

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie appliquée



***Polycopié de Travaux Pratiques de Microbiologie
Clinique II au profit des étudiants de première année
Master (M1) Microbiologie appliquée***

Dr. BOUGUERRA Nadia

(Maitre de conférences B à l'Université Echahid Cheikh Larbi tébessi, Tébessa, Algérie)

**Année universitaire 2025/2026**

Préambule

Le présent polycopié de travaux pratiques s'adresse aux étudiants de première année de Master, spécialité Microbiologie Appliquée. Il s'inscrit dans le cadre de la formation en microbiologie clinique et a pour vocation de renforcer les acquis théoriques à travers une démarche expérimentale rigoureuse.

La microbiologie clinique occupe une place essentielle dans le diagnostic, la prévention et le suivi des maladies infectieuses. Dans ce contexte, la maîtrise des techniques de laboratoire constitue une compétence fondamentale. Ce support pédagogique propose une série de travaux pratiques permettant aux étudiants de se familiariser avec les méthodes couramment utilisées, telles que l'isolement des micro-organismes, leur identification phénotypique et biochimique, ainsi que l'étude de leur sensibilité aux agents antimicrobiens.

Au-delà de l'acquisition de compétences techniques, ces travaux pratiques visent à initier les étudiants à une démarche scientifique structurée, incluant l'observation, l'analyse critique des résultats et leur interprétation dans un contexte clinique. Une importance particulière est accordée au respect des normes de qualité, des règles d'hygiène et de sécurité, ainsi qu'aux bonnes pratiques de laboratoire.

Ce polycopié a également pour objectif de favoriser l'autonomie des étudiants, leur sens de l'organisation et leur capacité à travailler en équipe, tout en les préparant aux exigences du milieu professionnel, que ce soit dans les laboratoires d'analyses médicales, les centres de recherche ou l'industrie biomédicale.

Nous espérons que ce document constitue un guide méthodologique et un outil d'accompagnement visant à assurer une formation pratique solide et adaptée aux enjeux actuels de la microbiologie clinique.

TABLE DES MATIÈRES

Préambule	
Demarches et procedures d'organisation des travaux pratiques de microbiologie clinique	01
Deroulement des travaux pratiques de microbiologie clinique	02
TP 01. Purification des bactéries à partir des suspensions bactériennes mixtes et conservation des souches isolées	06
TP 02. Etude de la sensibilité des bactéries aux Antibiotiques (Antibiogramme standard)	14
TP 03. Lecture et interprétation des résultats de l'antibiogramme standard	20
References Bibliographiques	27

LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
01	Fiche technique des reactifs et consommables	3
02	Forme de la page de garde	4
03	Forme de la page du dessin	5
04	Différentes étapes de confiction d'un état frais	6
05	Coloration au bleu de méthylène	7
06	Different milieux de cultures solides	10
07	Isolement des bactéries sur milieu solide	11
08	Résultats de la culture bactérienne	12
09	Conservation des souches	13
10	Milieu Mueller-Hinton (MH)	15
11	Etalon de turbidité 0,5 McFarland	16
12	Écouvillon imbibé dans la suspension bactérienne et étaler sur la surface du Milieu MH	17
13	Distributeur de disques d'antibiotique sur la surface de milieu MH	17
14	Mesure des diamètres des zones d'inhibition	20

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°	Titre	Page
01	Différentes étapes de la coloration de Gram	9
02	Préparation de l'étalon de turbidité 0,5 McFarland	16
03	Liste des antibiotiques à tester sur les enterobactéries, les <i>Pseudomonas</i> et les <i>Staphylococcus</i>	18
04	Conditions d'incubation des bactéries	19
05	Souches de contrôle de qualité ATCC	21
06	Diamètres et CMI critique de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	22
07	Diamètres et CMI critique d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	22
08	Diamètres et CMI critique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	23
09	Table d'interprétation EUCAST (catégories (S) et (R))	24
10	Table d'interprétation CLSI (catégories (S), (I) et (R))	25

Demarches et procedures d'organisation des travaux pratiques de microbiologie clinique

La réalisation des travaux pratiques de microbiologie clinique nécessite plusieurs étapes pour réussir cette mission pédagogique primordiale complémentaire de la tâche théorique. L'enseignant responsable du module doit:

