

**Ministère de la santé - Laboratoire de bactériologie Médicale et de surveillance de la résistance aux antibiotiques - Institut Pasteur d'Algérie.**

# **Technique de l'Antibiogramme\***

**\* Recommandations nationales pour la standardisation de l'antibiogramme selon les dernières normes C.L.S.I.**



1. Culture pure de 18 heures, de la souche à étudier (exemple: une souche d' *E.coli* )


## Etape 1 :



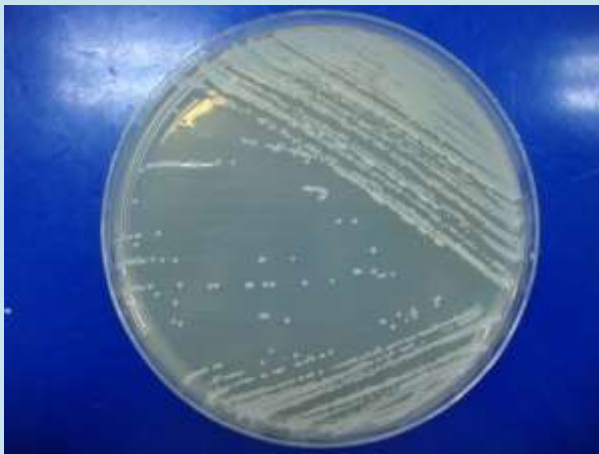
### Préparation de la souche bactérienne et du petit matériel

2. Vérifier que l'épaisseur du MH est bien de 4 mm.

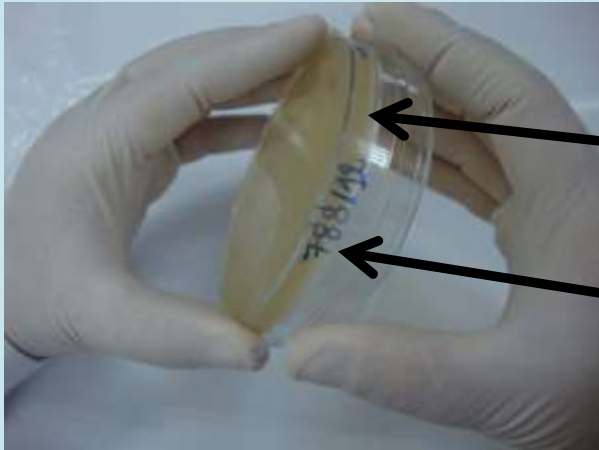
3. Numéroté la boîte de Mueller Hinton sur le côté



4. Anse stérile, écouvillon stérile, eau physiologique stérile et un densitomètre



1. Culture pure de 18 heures, de la souche à étudier (exemple: une souche d' *E.coli* )



2. Vérifier que l'épaisseur du milieu est bien de 4 mm.

3. Numéroté la boîte sur le côté

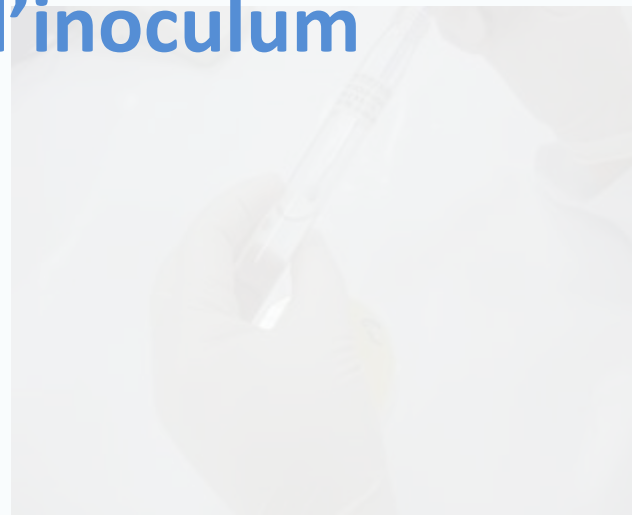
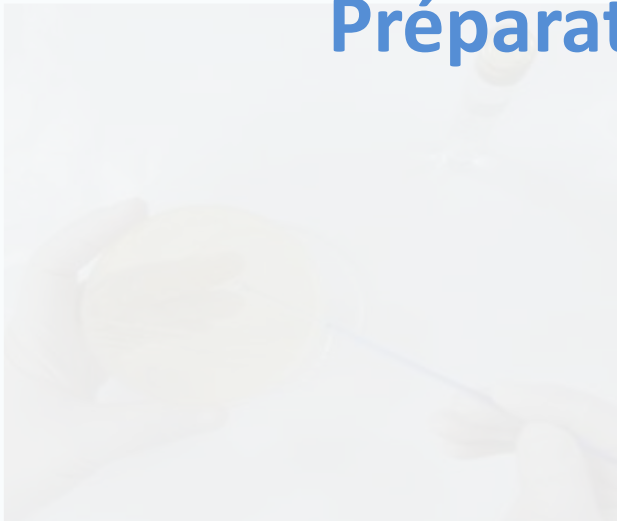


