

## Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments

RÉFÉRENCE : ANSES/LMV/18/01- Version 01

Février 2018

# Isolement d'*Escherichia coli* producteurs de BLSE, AmpC ou carbapénémase dans les viandes fraîches.

**Laboratoire de Fougères**

**Laboratoire national de référence de la résistance antimicrobienne**



## Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est qualifiée de majeure* lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

*Une modification est qualifiée de mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V1	Mineures	09/02/2018	<ul style="list-style-type: none"><li>- Annule et remplace le protocole ANSES/LSAL/MATBR/15-01 Version 02.</li><li>- Modifications de forme, précisions sur la collecte des échantillons, leur conservation avant analyse et leur date d'analyse.</li></ul> Les points de vigilance sont surlignés en jaune dans le texte.



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) pour la résistance aux antimicrobiens (RA) situé au National Food Institute, DTU, au Danemark.

Le Laboratoire National de Référence (LNR) Résistance Antimicrobienne (RA) de l'Anses est chargé de le mettre en application.

Adresse : Bâtiment Bioagropolis, 10B rue Claude Bourgelat, CS 40608 – Javené – 35306 FOUGERES cedex

Contact : Agnès PERRIN, [agnes.perrin-guyomard@anses.fr](mailto:agnes.perrin-guyomard@anses.fr)



## Sommaire

<b>Avant-propos .....</b>	<b>3</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>5</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Objet et domaine d'application .....</b>	<b>7</b>
<b>2 Documents de référence .....</b>	<b>7</b>
<b>3 Termes, sigles et définitions .....</b>	<b>8</b>
<b>4 Principe de la méthode.....</b>	<b>8</b>
<b>5 Réactifs.....</b>	<b>8</b>
5.1 Eau.....	8
5.2 Consommables.....	9
5.3 Souches de contrôles .....	10
<b>6 Appareillage et matériels.....</b>	<b>11</b>
<b>7 Échantillons .....</b>	<b>12</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons.....	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	12
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse .....	13
<b>8 Mode opératoire.....</b>	<b>14</b>
8.1 Préparation des échantillons pour analyse.....	14
8.2 Isolement sélectif, purification, identification et conservation (annexe 2).....	15
<b>9 Résultats .....</b>	<b>18</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	18
9.2 Calculs et expression des résultats.....	18
<b>10 Caractéristiques de performance de la méthode.....</b>	<b>20</b>
<b>Annexe 1 : Diagramme du mode opératoire .....</b>	<b>21</b>
<b>Annexe 2 : Compositions des milieux.....</b>	<b>22</b>
<b>Annexe 3 : Caractéristiques des souches contrôle.....</b>	<b>24</b>



## Introduction

Cette méthode a été développée et validée par le LRUE-RA (DTU, Danemark), assisté du Federal Institute for Risk Assessment (BfR) en Allemagne (1, 2, 3). Elle a été transposée en France en 2015 par le LNR-RA. Elle est applicable dans le cadre des plans de surveillance de la résistance aux antibiotiques de certaines bactéries sentinelles et zoonotiques mis en place chaque année par la Direction Générale de l'Alimentation pour répondre à la décision européenne 2013/652/UE (4).



## **Avertissements et précautions de sécurité**

**Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.**

**Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.**



## 1 Objet et domaine d'application

La nouvelle législation concernant la surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries zoonotiques et commensales (décision 2013/652/UE) (4) impose depuis 2015 la recherche sélective dans les viandes prélevées à la distribution des *E. coli* producteurs de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) et de céphalosporinase (AmpC). Sur la base du volontariat, les états membres peuvent également rechercher les *E. coli* producteurs de carbapénémase (CPE). Le laboratoire de référence de l'Union Européenne a développé et validé une méthode [1] qui détaille, étape par étape, la procédure pour l'isolement de ces *E. coli*.

Le protocole ci-dessous, décrit la méthodologie pour la **recherche sélective des *E. coli* BLSE, AmpC et CPE dans les viandes fraîches** prélevées à la distribution dans le cadre de la décision 2013/652/UE(4).

