres apparentés), ainsi qu'à l'espèce *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*).
 - b. API NH ne doit pas être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ni pour exclure leur présence.
 - c. Certaines espèces des genres *Moraxella*, *Oligella*, etc. peuvent être incorrectement identifiées comme *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae* car leurs profils biochimiques sur la bandelette NH sont très similaires.
 - d. L'identification de *Neisseria meningitidis* peut être confirmée par des méthodes supplémentaires telles que la PCR.
 - e. Seules les cultures pures d'un seul organisme devraient être utilisées dans cet essai. Des cultures mixtes pourraient conduire à des interprétations inexactes.

13.0 Références

1. Biomerieux. API® NH. Available at: http://www.cantonhealth.org/pdf/400-001-06-13-A_API%20NH%20System%20BioMerieux%20Product%20Insert.pdf. Accessed October 30, 2019.

Notes

Ce projet a été financé à 100% par des fonds fédéraux provenant d'un programme fédéral de 2 444 133 \$. Cette publication a été soutenue par l'accord de coopération n ° 5 NU600E000103, financé par les Centers for Disease Control and Prévention des États-Unis (CDC). Son contenu est de la seule responsabilité des auteurs et ne représente pas nécessairement les vues officielles des CDC ou du Ministère de la santé et des services sociaux.