4. Anse stérile, écouvillon stérile, eau physiologique stérile et un densitomètre

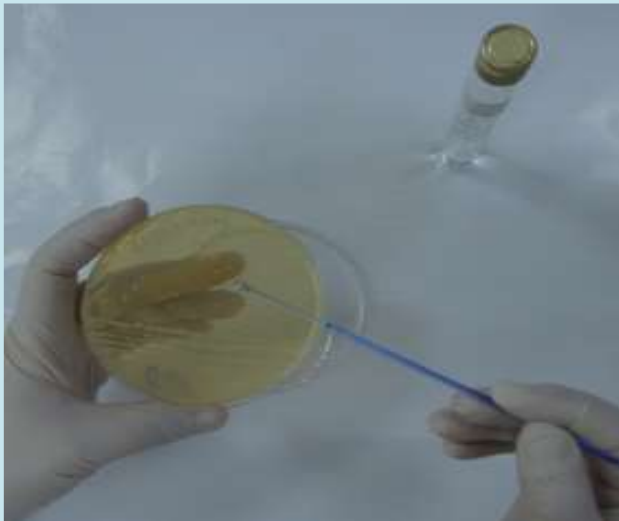
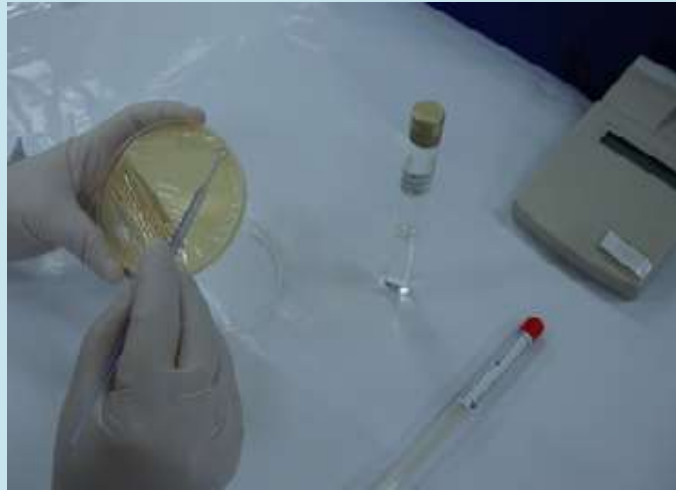


## Etape 2 :

### Préparation de l'inoculum



Prélever une à deux colonies bactériennes à l'aide de l'anse stérile , et réaliser une suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile



Prélever une à deux colonies bactériennes à l'aide de l'anse stérile , et réaliser une suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile



Vérifier que la densité est bien de 0,5 Mc Farland.  
**Ajuster l'inoculum si nécessaire, en rajoutant de la culture bactérienne ou bien de l'eau physiologique stérile**

1.



1. Ouvrir l'écouvillon stérile juste avant son utilisation

### Etape 3 :

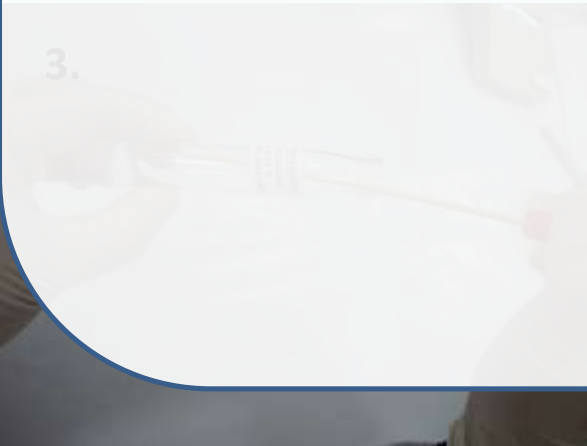
2.



## Ensemencement de la gélose

2. Tremper l'écouvillon dans le tube contenant l'inoculum bactérien à 0,5 McFarland, en l'imbibant de la suspension bactérienne de la souche à étudier,

3.



3. Bien essorer l'écouvillon en le roulant serré contre les parois du tube

1.



1. Ouvrir l'écouvillon **stérile** juste avant son utilisation

2.



2. Tremper l'écouvillon dans le tube contenant l'inoculum bactérien à 0,5 Mc Farland, en l'imbibant de la suspension bactérienne de la souche à étudier,

3.



3. Bien essorer l'écouvillon en le roulant serré contre les parois du tube



# Milieux à ensemer

- Bactéries non exigeantes:

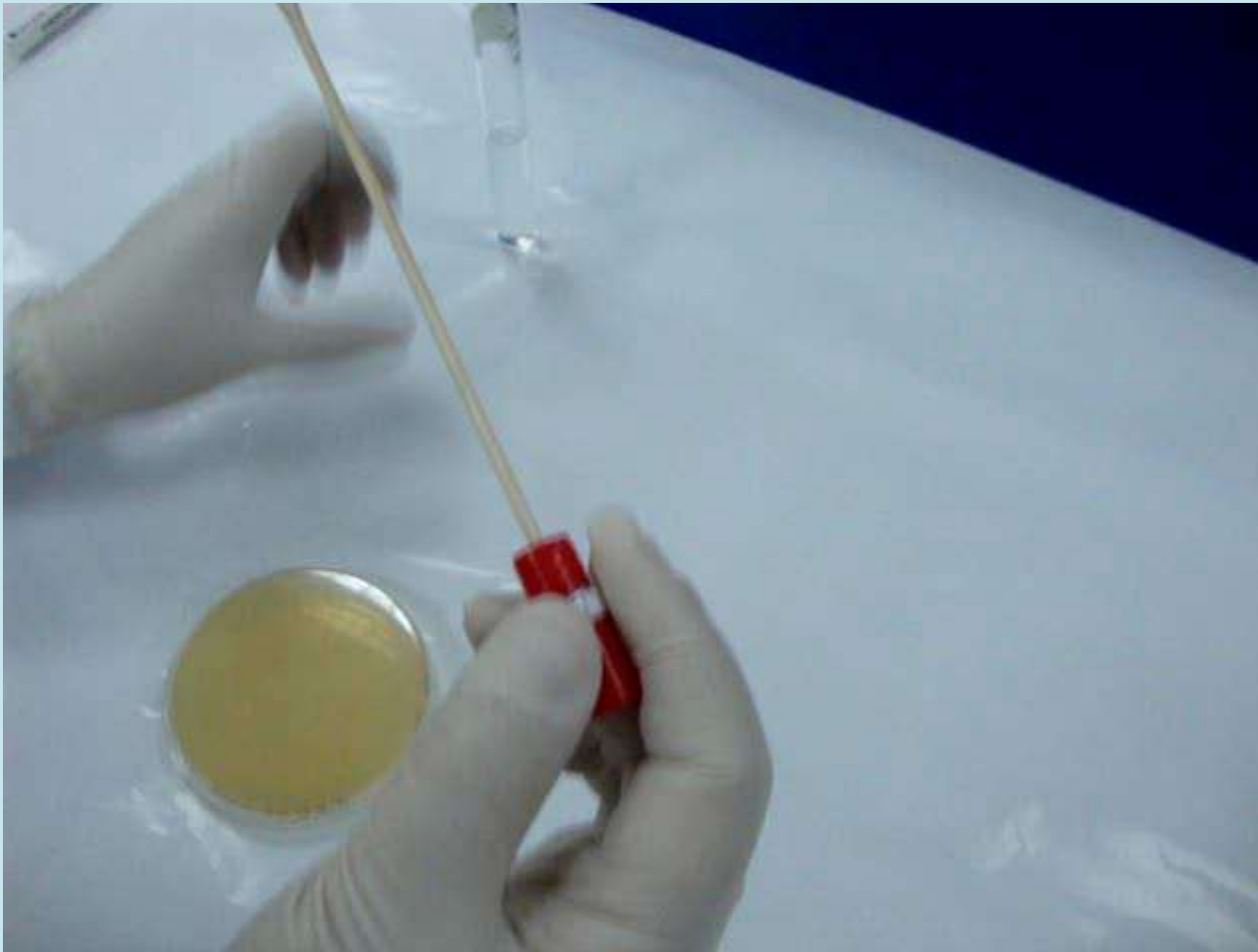
Gélose Mueller Hinton (MH) pour:

- Entérobactéries
- *Pseudomonas* sp. et *Acinetobacter* sp.
- Staphylocoques
- Entérocoques

- Bactéries exigeantes:

- Pour *H.influenzae*: *Haemophilus* Test Medium (HTM)
- Pour *N.gonorrhoeae*: Gonococci Culture Media (GC Agar)
- Pour *S.pneumoniae*: MH additionné de
  - ✓ 5% de sang de mouton
  - Ou
  - ✓ 5% de sang de cheval défibriné + 20µg/ml de NAD
- Pour les autres streptocoques, *N.meningitidis*: Gélose MH additionnée de 5% de sang de mouton.

Écouvillonner la boîte en la tournant **3 fois**, de 60° à chaque fois et terminer avec un tour de la circonférence de la **gélose**.





## Etape 4 :

# Application des disques d'antibiotiques et incubation

Vérifier la charge et la date de péremption de chaque disque à utiliser

Positionner l'applicateur de disques sur la boîteensemencée

**Se référer au fascicule de standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (dernière édition: 2020)**



# Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes

Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale

8<sup>ème</sup> édition 2020

Entérobactéries	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.
Amoxicilline <sup>a</sup> (10 µg)	Pénicilline (10UI)	Amoxicilline <sup>a</sup> (10µg)	Ticarcilline (75µg)	Ticarcilline (75µg)
Amoxicilline + acide clavulanique (20/10µg)	Oxacilline (CMI seulement)	Gentamicine (120µg)	Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg)	Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg)
Astréonam <sup>c</sup> (30µg)	Céfoxitine (30µg)	Streptomycine (300µg)	Piperacilline (100µg)	Piperacilline (100µg)
	Kanamycine (30µg)	Erythromycine (15µg)	Piperacilline + tazobactam (100 µg/10 µg)	Piperacilline + tazobactam (100 µg/10 µg)
Céfazoline <sup>c</sup> (30µg)	Amikacine (30µg) <sup>i</sup>	Clarithromycine (15µg) / Quinoloxone-dalofoprostine (15µg)	Ceftazidime (30µg)	Ceftazidime (30µg)
Céfoxitine (30µg)	Gentamicine (10µg)	Furanes (300µg)	Astréonam (30µg)	Imipénème (10µg)
Céfotaxime <sup>c</sup> (30µg)	Erythromycine (15µg)	Tétracycline <sup>c</sup> (30µg)	Imipénème (10µg)	Méropénème (10µg)
Imipénème (10µg)	Clindamycine (2µg)	Vancomycine (30µg)	Méropénème (10µg)	Amikacine (30µg)
	Clarithromycine (15µg) / Quinoloxone-dalofoprostine (15µg)	Teicoplanine (30µg)	Amikacine (30µg)	Gentamicine (10µg)
Ertapénème (10µg)	Cifloxacine (5µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Gentamicine (10µg)	Tobramycine (10µg)
Méropénème (10µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)	Tobramycine (10µg)	Netilmicine (CMI seulement)
Amikacine (30µg)	Lévofloxacine (5µg)	Rifampicine (5µg)	Netilmicine (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)
Gentamicine (10µg)	Chloramphénicol (30µg)	Fosfomycine <sup>f</sup> (200µg)		Lévofloxacine (5µg)
Acide nalidixique (30µg)	Vancomycine (CMI) <sup>k</sup>	Chloramphénicol (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Doxycycline <sup>c</sup> (30µg)
Ciprofloxacine (5µg)	Teicoplanine (CMI) <sup>k</sup>	Tigécycline <sup>g</sup> (CMI)	Lévofloxacine (5µg)	Imipénème + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)
Colistine <sup>h</sup> (CMI)	Rifampicine (5µg)	Imipénème <sup>e</sup> (10µg)	Fosfomycine (CMI)	Colistine (CMI)
Chloramphénicol (30µg)	Imipénème + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)		Colistine <sup>h</sup> (CMI)	
Furanes (300µg)	Tétracycline <sup>c</sup> (30µg)			
Imipénème + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Acide fusidique (10µg)			
Fosfomycine (200µg)	Fosfomycine (IV)			
	Composé vibriostatique O/129 <sup>e</sup>			

a : réponse d'interprétation valable pour l'amoxicilline ; b : réponse d'interprétation valable pour céftriaxone, céfixime, céfoperazone, céfdinir et céfepodoxime sauf en cas de BLSE, se référer à la page 41. ; c : réponse d'interprétation valable pour tétracycline et doxycycline ; d : réponse d'interprétation valable pour les céphalosporines orales (céfalotine, céfalexine, céfadine, céfador, céfdinir, céfuroxime) pour les infections urinaires non compliquées à *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. mirabilis* ; e : antibiotique testé à visée de diagnostic ; f : réponse d'interprétation valable pour l'azithromycine ; g : réponse en cas de multirésistance ; h : rendre le résultat en cas d'infection sévères à BMR ; i : rendre le résultat pour les infections urinaires à *E. coli* ; j : Tester pour les infections urinaires ; k : Voir chapitre recherche complémentaire ; l : le disque de kanamycine est testé pour évaluer la sensibilité à l'amikacine.

# Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes (suite):

<i>S. maltophilia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Vibrio</i> spp.	Autres bactéries non fermentaires
Cefazidime (CMI)	Cefazidime (30µg)	Ampicilline <sup>a</sup> (10µg)	Céfotaxime <sup>b</sup> (CMI)
Ticarcilline+ acide clavulanique (CMI)	Ticarcilline+ acide clavulanique (CMI)	Amoxicilline + acide clavulanique (20/10µg) <sup>i</sup>	Cefazidime (CMI)
Chloramphénicol (CMI)	Méropénème (10µg)	Céfotaxime <sup>b</sup> (30µg)	Imipénème (CMI)
Minocycline <sup>c</sup> (30µg)	Minocycline <sup>c</sup> (30µg)	Tétracycline <sup>c</sup> (30µg)	Amikacine (CMI)
Lévofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (CMI)	Furanes (300µg)	Gentamicine (CMI)
Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Chloramphénicol (CMI)	Colistine <sup>e</sup> (10µg)	Chloramphénicol (CMI)
	Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Tétracycline <sup>c</sup> (CMI)
		Ciprofloxacine (5µg)	Ciprofloxacine (CMI)
		Azithromycine <sup>k</sup> (CMI)	Triméthoprim + sulfaméthoxazole (CMI)
		Chloramphénicol <sup>k</sup> (30µg)	
		Composé vibriostatique O129 <sup>e</sup>	

a : réponse d'interprétation valable pour l'amoxicilline ; b : réponse d'interprétation valable pour céftriaxone, céftrime, céfoperazone, cétinir et céfopodoxime sauf en cas de BLSE ; c : réponse d'interprétation valable pour tétracycline et doxycycline ; e : antibiotique testé à visée de diagnostic ; k : valable uniquement pour *V.cholerae* ; i : interprétation valable pour les *Vibrio* autre que *V.cholerae*

# Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries exigeantes

Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale

8<sup>ème</sup> édition 2020

<b>Haemophilus spp.</b>	<b>N. gonorrhoeae</b>	<b>N. meningitidis</b>	<b>Moraxella catarrhalis</b>	<b>S. pneumoniae</b>	<b>Streptococcus spp. Groupe viridans</b>	<b>Streptococcus β-hémolytique</b>
Ampicilline <sup>a</sup> (10µg)	Pénicilline (100U)	Pénicilline (CM)	Amoxicilline + ac. clavulanique (20/10µg)	Pénicilline (CM)	Pénicilline (CM)	Pénicilline (100U)
Ampicilline (2µg)	Céftroxone <sup>b</sup> (30µg)	Ampicilline <sup>c</sup> (CM)	Céfotaxime (CM)/Céftroxone (CM)	Oxacilline <sup>d</sup> (1 µg)	Ampicilline (CM)	Ampicilline <sup>e</sup> (100U)
Amoxicilline + ac. clavulanique (20/10µg)	Tétracycline <sup>e</sup> (30µg)	Céfotaxime (30µg)/Céftroxone (30µg)	Azithromycine (15µg)	Amoxicilline pour autre que LCR (CM)	Céfotaxime (30µg)	Erythromycine <sup>f</sup> (15µg)
Céfotaxime <sup>a</sup> (30µg)	Spectinomycine (100µg)	Rifampicine (5µg)	Ciprofloxacine (CM)	Céfotaxime (CM)	Eristamycine (15µg) / Quinupristine-dalfopristine (15µg)	Clindamycine (2µg)
Tétracycline (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Chloramphenicol (30µg)	Lévofloxacine (CM)	Imipénème (CM)	Tétracycline (30µg)	Eristamycine (15µg) / Quinupristine-dalfopristine (15 µg)
Azithromycine (15µg)		Ciprofloxacine <sup>a</sup> (5µg)	Tétracycline (30µg)	Erythromycine (15µg)	Gentamicine (CM) pour infections graves)	Tétracycline (30µg)
Acide nalidixique (30µg)		Azithromycine <sup>a</sup> (15µg)	Chloramphenicol (CM)	Clindamycine (2µg)	Vancomycine (30µg)	Ofloxacine (5µg)
Ciprofloxacine (5µg)			Triméthopime + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Eristamycine (15µg) / Quinupristine-dalfopristine (15µg)	Chloramphenicol (30µg)	Lévofloxacine (5µg)
Lévofloxacine (5µg)				Chloramphenicol (30µg)	Rifampicine (5µg)	Vancomycine (30µg)
Chloramphenicol (30µg)				Rifampicine (5µg)	Erythromycine <sup>e</sup> (15µg)	Chloramphenicol (30µg)
Triméthopime + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)				Triméthopime + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Ofloxacine (5µg)	Gentamicine (500µg)
Rifampicine (5µg)				Vancomycine (30µg)	Lévofloxacine (5µg)	
				Lévofloxacine (5µg)	Clindamycine (2µg)	
				Doxycycline (30µg)		
				Gémfloxacine (5µg)		

- a : réponse d'interprétation valable pour l'amoxicilline  
 b : réponse d'interprétation valable pour céftroxone, céfixime, céfopérazone, céfdinir et céfodroxime  
 c : réponse d'interprétation valable pour tétracycline et doxycycline  
 d : réponse d'interprétation valable pour la pénicilline (« recherches complémentaires »)  
 e : marqueur de résistance  
 f : réponse d'interprétation valable pour la spiramycine