## 2 Documents de référence

- [1] Laboratory Protocol DTU Food/EURL Antimicrobial Resistance – Isolation of ESBL, AmpC and carbapenemase producing *E. coli* from fresh meat. <https://www.eurl-ar.eu/protocols.aspx>.
- [2] Laboratory Protocol DTU Food/EURL Antimicrobial Resistance – Validation of selective MacConkey agar plates supplemented with 1 mg/L cefotaxime for monitoring of ESBL and AmpC producing *E. coli* in meat and animals. <https://www.eurl-ar.eu/protocols.aspx>.
- [3] Laboratory Protocol DTU Food/EURL Antimicrobial Resistance – Validation of selective and indicative agar plates for monitoring of carbapenemase-producing *E. coli*. <https://www.eurl-ar.eu/protocols.aspx>.
- [4] Décision d'exécution de la commission du 12 novembre 2013 concernant la surveillance et la présentation de rapports relatifs à la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries zoonotiques et commensale (2013/652/EU) – L 303/26-L303/39.  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013D0652&qid=1434702813594&from=FRLaboratory>



### 3 Termes, sigles et définitions

- **BLSE** : Béta-Lactamase à Spectre Etendu.
- **AmpC** : Céphalosporinase.
- **CPE** : carbapénèmase.
- **CTX** : céfotaxime.
- **DLC** : Date Limite de Consommation.
- **LNR-RA** : Laboratoire National de Référence Résistance Antimicrobienne (Anses).
- **LRUE-RA** : Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour la Résistance aux Antimicrobiens (DTU, Lyngby, Danemark, <https://www.eurl-ar.eu/>).

### 4 Principe de la méthode

Cette méthode a pour principe l'utilisation de milieux chromogéniques avec antibiotiques permettant le dépistage et l'isolement sélectif des entérobactéries BLSE, AmpC ou CPE.

Cette méthode comporte 5 étapes :

- Pré-enrichissement non sélectif
- Isolement sélectif
- Purification
- Identification
- Conservation.

### 5 Réactifs

**Avertissement** : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces produits ont fait l'objet d'une validation par le LRUE RA. Toutefois des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

#### 5.1 Eau

Sans objet





## 5.2 Consommables

- Gélose Mac Conkey + 1 mg/L céfotaxime (CTX) pour le dépistage des *E. coli* BLSE/AmpC (**MCA CEFOTAXIM**, Tritium, Pays-Bas ou tout autre milieu validé pour l'objet de la méthode)
- Gélose Mac Conkey
- Gélose chromogénique pour le dépistage des *E. coli* CPE OXA-48 (**chromID OXA**, Biomérieux, France ou tout autre milieu validé pour l'objet de la méthode)
- Gélose chromogénique pour le dépistage des *E. coli* CPE (**chromID CARBA**, Biomérieux, France ou tout autre milieu validé pour l'objet de la méthode)
- Gélose au sang frais
- Eau peptonée tamponnée (EPT) (voir composition en annexe 2)
- Solution saline à 0,9 %
- Contenant stérile
- Pipettes graduées
- Pointes stériles
- Oeses de 10 µl et de 1 µl
- Gélose de conservation
- MacFarland 0,5
- Solution cryoprotectrice type glycérol

Suivre les indications des fournisseurs pour les conditions de stockage et limite d'utilisation.

La composition de certains milieux est donnée en annexe 2.



### 5.3 Souches de contrôles

- *E. coli* BLSE/AmpC- (CMI 0.5 µg/ml), contrôle négatif pour MCA CEFOTAXIM
- *E. coli* BLSE/AmpC+ (CMI 2 µg/ml), contrôle positif pour MCA CEFOTAXIM
- *E. coli* TZ 3638, contrôle positif pour chromID CARBA
- *E. coli* 16874, contrôle positif pour chromID OXA
- *E. coli* ATCC 25922, contrôle négatif pour chromID OXA et chromID CARBA

Les souches contrôles BLSE/ApmC+ et -, CARBA+ et OXA+ sont fournies par le LNR-RA.

