

Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé

par Rémi Moreda d'après l'édition février 2016 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Souche pure à étudier
préparation de l'inoculum

Isolement (18-24h sur milieu non sélectif)



Suspension en eau physiologique de trouble équivalent au standard Mc Farland 0,5 ($\approx 10^8$ UFC/mL), idéalement ajusté au spectrophotomètre.



Il est possible de partir d'un bouillon, par exemple pour les bacilles Gram négatif, *Staphylococcus* et *Enterococcus*

:
culture en bouillon Mueller - Hinton incubé 3 à 5 h sous agitation et ajusté ensuite à 0,5 de Mc Farland.



Remarque : cette préparation est directement utilisée comme inoculum pour toutes les souches.

Milieu d'ensemencement

Bacille Gram négatif, *Staphylococcus*, *Enterococcus* : gélose Muller-Hinton ($4\text{mm} \pm 0,5\text{ mm}$). Incubation $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en aérobiose 16 à 24h.

Streptococcus, *Haemophilus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Moraxella*, *Pasteurella* : gélose Mueller-Hinton ($4\text{mm} \pm 0,5\text{ mm}$) + 5% de sang de cheval défibriné + 20 mg/L de NAD. Incubation $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmosphère enrichie en CO_2 16 à 24h.

Campylobacter : gélose Mueller-Hinton ($4\text{mm} \pm 0,5\text{ mm}$) + 5% de sang de cheval défibriné + 20 mg/L de NAD. Incubation $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en micro-aérobiose 16 à 24h.

Helicobacter : gélose Mueller-Hinton ($4\text{mm} \pm 0,5\text{ mm}$) + 10% de sang de cheval. Incubation $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en micro-aérobiose 16 à 24h.

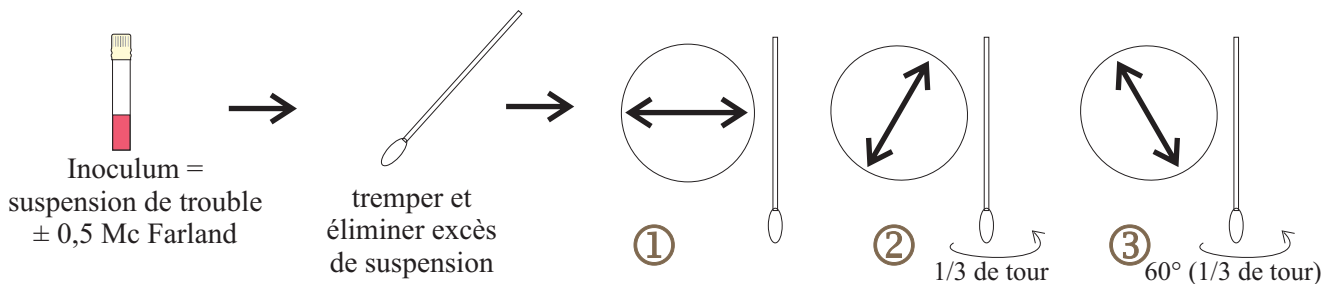
* pour *Staphylococcus aureus* et la recherche de SARM, déposer un disque FOX (céfoxitine) ou réaliser en plus un petit Mueller-Hinton 30°C ou Mueller-Hinton hypérsalé à 37°C , 24 à 48h avec inoculum chargé et disque oxacilline.

Technique par écouvillonnage

Remarque : la technique par inondation est abandonnée.

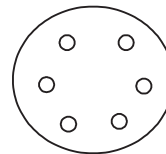
Moins de 15 minutes, max. 60 minutes après la réalisation de l'inoculum, plonger l'écouvillon dans la suspension et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Ensemencer toute la surface du milieu (3 passages à orientation décalée de 60° pour la boîte et l'écouvillon)

Ensemencement



Dépôt

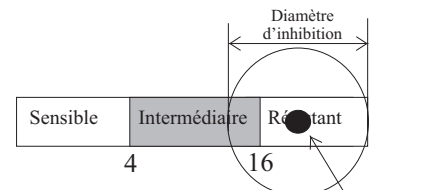
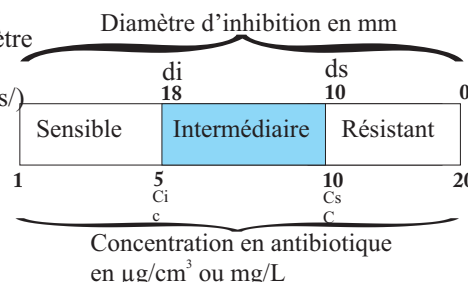
Dépôt des disques d'antibiotique selon schéma de disposition (maximum 6 disques sur boîte de pétri de 9 cm de diamètre)



INCUBATION RAPIDE DANS LES 15 MINUTES qui suivent le dépôt des disque (au delà de 30 minutes les zones d'inhibition seront faussement agrandies). Incubation 16-24 heures à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en aérobiose (sauf cas cités plus haut sous atmosphère enrichie en Co_2 ou micro-aérobiose).

Lecture

Pour chaque antibiotique, mesurer le diamètre de la zone d'inhibition. Grâce aux abaques (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) déterminer la catégorie clinique de la bactérie vis à vis de chaque antibiotique testé (sensible, intermédiaire résistant) et estimer la CMI.



Dans cet exemple la bactérie est intermédiaire vis à vis de l'antibiotique. Estimation de la CMI : $4\text{ mg}/\text{L} < \text{CMI} < 16\text{ mg}/\text{L}$

Abaque de lecture

Ci = c = concentration critique inférieure (breakpoint S) (Cs = C = supérieure ou breakpoint R)

ds = D = diamètre critique supérieur (di = inférieur)