Vérifier la charge et la date de péremption de chaque disque à utiliser

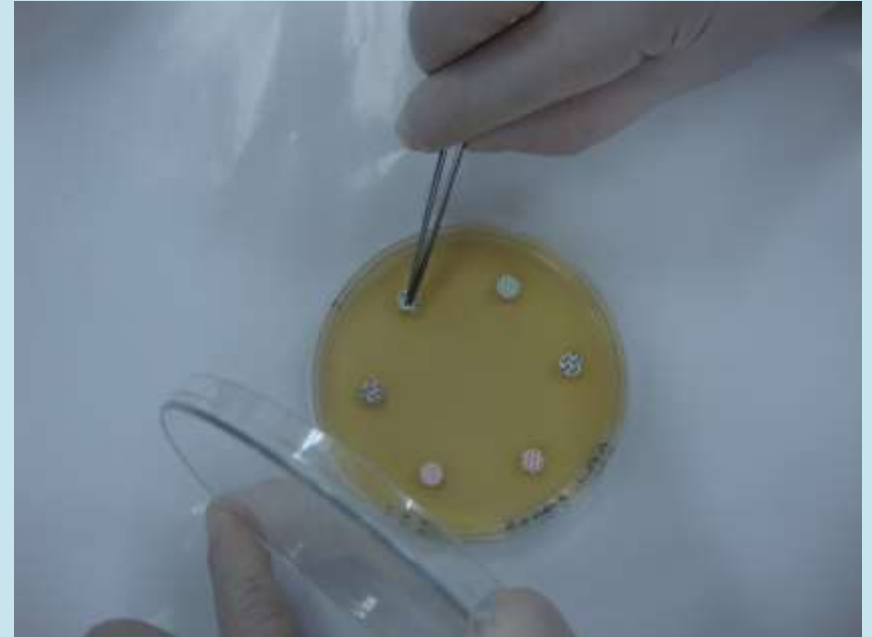


Positionner l'applicateur de disques sur la boîteensemencée





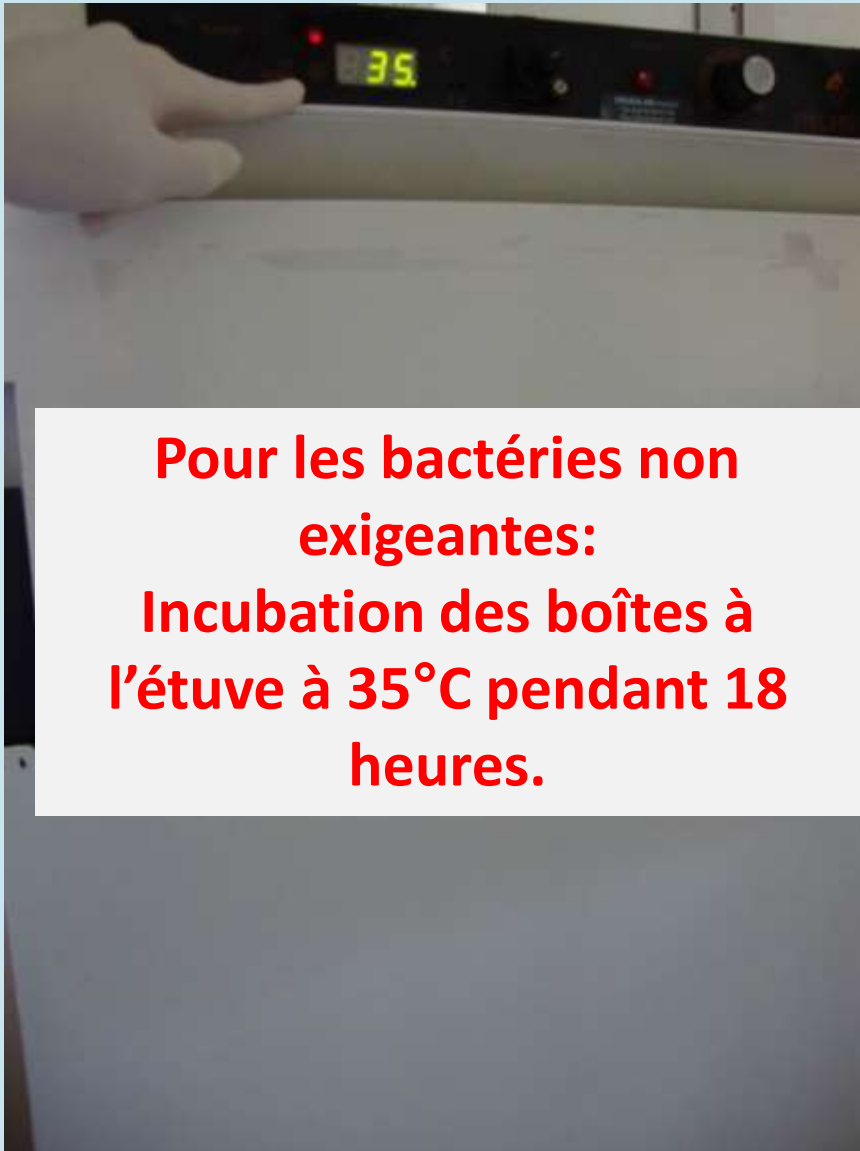
Appliquer les disques d'antibiotiques  
( un maximum de six disques par  
boîte)