Les souches contrôles sont à manipuler avec les précautions usuelles de laboratoire.

Toutes les souches sont à conserver en milieu adéquat à une température < -60 °C.

Un tableau résumant leur utilisation est donné en annexe 3.



## 6 Appareillage et matériels

**Avertissement** : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- Balance.
- Pipettes
- Poste de sécurité microbiologique (PSM)
- Néphélomètre.
- Etuve à 35°C +/- 2°C.
- Etuve à 37°C +/- 1°C.
- Etuve à 44°C +/- 0.5°C.
- Réfrigérateur entre +2°C et 8°C.
- Congélateur pour des températures <-60°C



## 7 Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les prélèvements doivent être effectués de façon randomisée sur les 5 jours ouvrés de la semaine.

Les échantillons doivent arriver au laboratoire dans les 36 heures après l'échantillonnage, entre + 2 °C et + 8 °C.

- Les échantillons arrivés après la DLC sont éliminés ;
- Les échantillons congelés ou arrivant à une température supérieure à + 8 °C et/ou hors délai sont éliminés ;
- Les échantillons dont les conditions d'acheminement ne garantissent pas une conservation entre + 2 °C et + 8 °C sont éliminés ;
- Les échantillons dont le conditionnement primaire est endommagé sont éliminés.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les échantillons sont conservés entre + 2 °C et + 8 °C jusqu'à l'analyse bactériologique. Cette analyse doit être effectuée aussi rapidement que possible et préférentiellement dans les 24 heures après réception.

D'une façon générale, l'analyse doit débuter dans les 48 heures après la collecte de l'échantillon.

Les échantillons collectés les jeudi et vendredi font exception à cette règle : ces échantillons peuvent être analysés le lundi suivant sans dépasser les 96 heures après le prélèvement. Le maintien de l'échantillon entre + 2 °C et + 8 °C devra avoir été assuré pendant toutes les étapes, du prélèvement jusqu'à l'analyse.

Il est impératif que les échantillons soient maintenus au froid, du prélèvement jusqu'à l'analyse, pour garantir la qualité des résultats. Les échantillons sont des viandes fraîches (n'ayant subi aucun traitement de transformation). ISO/DIS 7218 - Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations.

Règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux.

La température de l'échantillon à réception peut être évaluée par :

- le relevé de température fourni par le transporteur si présence d'une sonde d'enregistrement ;
- la température à l'arrivée de l'échantillon ou de l'eau acheminée avec l'échantillon (flacon indépendant d'eau pour la prise de température à réception).

Le protocole a été validé pour un stockage des échantillons au laboratoire jusqu'à 24H.



L'analyse bactériologique doit toujours être mise en œuvre avant la DLC de la viande. Les échantillons ne présentant pas de DLC doivent être analysés le jour du prélèvement.

### **7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse**

Voir mode opératoire



## 8 Mode opératoire

Les cultures bactériennes et produitsensemencés 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. L'**annexe 1** propose un diagramme du mode opératoire simplifié.

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

**Jour - 1** (à effectuer systématiquement à chaque nouvelle analyse ou série d'analyses) :

- Repiquer sur gélose au sang frais, les 5 souches contrôles conservées à une température  $< -60^{\circ}\text{C}$  en glycérol, pour obtenir des colonies isolées.
- Incuber 18 à 24 heures à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Jour 0** (pré-enrichissement) :

*Traitement des échantillons*

- Prendre des prises d'essai homogènes en surface, en périphérie et au cœur de la viande à analyser pour atteindre 25 g  $\pm$  0.5 g. Ajouter 225 ml d'eau peptonée tamponnée dans un contenant stérile (sac Stomacher stérile par exemple).
- Incuber à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 18 à 22 heures.

