

**ATB® STAPH**

IVD

Antibiogramme pour les staphylocoques

**INTRODUCTION ET OBJET DU TEST**

La galerie ATB STAPH permet de déterminer la sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques en milieu semi-solide dans des conditions très proches des techniques de référence de dilution en gélose ou de micro-dilution (selon les recommandations du CASFM ou NCCLS).

**PRINCIPE**

La galerie ATB STAPH comporte 16 paires de cupules. La première paire, sans antibiotique, sert de témoin de croissance. Les 14 suivantes contiennent des antibiotiques à une seule ou deux concentrations (c et C). La dernière paire n'est pas utilisée.

La bactérie à tester est mise en suspension puis transférée dans le milieu de culture et inoculée dans la galerie. Après incubation, la lecture de la croissance se fait soit visuellement, soit avec l'automate ATB ou *mini API*®. Le résultat obtenu permet de catégoriser la souche Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

**PRESENTATION (Coffret pour 25 antibiogrammes) :**

- 25 galeries ATB STAPH en emballage individuel avec déshydratant
- 25 couvercles d'incubation
- 25 ampoules d'ATB Na Medium 2 %
- 1 notice

**COMPOSITION****Galeries**

La composition de la galerie ATB STAPH est mentionnée dans le tableau « Contrôle de Qualité » de cette notice.

**NOTE :** Les cupules TSU contiennent de la Thymidine Phosphorylase d'origine animale.

**Milieux**

<b>ATB Na Medium 2 %</b>	Mueller Hinton (origine animale) 1000 ml
	Glucose 2 g
	NaCl 20 g
	Ca <sup>++</sup> qsp 50 mg
	Mg <sup>++</sup> qsp 20 mg
	Agar 1,5 g
	pH : 7,2 - 7,4

**REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS****Réactifs et instruments**

- API® Suspension Medium (Réf. 70 700 ou 70 640 ou 20 150)
- ATB Medium (Réf. 14 960 ou 14 920)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) ou DENSIMAT (Réf. 99 234) ou Densitomètre ATB
- Pipette Electronique ATB (consulter bioMérieux) ou Inoculateur ATB et Embouts (Réf. 15 710)
- Automate ATB ou *mini API*® avec logiciel (consulter bioMérieux)

**Matériel**

- Pipette
- Protège-ampoules
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

**REACTIFS COMPLEMENTAIRES**

- Céfinase (Réf. 55 622)

**PRECAUTIONS D'UTILISATION**

- **Pour diagnostic *in vitro* uniquement.**
- **Pour usage professionnel uniquement.**
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - December 1997". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)," ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Avant utilisation, laisser les milieux revenir à température ambiante.
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
  - Placer l'ampoule dans le protège-ampoules.
  - Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
  - Bien enfoncer le bouchon.
  - Recouvrir la partie inclinée du bouchon avec la première phalange du pouce.
  - Exercer une pression avec le pouce à la base de la partie inclinée du bouchon avec un mouvement vers l'extérieur de façon à casser l'extrémité de l'ampoule à l'intérieur du bouchon.
  - Retirer l'ampoule du protège-ampoules et conserver le protège-ampoules pour une utilisation ultérieure.
  - Enlever délicatement le bouchon.
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation et la validation des résultats de l'antibiogramme doivent être faites en tenant compte du contexte clinique, de l'origine du prélèvement, de l'identification de la souche, éventuellement des résultats de tests complémentaires et des recommandations locales en vigueur. L'interprétation et la validation sont facilitées par le système Expert ATB.

**CONDITIONS DE STOCKAGE**

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C à l'obscurité jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur le coffret.

**ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)**

La galerie ATB STAPH ne doit pas être utilisée directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres.

Les microorganismes à tester doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

**MODE OPERATOIRE****Préparation de la galerie**

- Sortir la galerie de son emballage.
- Noter l'identifiant de la bactérie à tester sur la languette latérale de la galerie.