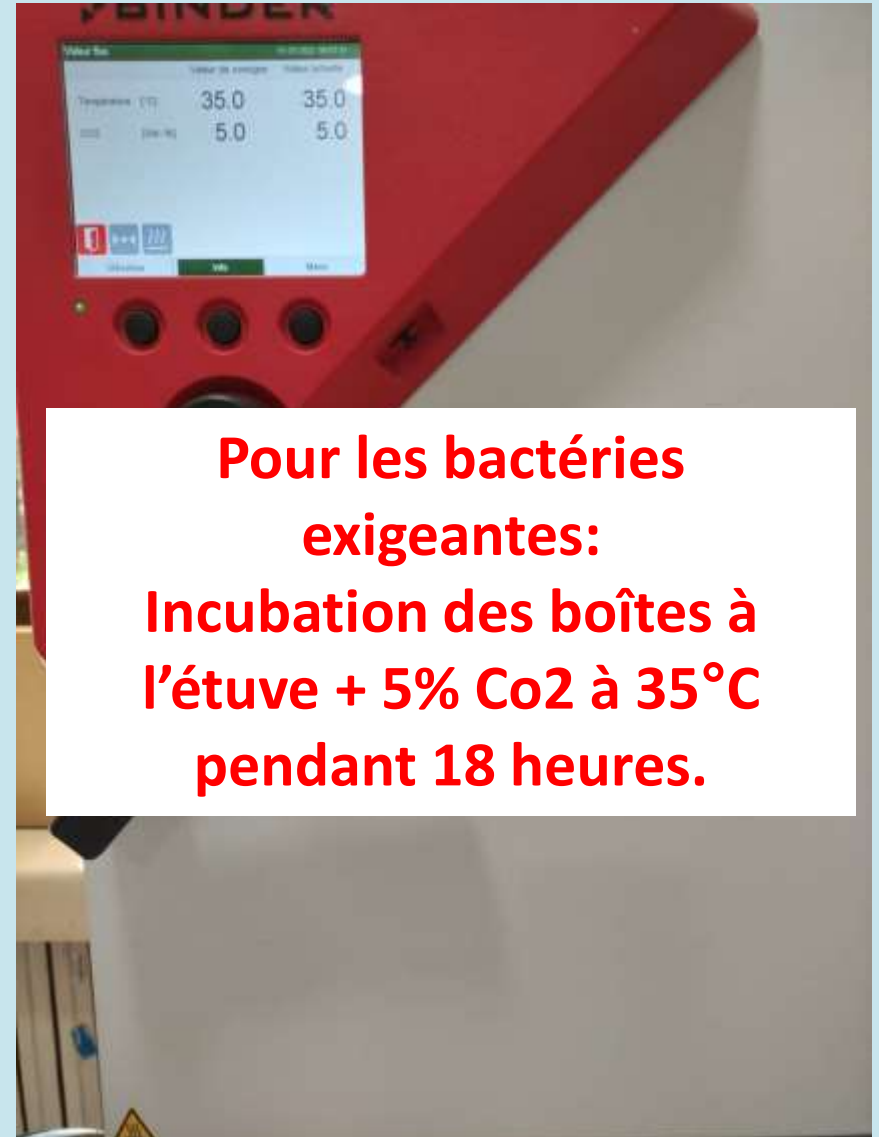
S'assurer que les disques ont bien  
adhéré à la gélose en appuyant  
dessus avec les pointes d'une  
pince stérile



Exemple de boîte avant incubation



**Pour les bactéries non exigeantes:  
Incubation des boîtes à l'étuve à 35°C pendant 18 heures.**

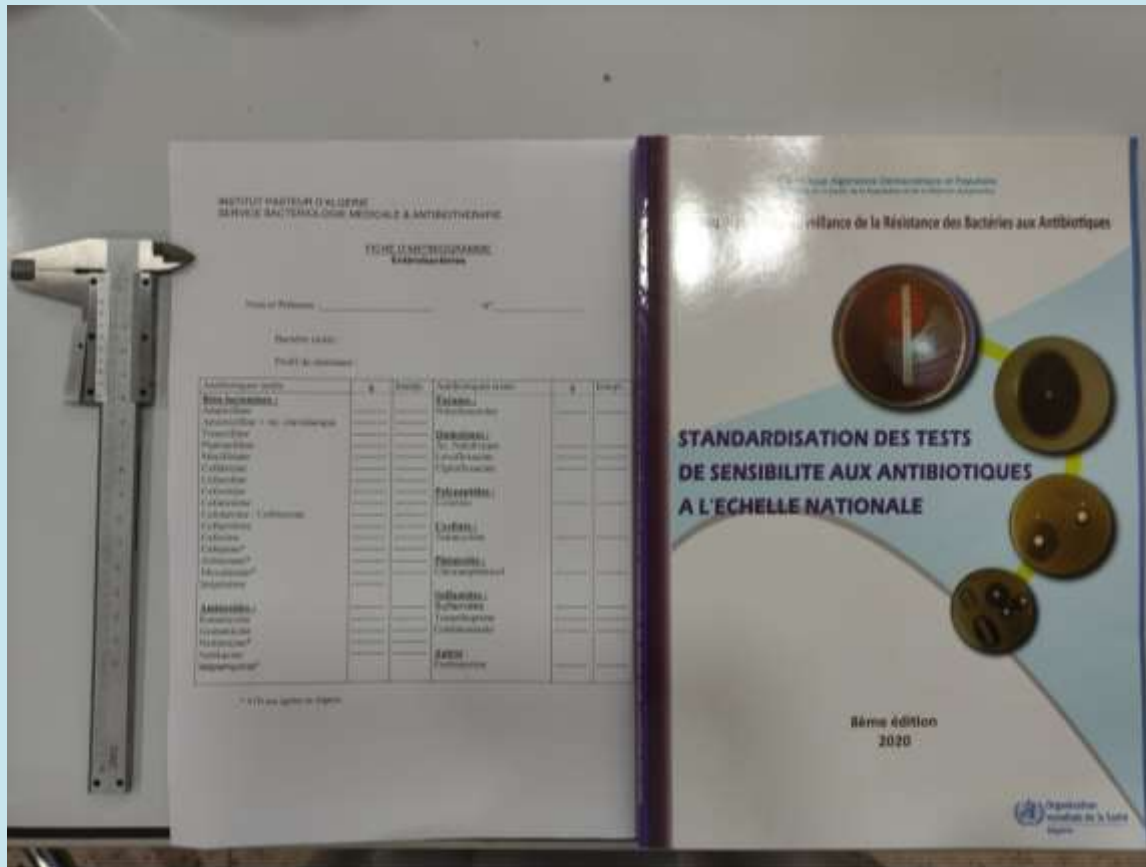


**Pour les bactéries exigeantes:  
Incubation des boîtes à l'étuve + 5% Co2 à 35°C pendant 18 heures.**



Préparer les tables de lecture des valeurs critiques, correspondantes à l'espèce bactérienne testée\*

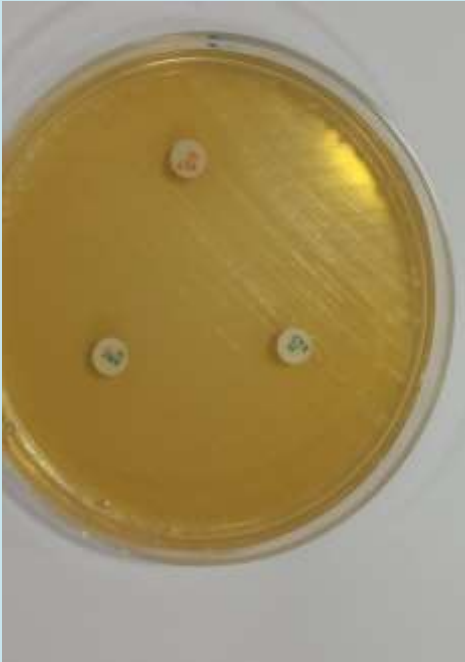
\* Recommandations nationales pour la standardisation de l'antibiogramme selon les normes C.L.S.I.