- A.** Etablir une fiche technique comportant les réactifs, le consommable, les milieux de cultures et les isolats bactériens (**Fiche 01**).
- B.** Collaborer avec le personnel technique du laboratoire pour s'assurer du bon fonctionnement du matériel Ex: microscopes optiques, stérilisateur, incubateur, spectrophotomètre.
- C.** Programmation des séances des travaux pratiques selon le nombre des étudiants
- D.** Répartition des étudiants sur les paillasse disponible en binômes ou monome selon l'objectif du travail pratique.
- E.** Sensibiliser les étudiants aux règles de sécurité et aux comportements à adopter durant les séances de travaux pratiques.
 - ✓ Se présenter à l'heure et porter obligatoirement une blouse de laboratoire.
 - ✓ Port de gants, si nécessaire bavette
 - ✓ Lavage des mains avec des désinfectants recommandés
 - ✓ Organisation de la paillasse avant et après le déroulement des TP
 - ✓ Port des chaussures fermées qui recouvrent le pied entier.
 - ✓ Attacher les cheveux longs au cours de la séance du TP
 - ✓ interdiction de manger, boire, mâcher le chewingum, fumer, Parler au téléphone ou écouter de la musique avec un kit-main
 - ✓ Ne pas manipuler les isolats bactériens sans autorisation de l'enseignant
 - ✓ Lors de toutes les séances du TP, l'étudiant doit avoir le matériel de dessin: feuilles blanches de format A4 non quadrillées, crayon graphite HB, règle, gomme, trombone ou graveuse.

Deroulement des travaux pratiques de microbiologie clinique

- ✓ L'enseignant chargé du TP doit expliquer la thematique et les objectifs à atteindre à l'ensemble des etudiants,ainsi que les etapes a suivre et les moyens a utilisé .Ceci avant toute manupilation .
- ✓ L'enseignant doit encadrer toute les etapes pratiques et donner les instructions à respecter pour eviter tout accident .
- ✓ Les etudiants doivent prendre des notes ,des remarques et des photos personnels de toutes les etapes jusqu'aux resultats obtenus .
- ✓ Les etudiant doivent rendre un rapport de TP selon les normes


 الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
 وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
 جامعة تلمسان
 كلية العلوم الدقيقة والعلوم الطبيعية والحياتية
 معاهد العلوم الطبيعية والحياتية

FICHE TECHNIQUE TP

Tchessa: / /
N°:

Enseignant : Signature:
 Module :
 Niveau et Spécialité :
 Titre de TP :

Grande	Gn°	Gn°	Gn°	Gn°	Gn°
Date					
Heure					

N°	Désignation			Observation
	Matériels et verreries	Qté	Produit chimique	
01				
02				
03				
04				
05				
06				
07				
08				
09				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				

Laboratoire N° : Ingénieur assistant :

NB : cette fiche doit être remise 4 jours avant la date du TP.
Le travail dans les laboratoires est soumis aux instructions existantes

Figure 01. Fiche technique des reactifs et consommables

Nom Prénom Groupe / sous groupe N° de paillasse	Date				
TP N° : Titre du TP					
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><thead><tr><th style="width: 50%; padding: 10px; text-align: center;">Note</th><th style="width: 50%; padding: 10px; text-align: center;">Observation</th></tr></thead><tbody><tr><td style="height: 150px;"></td><td style="height: 150px;"></td></tr></tbody></table>		Note	Observation		
Note	Observation				
<u>Travail à faire :</u> ➤ ➤					

