

UNIVERSITE DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Intitulé du Master : **Ecologie Microbienne**

UED2 : **Microbiologie Clinique**

Enseignant responsable de l'UE : **OULMI Lamia**

L'ANTIBIOGRAMME STANDARD

Principe

Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé préalablement ensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester. Après incubation, les boîtes de Petri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (résistant, intermédiaire, sensible). Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée.

Mode opératoire :

a/ Milieu de culture Mueller – Hinton doit être coulé en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4 mm et les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

b/ Les disques d'antibiotiques sont fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure imprégnés d'agents antimicrobiens à des concentrations précises. Ils sont clairement identifiés par un sigle imprimé de chaque côté du disque.

c/ Préparation de l'inoculum :

- À partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm c'est-à-dire à environ 10^8 bactéries par mL.

d/ Ensemencement :

Ensemencer par inondation avec la suspension inoculum et réaspirer l'excédent en respectant les mesures de sécurité nécessaires.

e/ Application des disques d'antibiotiques :

- Appliquer les disques à l'aide d'une pince bactériologique stérile.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces stériles et ne pas déplacer les disques après application.

Prédiffusion pendant 30 minutes à 2 heures à température ambiante.

Il faut respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie.

f/ Lecture et interprétation des résultats

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition (\emptyset mesuré) (voir le cours).
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

Le Etest®

Principe : Le Etest® associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.

Une échelle de lecture, imprimé sur la bandelette, permet une interprétation rapide.

Mode opératoire :

a/ Le milieu de culture : Le milieu Mueller-Hinton doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm. Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

b/ L'inoculum :

- Une culture pure de 18H (colonies bien isolées et parfaitement identiques)
- Suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile d'une opacité de 0,5 Mc Farland (D.O = 0,08 à 0,10 à 628 nm),

c/ L'ensemencement : En surface par écouvillonnage.

d/ Dépôt de la bandelette E-test : Prélever la bandelette à l'aide de pinces bactériologiques préalablement flambées au bec Bunsen ; le contact avec les pinces doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E.

Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé. Eviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette.

Il faut déposer une ou deux bandelettes E-test au maximum par boîte de 90 mm de \emptyset (risque de chevauchement des ellipses avec plus d'une bandelette).

Laisser la boîte couvercle en haut pendant 15 mn au plus.

e/ Lecture et interprétation : La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée. Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test.

- Se référer aux recommandations du fournisseur pour l'interprétation de cas ambigus (double zone) (voir le cours).

- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.

- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.