



Réalisation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé

Novembre 2025

Rédaction : Dr Eric Farfour¹

Comité scientifique : Dr F. Compain², Dr V. Latapy¹, Dr M. Lavollay², Dr L. Limousin¹

¹ Hôpital Foch, ² Institut Médico-chirurgical Montsouris

Rappel



Bactéries = micro-organismes vivant

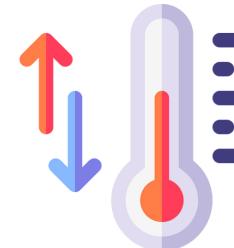
- Conditions de croissances dépendent des conditions ambiantes



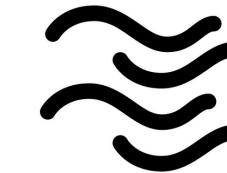
Composition
du milieu



Humidité



Température



Atmosphère



Durée
d'incubation

→ Nécessité de standardisation → Mise en œuvre rigoureuse

MILIEUX GELOSES



Adapté aux micro-organismes

Mueller Hinton (MH)

- Micro-organismes non fastidieux
- Caséine hydrolysée, d'infusion de bœuf, d'amidon

MHF

- Milieu supplémenté pour micro-organismes fastidieux
- MH additionné de 5% de sang de cheval mécaniquement défibriné et de 20 mg/L β-NAD

Brucella + 5 % de sang de mouton + vitamine K1 + hémine

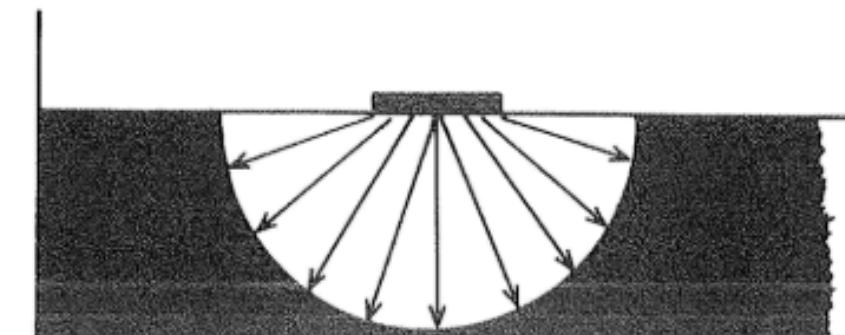
- Anaérobies
- Chocolat polyvitex
- *Neisseria gonorrhoea*
- MH + 10 % de sang défibriné de cheval
- *Helicobacter pylori*

MILIEUX GELOSE

Hauteur de gélose

- Hauteur calibrée
- 4 mm +/- 0,5 mm
- Standardisation

Correct agar depth



Thin layer of agar
= large zones



P. aeruginosa ATCC 27853
Mean of 3 measurements (mm)

Volum	22 mL	25 mL	28 mL	30 mL	Target	Range
Agar depth	3.2 mm	3.7 mm	4.2 mm	4.6 mm		
Ceftazidime 10 µg	25.3	24.0	23.3	22.3	24	21-27
Piperacillin-tazobactam 30-6 µg	27.0	27.0	26.0	24.3	26	23-29

DISQUES D'ANTIBIOTIQUES



Conservation

- Selon préconisation du fournisseur à l'abri de la lumière avec dessicant
- Durée limité après déconditionnement
- Remise à température ambiante avant utilisation
- Prévention de la condensation : laisser les conteneur à température ambiante, plutôt que le sortir et le remettre à température réfrigéré.