Figure 02. Forme de la page de garde

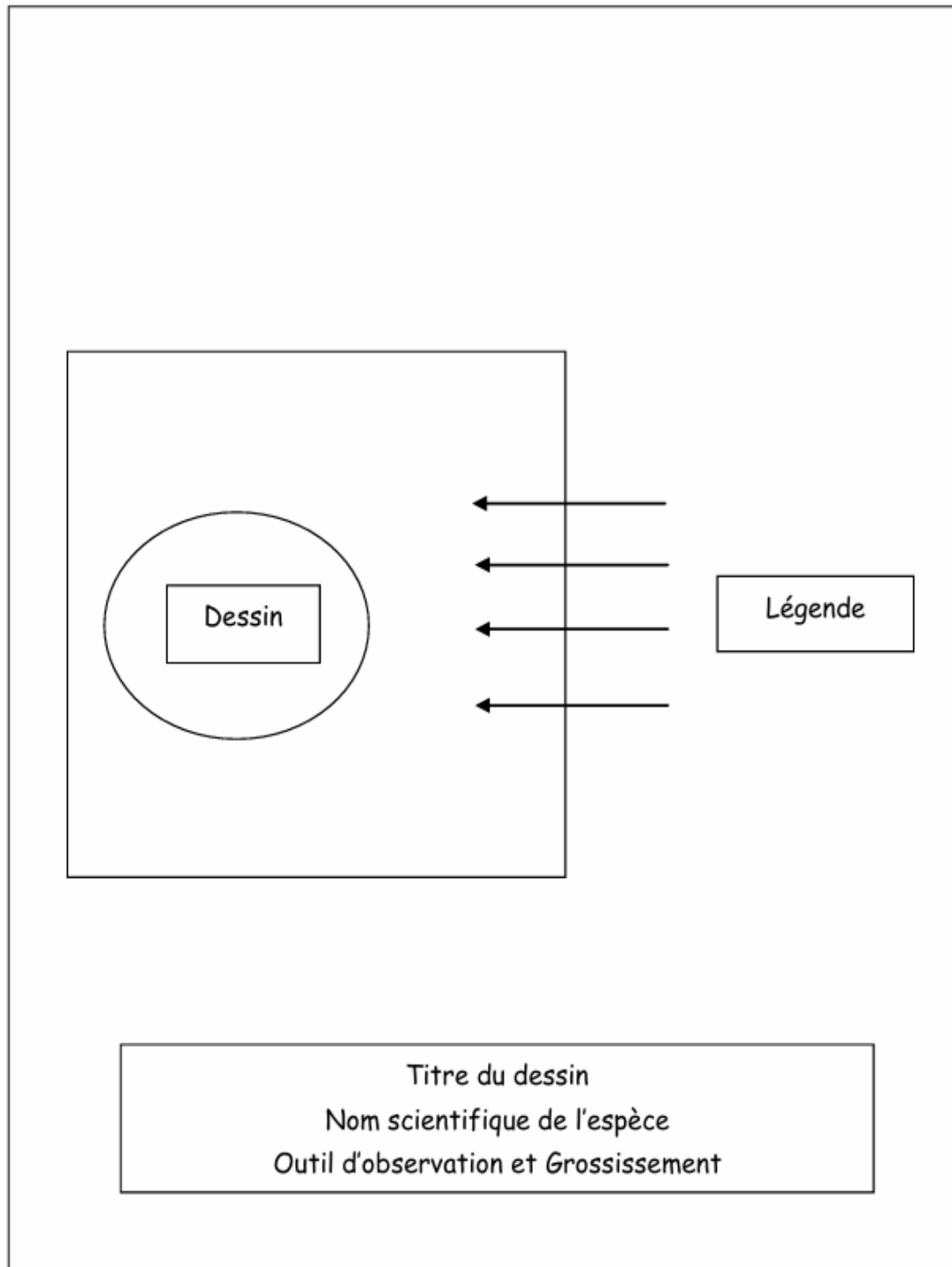


Figure 03. Forme de la page du dessin

TP. N° 01

Purification des bactéries à partir des suspensions bactériennes mixtes et conservation des souches isolées

Objectifs :

Purification des souches bactériennes sur différents milieux de culture solide enrichi et sélectifs, à partir de la suspension mixte préparée et contenant trois souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Escherichia coli*. Une étape de purification suivie d'une conservation de souches purifiées pour une éventuelle caractérisation ultérieure. C'est un TP qui constitue une initiation pour l'étudiant dans le domaine de l'analyse bactériologique des prélèvements en pathologies infectieuses. Ces dernières peuvent être mixte (infection à plusieurs espèces bactériennes à la fois) d'un côté, comme elle peut être due à une seule espèce bactérienne mais qui se trouve dans une flore commensale diversifiée.