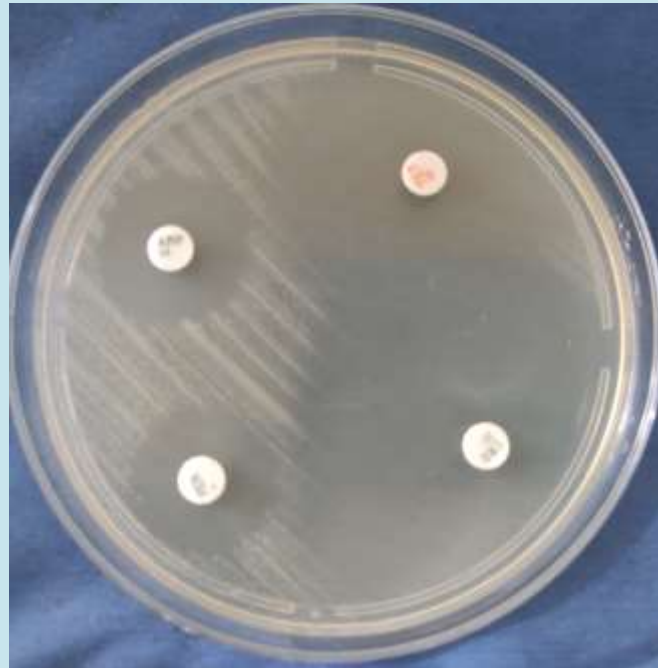
Préparer les tables de lecture des valeurs critiques, correspondantes à l'espèce bactérienne testée\*

\* Recommandations nationales pour la standardisation de l'antibiogramme selon les normes C.L.S.I.

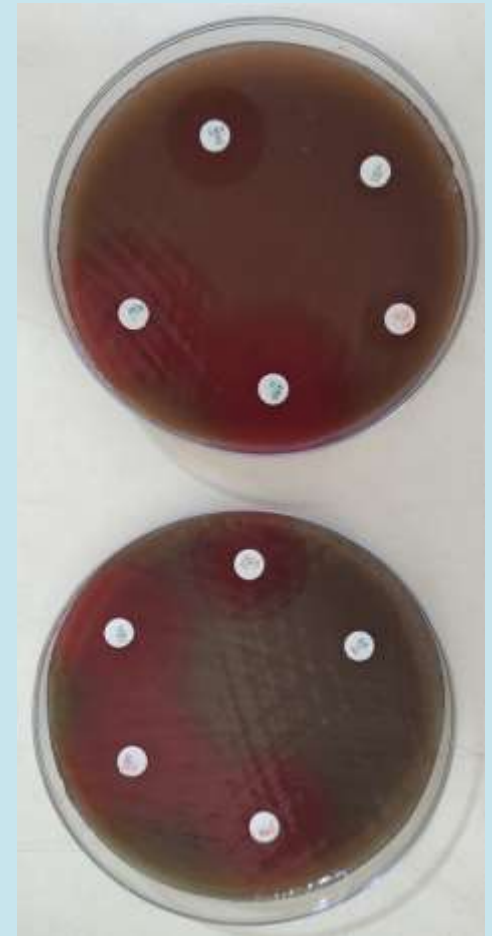
## Quelques exemples de milieux pour les bactéries exigeantes