**Préparation de l'inoculum**

- Préparer une suspension bactérienne d'opacité équivalente à l'étalon 2 de McFarland. Comparer au témoin d'opacité du kit McFarland Standard ou utiliser le Densitomètre ATB ou le DENSIMAT (se reporter au manuel d'utilisation).

Deux méthodes :

- culture en bouillon jusqu'à obtention de l'opacité indiquée ;
- mise en suspension de 1 ou plusieurs colonies (utiliser préférentiellement des souches fraîchement cultivées) dans une ampoule d'API® Suspension Medium (ouvrir l'ampoule comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit).

Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**NOTE :** il est recommandé de contrôler la pureté de l'inoculum et de réisoler dans le cas de cultures mixtes.

- Transférer 200 µl de cette suspension dans ATB Medium et 200 µl dans ATB Na Medium 2 % (pour le test OXA), à l'aide d'une pipette.

**Inoculation de la galerie**

- Inoculation MANUELLE :
  - Homogénéiser ATB Medium avec la Pipette Electronique ATB en évitant la formation de bulles. Inoculer la galerie en distribuant 135 µl d'ATB Medium par cupule avec la Pipette Electronique ATB (environ 2x10<sup>7</sup> germes/ml ou 3x10<sup>6</sup> germes /cupule) dans chaque cupule de la galerie exceptée OXA.
  - Homogénéiser ATB Na Medium 2 % avec la Pipette Electronique ATB en évitant la formation de bulles et répartir 135 µl (environ 2x10<sup>7</sup> germes/ml ou 3x10<sup>6</sup> germes/cupule) avec la Pipette Electronique ATB dans la cupule OXA.
- Inoculation AUTOMATIQUE :
 

Se reporter au manuel d'utilisation de l'inoculateur ATB.
- Mettre un couvercle sur la galerie.
- Incuber 18-24 heures à 36 ± 2°C en aérobiose. Une incubation proche de 24 heures est toutefois recommandée pour les staphylocoques à coagulase négative.

**LECTURE ET INTERPRETATION**

Rechercher dans chaque cupule la présence d'un trouble (+) par lecture visuelle ou automatique par l'automate ATB ou *mini API*® (se reporter aux manuels d'utilisation).

Pour les antibiotiques testés à deux concentrations :

Aspect des cupules		Résultats		La souche est :	
c	C	c	C		
clair	clair	-	-	S	SENSIBLE
trouble	clair	+	-	I	INTERMEDIAIRE
trouble	trouble	+	+	R	RESISTANTE

Pour les antibiotiques testés à une seule concentration :

Aspect de la cupule	Résultat	La souche est :	
clair	-	S	SENSIBLE
trouble	+	R	RESISTANTE

**NOTES :**

- Avant d'effectuer la lecture automatique, il est conseillé d'essuyer les éventuelles gouttelettes sur la partie centrale de la galerie afin de permettre la reconnaissance du code de la galerie par le lecteur.
- L'absence de croissance dans une (ou deux) cupule(s)-témoin invalide l'antibiogramme qui doit être recommencé.
- Un résultat c(-)C(+) est un non-sens (N) : répéter le test avec une nouvelle galerie.
- En lecture visuelle, une croissance limitée à la périphérie de la cupule doit être lue négative.
- Une galerie dont les cupules sont partiellement desséchées suite à l'incubation peut induire de faux résultats. L'antibiogramme doit être recommencé.
- Triméthoprime – Sulfaméthoxazole (TSU) : Considérer comme négatif toute croissance inférieure au témoin de croissance.
- Certaines souches de staphylocoques présentant une sensibilité diminuée à la Pénicilline ou à l'Oxacilline (phénotype "borderline" chez *S. aureus*) peuvent apparaître résistantes avec la galerie ATB STAPH.
- Du fait de l'hétérogénéité fréquente de l'expression de la résistance des staphylocoques à coagulase négative vis à vis de l'Oxacilline, il est conseillé de vérifier visuellement l'absence de toute colonie bactérienne dans la cupule OXA pour les souches potentiellement résistantes signalées par le système Expert ATB ou multirésistantes. En cas de croissance, considérer la souche comme résistante.
- Du fait de l'emploi d'un inoculum élevé permettant de mieux détecter les résistances hétérogènes des staphylocoques, dont celles affectant les glycopeptides (*S. aureus* principalement), certaines souches de *S. epidermidis* peuvent apparaître résistantes (ou non-Sensibles) vis-à-vis de la Teicoplanine avec la galerie ATB STAPH, en utilisant la concentration critique inférieure recommandée par le CA-SFM (4 mg/l). En conséquence, en cas de résultat R, il convient de confirmer ce résultat à l'aide d'une technique de détermination de CMI.