*Traitement des souches contrôles*

- Suspendre quelques colonies des souches contrôles dans une solution saline à 0.9 % et ajuster la solution au standard McFarland 0.5.
- Diluer au  $1000^{\text{ème}}$  chaque solution contrôle dans de l'eau peptonée tamponnée.
- Incuber 18 à 22 heures à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Diluer au  $1000^{\text{ème}}$  chaque solution contrôle dans de l'eau peptonée tamponnée.
- Incuber 18 à 22 heures à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Les différentes souches contrôles permettent de garantir l'activité des antibiotiques dans les différentes géloses sélectives (cf. **annexe 3**).

La souche BLSE/AmpC- peut donner deux types de colonies, blanches et grises, qui peuvent être utilisées, l'une ou l'autre, dans la suite du protocole.

Dans le cas de viande de poulet comprenant de la peau, la peau et le muscle doivent faire partie de la prise d'essai. L'utilisation d'un stomacher peut être envisagé et recommandé dans le cas d'une prise d'essai trop "dure".

Les contenants ne doivent pas être remplis complètement en cas de développement gazeux.

Il est recommandé d'éviter l'agitation des échantillons pour éviter les débordements.

Privilégier 3 dilutions au 1/10 en cascade plutôt qu'une dilution directe au 1/1000.

Méthode alternative : La dilution au  $1000^{\text{ème}}$  peut se faire en mettant une colonie bactérienne dans 9 ml d'EPT.



## 8.2 Isolement sélectif, purification, identification et conservation (annexe 2)

### Jour 1 (isolement sélectif) :

Sur MCA CEFOTAXIM (échantillons + souches contrôles BLSE/AmpC- et BLSE/AmpC+) :

- Mélanger doucement la culture pré-enrichie de la veille. Prélever cette culture avec une oese de 10 µl et étaler sur un seul cadran d'une boîte de MCA CEFOTAXIM. A partir de ce 1<sup>er</sup> étalement, procéder à 2 étalements supplémentaires en reprenant la même oese ou en utilisant une oese de 1 µL afin d'obtenir des colonies isolées.
- Incuber 18 à 22 heures à 44 °C ± 0.5 °C.

Sur chromID OXA (échantillons + souches contrôles *E. coli* 16874 et *E. coli* ATCC 25922) et chromID CARBA (échantillons + souches contrôles *E. coli* TZ 3638 et *E. coli* ATCC 25922) :

- Pour chacune des géloses sélectives, prélever avec une oese de 10 µl, la culture pré-enrichie de la veille et étaler à confluence sur le ¼ de la boîte. Reprendre la fin de l'étalement précédent avec la même oese ou une oese de 1 µl et isoler en stries larges sur ¼ de la boîte pour obtenir des colonies isolées. De cette façon, une boîte de chacune des géloses sélectives peut être utilisée pour deux prélèvements.
- Incuber 18 à 24 heures à 35 °C ± 2 °C (données fournisseurs).

L'incubation à 44°C permettra la croissance de la plupart des *E. coli* tout en diminuant l'influence des flores envahissantes.

Possibilité d'utiliser une ½ boîte par échantillon, dès lors que cela permet d'obtenir des colonies isolées après incubation.

La gélose sélective chromID OXA est utilisée pour détecter les souches productrices de carbapénémase de type OXA-48 qui ne sont pas capables d'hydrolyser le céfotaxime (ou autre céphalosporine).

Possibilité d'ensemencer les souches contrôle en cadrans sur les géloses CARBA et OXA.

Les températures d'incubation des géloses sélectives sont celles données par le fournisseur.



## **Jour 2 (purification) :**

- Vérifier la sélectivité des géloses après incubation.

### **- Purification à partir des MCA CEFOTAXIM :**

- o Prélever jusqu'à 3 colonies rouge-pourpre, bien distinctes et réisoler chacune de ces colonies sur une nouvelle boîte de **MCA CEFOTAXIM** de façon à obtenir des colonies bien isolées (1 boîte pour les 3 colonies).
- o Incuber 18 à 22 heures à 37 °C +/- 1 °C.