PREPARATION DE L'ANTIBIOGRAMME



Géloses

- Sortir du cellophane et les placer
 - à température ambiante la veille
 - ou à +35 °C couvercle ouvert 15 min
- Vérification de la surface des géloses
 - Sèche
 - Lisse et régulière
 - Sans contaminant



PREPARATION DE L'ANTIBIOGRAMME



Inoculation

- Préparation en solution saline
- Inoculum calibré à :
 - 0,5 Mc Farland le plus souvent
 - 1 Mc Farland : anaérobie et *S. pneumoniae (chocolat)*
 - 3 Mc Farland : *H. pylori*
- Calibration
 - Néphéломètre
 - Dispositif spécifique : tige en tungstène

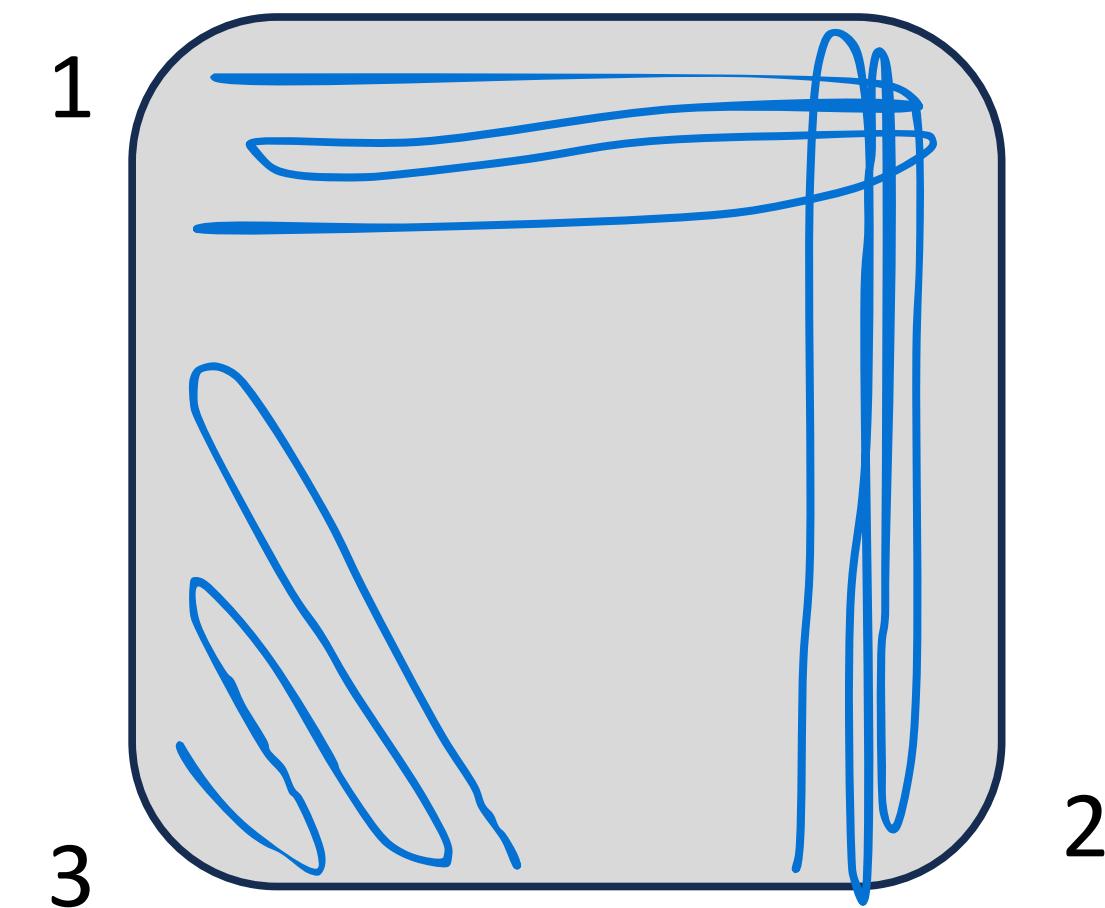


PREPARATION DE L'ANTIBIOGRAMME



Inoculation

- Par strie à l'aide d'un écouvillon
 - Toutes espèces sauf *H. pylori*
 - Plonger l'écouvillon dans la suspension
 - Eliminer l'excès de liquide
 - Écouvillonnage par strie sérées dans 3 directions
 - Recharger l'écouvillon entre chaque gélose
- Par inondation
 - *H. pylori*