Pour atteindre ces objectifs on doit suivre les étapes suivantes :

1. Effectuer un examen Microscopique à l'état frais et après une coloration de Gram

✓ **Etat frais**

L'examen Microscopique à l'état frais permet l'étude des bactéries vivantes, en l'absence de toute fixation ou coloration. Elle permet d'observer :

- la Forme bactérienne
- La disposition bactérienne
- la mobilité bactérienne
- Le nombre des bactéries dans un volume de l'échantillon

- On dépose une goutte d'une suspension bactérienne sur une lame en verre qu'on recouvre d'une lamelle couvre objet. La mise au point est faite à faible luminosité (condensateur baissé et diaphragme légèrement fermé) objectif x 40 après 1 minute pour ne pas confondre une mobilité réelle et un simple mouvement liquidien.

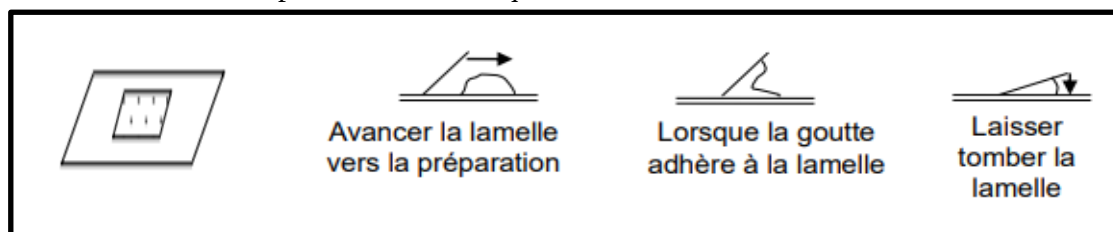


Figure 04. Différentes étapes de confection d'un état frais

✓ **Coloration au bleu de méthylène**

- Un frottis est réalisé à partir de la suspension bactérienne sur une lame propre et sèche avec une anse de platine.
- Une étape de séchage à l'air libre ou par passage rapide à travers la flamme de bec benzène.
- La coloration consiste à déposer une couche de bleu de méthylène sur le frottis pour une durée de cinq minutes.
- Rinçage l'eau et sécher à l'air libre ou avec papier absorbant.
- Observation microscopique à l'huile à immersion et à l'objectif x100 Diaphragme ouvert (maximum de lumière) et mise au point entre huile à immersion et objectif.

Cette coloration nous permet de visualiser mieux la forme bactérienne, la disposition bactérienne et la diversité bactérienne dans la suspension,

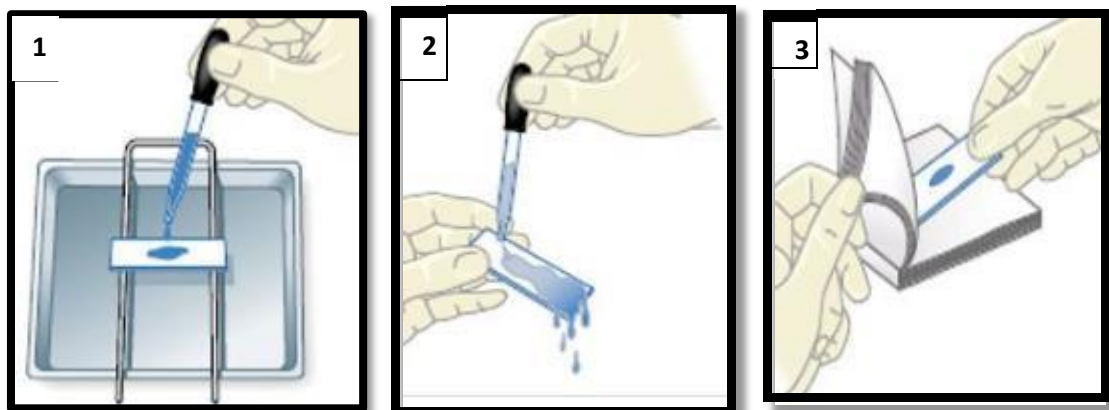


Figure 05. Coloration au bleu de méthylène

✓ **Coloration de Gram**

- Un frottis est réalisé à partir de la suspension bactérienne sur une lame propre et sèche avec une anse de platine.
- Une étape de séchage à l'air libre ou par passage rapide à travers la flamme de bec benzène.
- Recouvrir au violet de Gentiane (cristal violet) pendant 1min. et éliminer l'excès par la suite par l'eau.
- Recouvrir au Lugol pendant 1min et éliminer l'excès par l'eau.