Milieu HTM pour *Haemophilus*

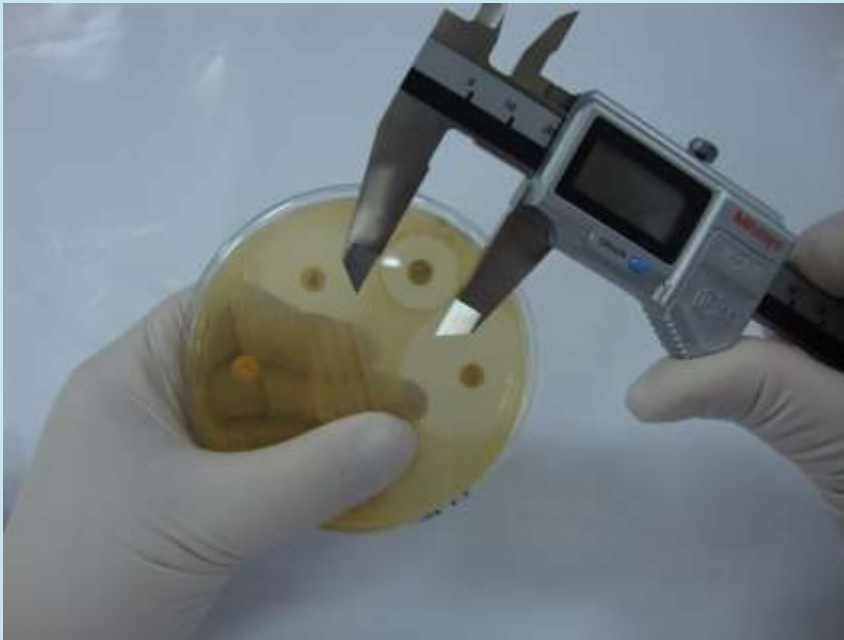


Milieu GC pour *N.gonorrhoeae*

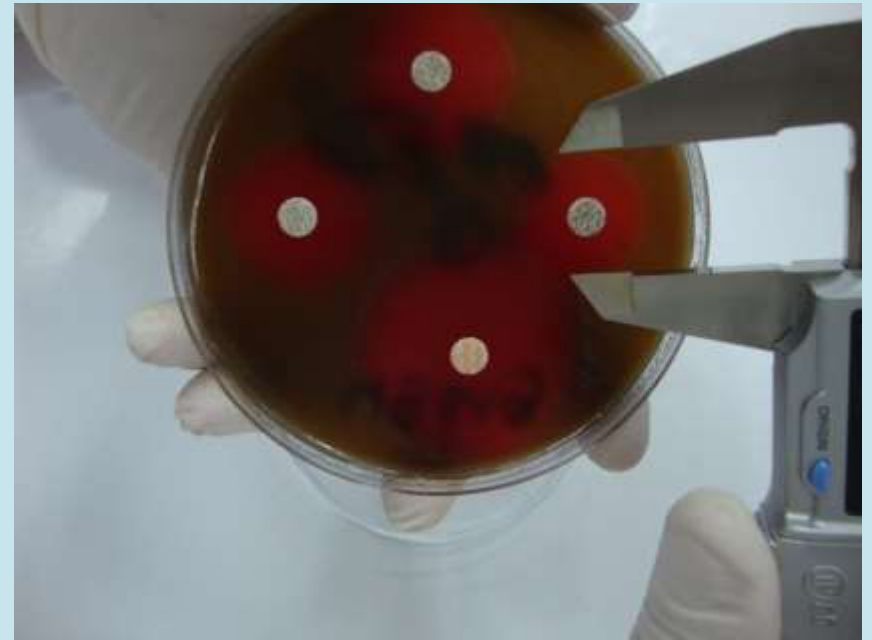


Milieu MH au sang pour streptocoques.  
Haut: Streptocoque  $\beta$ - hémolytique.  
Bas: *S.pneumoniae*

Bien positionner le pied à coulisse afin de faire une bonne lecture des diamètres

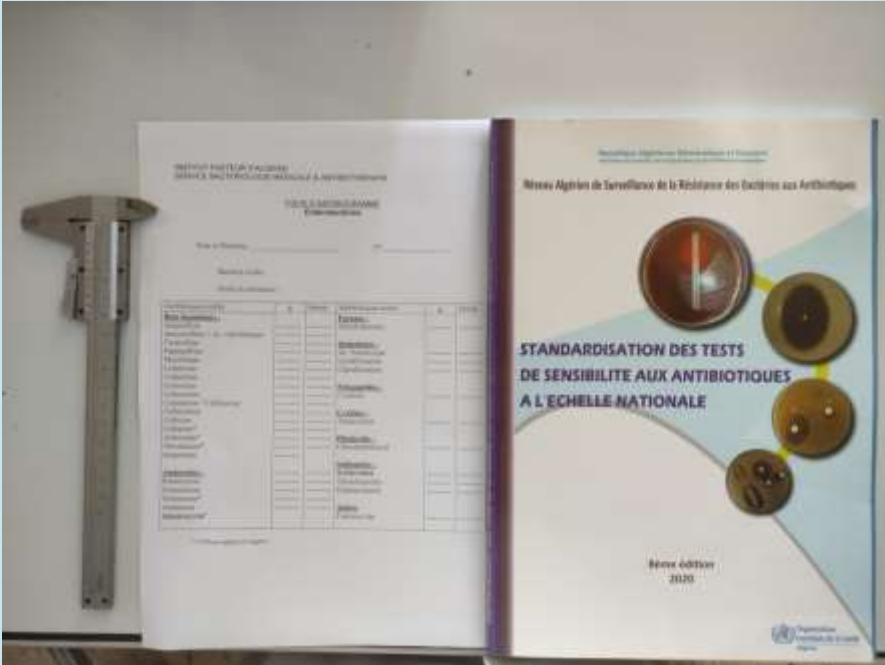


Mesurer le diamètre à l'extérieur de la boîte



Mesurer le diamètre à l'intérieur de la boîte en évitant de toucher la gélose

Reporter les diamètres de la souche en les comparant aux valeurs critiques correspondantes à l'espèce bactérienne étudiée





# Reporter les données et les diamètres de la souche sur le logiciel Whonet

The screenshot shows the Whonet software interface with various data entry fields. The 'Patient' section includes fields for Name, Age, Sex, Date of birth, and Category of age. The 'Specimen' section includes fields for Specimen type and Type of specimen. The 'Collection' section includes fields for Date of collection, Type of collection, and Indication. The 'Microbiology' section includes fields for Microorganism, Type of microorganism, and Microorganism. The 'Antibiogram' section includes a table for reporting results.

Antibiotique	Résultat	Diamètre (mm)
AMK		
AMP		
ATM		
ATV		
CAZ		
CHL		
COL		
CTX		
ERY		
FOS		
FUS		
GAT		
GEM		
GEN		
IMP		
MEM		
NET		
NIT		
OFI		
OFL		
PLA		
SMX		
SXT		
TET		
TIC		
TMP		
TRM		
TRV		
VAL		
VAN		
GEN		
COL		
ERY		
FOS		
FUS		
GAT		
GEM		
GEN		
IMP		
MEM		
NET		
NIT		
OFI		
OFL		
PLA		
SMX		
SXT		
TET		
TIC		
TMP		
TRM		
TRV		
VAL		
VAN		

LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE MÉDICALE

Nombre d'identification = (21701001)  
 Service =  
 Nom de famille =  
 Date de naissance =

Service =  
 Numéro de prélèvement = 788/12  
 Date de prélèvement = 17-jan-2017  
 Type de prélèvement = Pn

Colisticine	R	6 mm	Moxalactam	R	14 mm
Contamycine	S	29 mm	Amikacine	S	25 mm
Kanamycine	R	6 mm	Tobramycine	R	12 mm
Ciprofloxacine	S	25 mm	Levofloxacine	S	30 mm
Nitrofurantoin	S	26 mm	Tétracycline	S	37 mm
Chloramphénicol	S	28 mm	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole	S	18 mm
Penicilline G	R	6 mm	Oxacilline	?	6 mm
Erythromycine	S	25 mm	Clindamycine	S	21 mm
Lasalicycine	?	21 mm	Pristinamycine	?	30 mm
Oflouxacine	S	28 mm	Ticoplanine	S	25 mm
Rifampine	S	22 mm	Acide fusidique	?	6 mm
Fucidamycine	?	22 mm			

17-jan-2017 11:23 R = Résistant I = Intermédiaire S = Sensible NS = Non-sensible

Ne pas hésiter à commenter le résultat si nécessaire.

Avec les salutations d'une équipe de choc