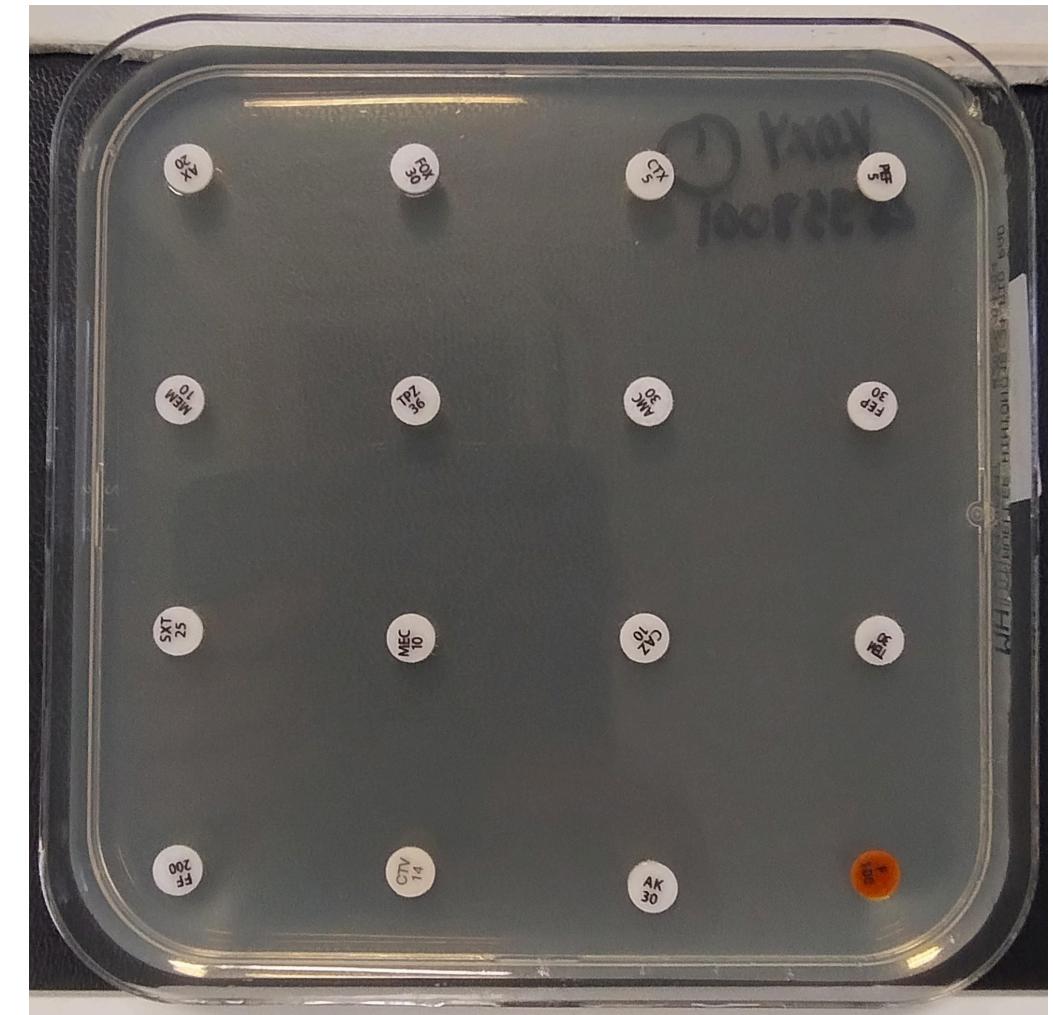


PREPARATION DE L'ANTIBIOGRAMME



Application des disques

- Dans les 15 min suivant l'inoculation
- Nombre maximum de disque
 - Boite ronde de 90 mm de diamètres : 6 disques
 - Boite ronde de 150 mm de diamètre : 12 disques
 - Boite carré de 120 mm de côté : 16 disques
- Réglage distributeur
 - Disque contact étroit avec la gélose
- Mise en incubation dans les 15 min