- Appliquer l'alcool 95° pendant quelques secondes (10-15 secondes), puis rinçage à l'eau.
- Recolorer à la Fuschine pendant 1minute et 30 secondes,
- Rinçage à l'eau puis séchage.
- Observation microscopique à l'huile à immersion et à l'objectif x100
Diaphragme ouvert (maximum de lumière) et mise au point faite après un léger contact entre huile à immersion et objectif.

Cette coloration permet de visualiser les bactéries (Forme et disposition) selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une membrane externe sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-) elles prennent une coloration rose, alors que celles qui n'en possèdent cette membrane externe pas vont retenir le colorant violet de Gentiane et vont se colorer en violet (Gram+).

Tableau 01. Différentes étapes de la coloration de Gram

ETAPES	MODE OPERATOIRE	TEMPS	PRINCIPE
COLORATION PRIMAIRE	- Recouvrir la lame de cristal violet ou violet de gentiane - Rincer à l'eau distillée et récupérer le cristal violet dans un bœcher (ne pas le jeter dans le bac à coloration)	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
MORDANÇAGE	- Recouvrir de Lugol - Rincer à l'eau distillée et l'égoutter	1 minute	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
DÉCOLORATION	- Tenir la lame inclinée et faire couler pendant <u>quelques secondes</u> de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore. - Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter	5 secondes environ	L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores. Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites GRAM + ou positif.
COLORATION SECONDAIRE	- Recouvrir la lame de fuschine - Rincer à l'eau distillée	1 minute	La fuschine recoloré en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram – ou négatif.
SÉCHAGE	- Égoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher		

2. Choix des Milieux de culture à préparés suivant l'orientation microscopique

Le choix des milieux de culture à utilisés pour isolés les différentes espèces bactériennes observés à la microscopie optique (état frais, coloration au bleu de méthylène, coloration de Gram) sera basée sur :

- La visualisation des formes bacillaires et Cocci, avec une coloration à Gram Positif et Négatif, une disposition particulière des Cocci en Grappe et des bacilles avec des tailles différentes constituent un témoignage sur la présence de différentes espèces bactériennes qui doivent être isolées et purifiées pour être utilisées par la suite.
- Les milieux de cultures solides sont :
 - ✓ Un Milieu Enrichi à base de sang de Mouton cuit (Gélose au sang de Mouton cuit)
 - ✓ Deux géloses sélectives. Gélose Hécktoene, Gélose Chapman
 - ✓ Une gélose ordinaire (gélose nutritive).