### **- Purification à partir des géloses chromID**

Si croissance sur chromID CARBA et / ou OXA :

- o Prélever au moins une colonie bien distincte de couleur rose à bordeaux ou translucide à centre rose à bordeaux, à partir de chacun des milieux sélectifs et réisoler sur gélose **Mac Conkey** sans antibiotique (1 boîte pour les 2 milieux d'origine).
- o Incuber 18 à 22 heures à 37 °C +/- 1 °C.

La souche BLSE/AmpC- ne doit pas avoir poussé sur MCA CEFOTAXIM. La souche BLSE/AmpC + doit avoir poussé sur MCA CEFOTAXIM et donné des colonies isolées. La souche *E. coli* ATCC 25922 ne doit pas avoir poussé sur chromID CARBA et OXA. La souche *E. coli* TZ3638 doit avoir poussée sur chromID CARBA. La souche *E. coli* 16874 doit avoir poussé sur chromID OXA. Voir résumé des résultats attendus en **annexe 3**.

Attention, l'observation d'une croissance sur les géloses sélectives CARBA ne signifie pas que la souche est automatiquement productrice de carbapénémase, seulement que cette souche possède un mécanisme de résistance aux carbapénèmes, qui peut par ailleurs être dû à une AmpC hyperproduite associée à une perte / diminution d'expression des porines. Seuls des tests complémentaires, ne rentrant pas dans ce protocole, peuvent expliciter le mécanisme.



**Jour 3 (identification-conservation) :**

- Vérifier l'identité des colonies purifiées en J2 sur chacun des milieux sélectifs MCA CEFOTAXIM et Mac Conkey. Dans le cas où la 1<sup>ère</sup> colonie testée n'est pas identifiée comme une *E. coli* sur MCA CTX, procéder à l'identification de la 2<sup>ème</sup> colonie, puis de la 3<sup>ème</sup> colonie si la 2<sup>ème</sup> ne répond toujours pas au critère.

L'identification bactérienne doit être confirmée par une méthode appropriée assurant la qualité du résultat attendu (caractères biochimiques, moléculaires, spectrométrie de masse).

Dans le cas où aucune des colonies n'appartient à l'espèce *E. coli*, le prélèvement est considéré comme négatif pour la présence d'*E. coli* productrice de BLSE/AmpC/CPE.

- Avant envoi au LNR, confirmer la pureté et la croissance en présence d'antibiotique de l'isolat d'*E. coli* qui sera transféré :

- o Repiquer à nouveau sur le milieu d'isolement d'origine (J1).
- o Conserver en double la colonie ainsi repiquée, par piqûre en gélose de conservation, en indiquant au minimum le numéro d'isolement de la colonie (de 1 à 3), le numéro du prélèvement d'origine, le code de la gélose de sélection (CTX, OXA ou CARBA) et la date d'isolement de la souche.

Transférer les souches *E. coli* présumées BLSE/AmpC/CPE au LNR RA (cf. instruction technique concernée pour les coordonnées) pour la suite des analyses (sensibilité aux antibiotiques par la mesure de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide et vérification du mécanisme de résistance).

Privilégier le repiquage des 3 colonies distinctes pour identification dès le départ.

Conserver hermétiquement ces boîtes d'isolement primaire issues de J2, à température ambiante ou entre + 2 et + 8 °C, jusqu'à conservation définitive de l'ensemble des souches de l'échantillon.

Conserver hermétiquement les boîtes de ré-isolement obtenues à J3, à température ambiante ou entre + 2 et + 8 °C, jusqu'à conservation définitive de l'ensemble des souches de l'échantillon.

Il est possible d'y ajouter une conservation en cryobilles ou bouillon glycérolé à une température < - 60 °C.

Code pour les géloses de sélection : B pour MCA CTX, C pour ChromID CARBA, O pour ChromID OXA.

Conserver les doubles des souches jusqu'au 31 juillet de l'année n+1 du plan concerné.



## 9 Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

Se référer aux résultats attendus avec les souches contrôles (cf. annexe 3).