**CONTROLE DE QUALITE**

Pour vérifier la standardisation de la méthode suivie, des contrôles de qualité avec la souche test indiquée pour cette galerie doivent être réalisés (voir tableau Contrôle de Qualité en fin de notice).

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

## LIMITES DU TEST

- Un temps d'attente entre les diverses étapes de la manipulation (de la préparation de l'inoculum à l'incubation de la galerie) peut affecter les résultats.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées. Des cultures mixtes ou contaminées peuvent affecter les résultats.

## RESULTATS ATTENDUS

Les profils de résistance des tests antibiotiques variant en fonction de la zone géographique, les résultats attendus sont donc directement dépendants de l'écologie microbienne locale (espèces / mécanismes de résistance).

## PERFORMANCES

Les performances de la galerie ATB STAPH ont été déterminées en utilisant deux souchiers comprenant les espèces bactériennes suivantes :

- *S. aureus*
- *S. epidermidis*
- *S. haemolyticus*
- *S. hominis*
- *S. intermedius*
- *S. saprophyticus*
- *S. simulans*
- *S. xylosus*

Le premier soucier a permis d'établir le taux de concordance des catégorisations pour chaque antibiotique. Les catégorisations de référence ont été déterminées à partir des résultats de CMI obtenues avec la méthode de dilution en gélose, et comparées à celles établies par la galerie ATB STAPH. Il y a concordance lorsque les catégorisations cliniques des deux méthodes sont identiques.

Le second soucier provenant du Centre National de Référence des Antibiotiques (Institut Pasteur, Paris France) a permis de vérifier l'expression des mécanismes de résistance. Un mécanisme de résistance est exprimé lorsque les résultats de catégorisation des antibiotiques marqueurs sont compatibles avec le profil attendu.

Enfin, un résultat est dit reproductible si les 3 résultats de catégorisation déterminés de manière indépendante sont identiques.

## Taux de concordance

Le taux de concordance de la galerie ATB STAPH obtenu à partir de 79 souches est de 93,8 %.

Les taux d'erreurs majeures et d'erreurs très majeures obtenus avec la galerie ATB STAPH sont respectivement de 5,8 % et 0,4 % (voir Notes du paragraphe Lecture et Interprétation).

La plupart des erreurs majeures observées est, en fait, associée à une meilleure expression des mécanismes de résistance avec la galerie ATB STAPH par rapport à la méthode de dilution en gélose.

## Expression des mécanismes de résistance

Indépendamment du système expert, l'étude, portant sur 30 souches, a permis de vérifier que les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques rencontrés chez les staphylocoques s'expriment avec la galerie ATB STAPH.

## Reproductibilité

Le taux de reproductibilité global de la galerie ATB STAPH est de 92 % (établi avec un minimum de 10 souches par antibiotique).

## ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLE DES SYMBOLES	p. I
BIBLIOGRAPHIE	p. I
CONTROLE DE QUALITE	p. II
FICHE DE RESULTATS	p. IV



**bioMérieux® sa**  
 au capital de 11 879 045 €  
 673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Etoile / France  
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
<http://www.biomerieux.com>