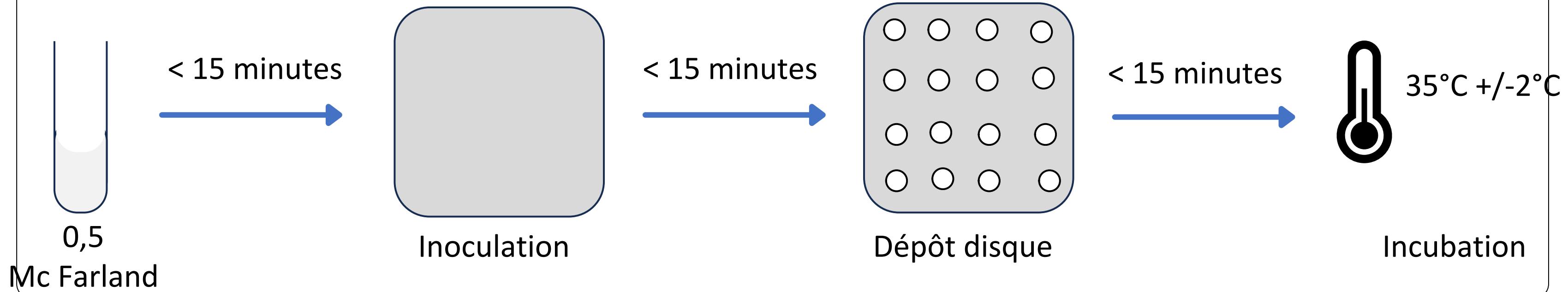


PREPARATION DE L'ANTIBIOGRAMME



Récapitulatif : délais maximaux pour chaque étape

- Règle des 3 x 15 minutes



INCUBATION



Conditions

- Température : 35°C +/- 2°C
- Durée : 16h - 20h jusqu'à 48 heures pour les micro-organismes fastidieux
- Prolongation à 40h - 48h possible
 - Si croissance insuffisante à 16h-24h ex *Corynebacterium* spp.
 - Détection de mécanisme de résistance : ex. linézolide et *Enterococcus* spp. ou *Staphylococcus* spp.

INCUBATION

Conditions

- Atmosphère
 - Gélose MH : aérobie
 - Gélose MHF : enrichie 5% CO₂
 - Anaérobie : anaérobiose
 - *Campylobacter* : microaérobiose
- Position : boite retournée gélose vers le haut



Contrôle qualité



Principe et objectif

- Souches de référence
- Nombre et fréquence à adapter à l'activité
- Permet de vérifier
 - Le milieu
 - L'inoculum et l'ensemencement
 - La qualité des disques

1. 3. Contrôle de qualité interne

Tableau 4 Souches du contrôle de qualité en routine			
Contrôle de qualité principal ¹		Contrôle de qualité pour les antibiotiques non couverts par le contrôle de qualité principal	
Micro-organisme	Souche	Antibiotique	Souche
<i>Enterobacteriales</i> ²	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Colistine (CMI)	<i>E. coli</i> NCTC 13846
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	[...]	
		Ticarcilline (diamètre)	<i>E. coli</i> ATCC 25922
		Colistine (CMI)	<i>E. coli</i> NCTC 13846
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Ampicilline-sulbactam (CMI)	<i>E. coli</i> ATCC 25922
		Triméthoprime-sulfaméthoxazole (CMI, diamètre)	<i>E. coli</i> ATCC 25922
		Colistine (CMI)	<i>E. coli</i> NCTC 13846
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	[...]	
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Chloramphénicol (CMI)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213

POINTS CLÉFS



- Standardisation et mise en œuvre rigoureuse
- Géloses : température ambiante, sèches
- Disques antibiotiques
- Règle des 3 x 15 minutes
- Durée d'incubation 16 - 20 heures / 40 - 48 heures
- Contrôles de qualité



Cette infographie est diffusée avec le soutien de l'



Retrouvez nos publications en accès libre :

www.clin92.com

Pour rester informé, notre newsletter mensuelle :

<https://www.clin92.com/abonnement>