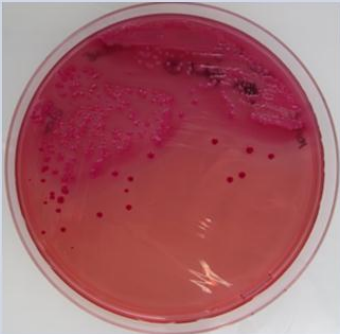
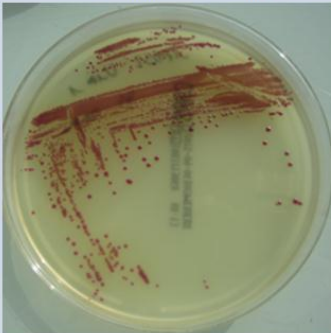
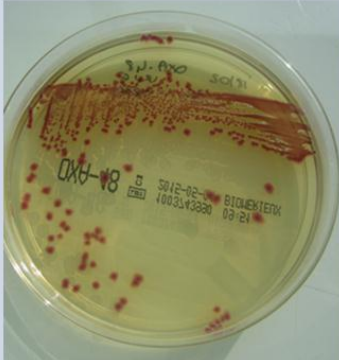
### 9.2 Calculs et expression des résultats

Le résultat doit faire apparaître les éléments suivants :

- Isolement d'*E. coli* BLSE/AmpC dans la prise d'essai : présence (positif) ou absence (négatif).
- Isolement d'*E. coli* CPE OXA-48 dans la prise d'essai : présence (positif) ou absence (négatif).
- Isolement d'*E. coli* CPE dans la prise d'essai : présence (positif) ou absence (négatif)
- Méthode d'identification de ou des souche(s) isolée(s).



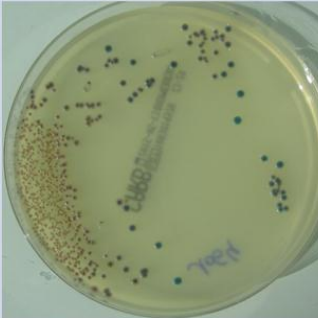
Exemples résultats

Milieu	Mac Conkey + Céfotaxime	ChromID CARBA	ChromID OXA-48
Colonies caractéristiques	<p>Colonies roses à rouges avec ou sans précipité</p> 	<p>Colonies roses à bordeaux ou translucides à centres roses à bordeaux – bords réguliers</p>  <p>Les colonies suspectes roses à bordeaux (voire marrons), à bords translucides doivent être systématiquement repiquées.</p>	<p>Colonies roses à bordeaux ou translucides à centres roses à bordeaux – bords irréguliers</p> 

BLSE/AmpC

Carbapénèmase

Carbapénèmase Oxa-48

Milieu	Mac Conkey + Céfotaxime	ChromID CARBA	ChromID OXA-48
Colonies non caractéristiques	<p>Colonies translucides, avec ou sans virage au jaune de la gélose</p>	<p>Colonies bleues turquoise, ou ayant un pigment vert. après mise en froid, certaines colonies roses à bordeaux à bords translucides, peuvent devenir bleues-vertes à centres roses à bordeaux</p> 	<p>Colonies translucides</p>



## 10 Caractéristiques de performance de la méthode

Les caractéristiques des performances de la méthode ont été établies par le LRUE-RA.

La documentation est consultable sur le site internet du LRUE-AR :

<https://www.eurl-ar.eu/protocols.aspx>

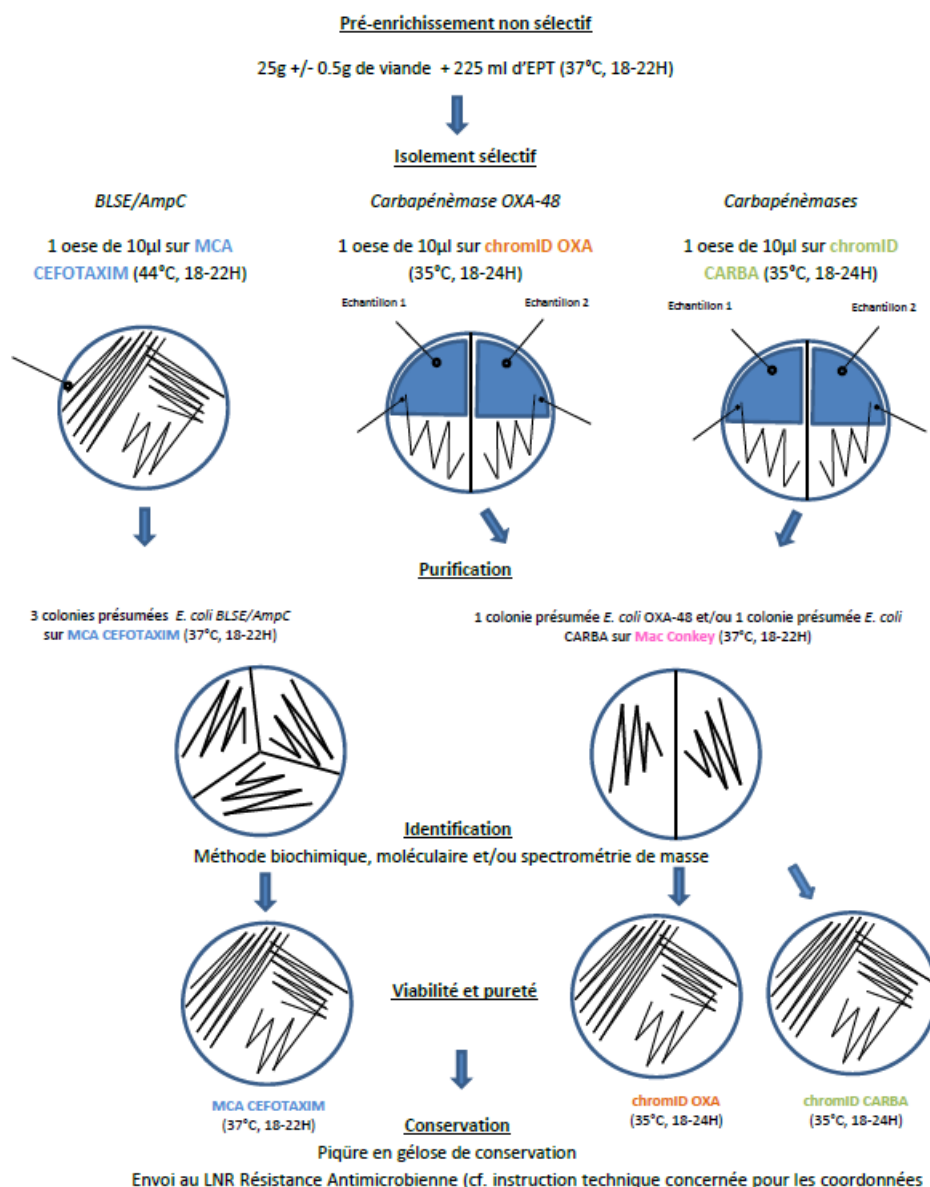
Elles sont résumées sous forme de diapositives ou de posters disponibles sur demande.



## Annexe 1 : Diagramme du mode opératoire

### Diagramme du mode opératoire

Détection des *E. coli* BLSE/AmpC/carbapénèmases à partir des viandes fraîches prélevées à la distribution





## Annexe 2 : Compositions des milieux

La fiche de composition des milieux de culture est disponible auprès des fournisseurs.

La composition et la fabrication à partir de milieux déshydratés indiquée ci-dessous est un exemple.

Se conformer aux instructions des fournisseurs pour la fabrication de ces milieux.

### Eau Peptonée Tamponnée

Composition	g/litre
Extrait enzymatique de caséine	10.0
Chlorure de sodium	5.0
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9.0
Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.5
pH 7.0 +/- 0.2 à 25°C	

Dissoudre tous les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH pour obtenir après stérilisation 7.0 +/- 0.2 à 25°C. Distribuer en flacons. Stériliser à l'autoclave, 15 minutes à 121°C.

### Gélose Mac Conkey

Composition	g/litre
Extrait pancréatique de gélatine	17.0
Peptones (viande et caséine)	3.0
Lactose	10.0
Sels biliaires n°3	1.5
Chlorure de sodium	5.0
Rouge neutre	0.03
Crystal violet	0.001
Agar	13.5
pH 7.1 +/- 0.2 à 25°C	

Suspendre tous les ingrédients dans 1L d'eau distillée (option : ajouter 6.5g d'agar pour augmenter la consistance de la gélose). Porter à ébullition pour dissolution complète. Stériliser à l'autoclave, 15 minutes à 121°C.

### Géloses Sélectives (extrait des fiches milieux du fournisseur)

#### chromID® OXA-48 (OXA)

La gélose chromID® OXA-48 (brevet déposé) est constituée d'une base nutritive riche associant différentes peptones.

Elle contient :

- un mélange d'antibiotiques permettant la croissance sélective des EPC OXA-48.
- trois substrats chromogènes permettant d'identifier les EPC les plus fréquemment isolées :
  - *Escherichia coli* : coloration spontanée (rose à bordeaux) des souches productrices de  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -GUR) et/ou  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL)
  - *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC) : coloration spontanée bleu-vert à bleu-gris des souches exprimant une  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -GLU).



## COMPOSITION

Formule théorique :

Peptone de caseine (bovin) .....	5 g
Peptone de soja .....	5 g
Peptone de viande ( bovine ou porcine).....	8 g
Hydrates de carbone .....	1 g
L-Tryptophane .....	0,9 g
Tampon phosphate .....	1 g
Mélange chromogène .....	1,4 g
Mélange nutritif .....	2,8 g
Mélange sélectif .....	0,88 g
Agar.....	18 g
Eau purifiée.....	1 l
pH 7,4	

### chromID® CARBA (CARB)

La gélose chromID™ CARBA (brevet déposé) est constituée d'une base nutritive riche associant différentes peptones. Elle contient :

- un mélange d'antibiotiques permettant la croissance sélective des EPC.
- trois substrats chromogènes permettant d'identifier les EPC les plus fréquemment isolées :
  - *Escherichia coli* : coloration spontanée (rose à bordeaux) des souches productrices de  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -GUR) et/ou  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL)
  - *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC) : coloration spontanée bleu-vert à bleu-gris des souches exprimant une  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -GLU).

## COMPOSITION

Formule théorique :

Peptone de caseine (bovin) .....	5 g
Peptone de soja.....	5 g
Peptone de viande ( bovine ou porcine) .....	8 g
Hydrates de carbone .....	1 g
L-Tryptophane .....	0,9 g
Tampon phosphate.....	1 g
Mélange chromogène.....	1,4 g
Mélange nutritif .....	2,8 g
Mélange sélectif.....	0,3 g
Agar.....	18 g
Eau purifiée .....	1 l
pH 7,4	



## Annexe 3 : Caractéristiques des souches contrôle

### Caractéristiques des souches contrôle

Caractéristique	Référence	Milieu testé	Résultat attendu après incubation*
BLSE/AmpC -	OXA-30	MCA CEFOTAXIM	-
BLSE/AmpC +	2005-60-10-96-1	MCA CEFOTAXIM	+
Carba GES 5	TZ 3638	chromID CARBA	+
Carba OXA48	16874	chromID OXA 48	+
Contrôle négatif	ATCC 25922	chromID OXA et CARBA	-

\* - : Absence de croissance ; + : Croissance

Absence de croissance des souches contrôle pour lesquelles un résultat + est attendu :

- Contacter le fournisseur de milieu
- Vérifier la fertilité de la souche contrôle sur un milieu non sélectif

Croissance des souches contrôle pour lesquelles un résultat - est attendu :

- Contacter le fournisseur de milieu