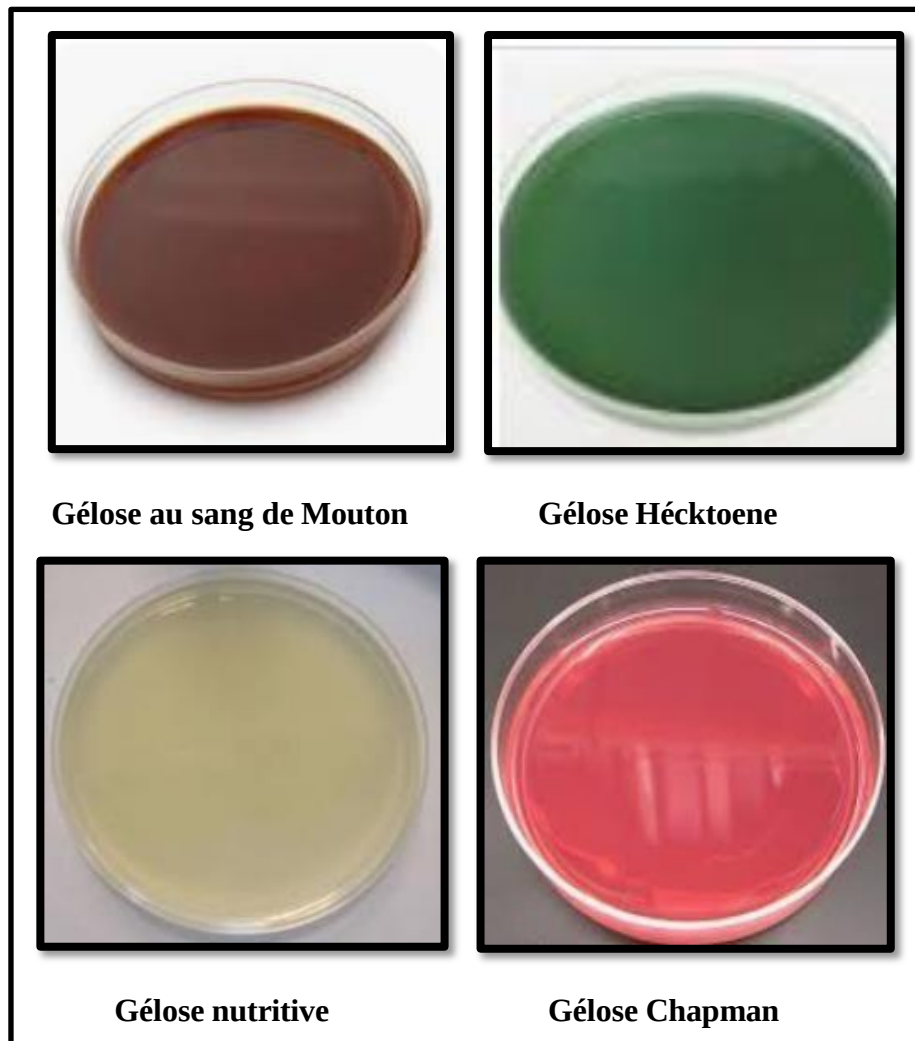


Figure 06. Different milieux de cultures solides

3. Isolement des bactéries à partir de la suspension sur différents milieux de culture

Isolement de la suspension bactérienne sur différents milieux de cultures choisies. Après homogénéisation de la suspension bactériennes, une à deux gouttes sont déposés sur les différents à l'extrémité de la boîte de pétri grâce à une pipette pasteur puis étalées sur la boîte avec la méthode d'épuisement en quadrant dans le but de séparer les espèces bactériennes les unes des autres.

- ✓ L'inoculum est d'abord dispersé à l'aide d'un mouvement de va et vient dans le premier quadrant de la boîte de pétri. créant une zone avec une population bactérienne relativement dense.
- ✓ Les stries sont tirées de la zone précédente, à l'aide d'une boucle d'inoculation stérile à chaque fois, jusqu'à ce que le quatrième quadrant soit atteint.

- ✓ Un dernier mouvement en zigzag dirigé, permettant aux colonies d'apparaître séparées les unes des autres.

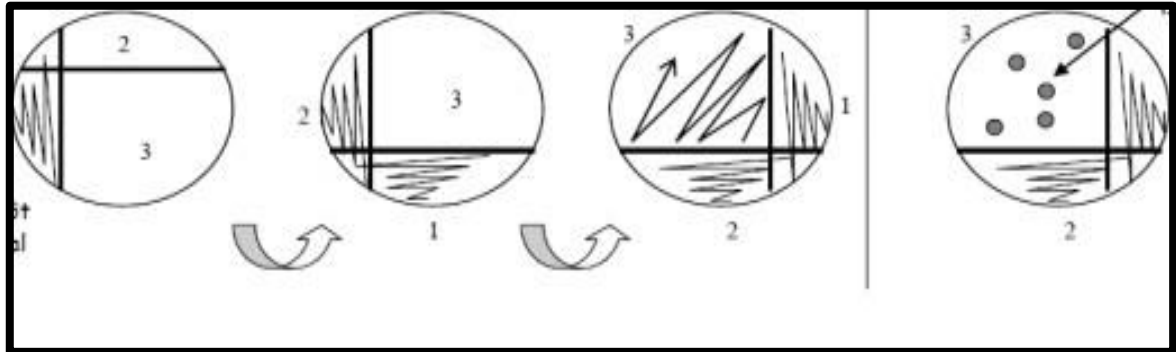


Figure 07. Isolement des bactéries sur milieu solide

4. Lecture des résultats de la culture bactérienne

L'utilisation combinée des milieux de cultures enrichi et sélectifs et la méthode d'isolement par épuisement permettront d'arriver à une purification des espèces présentes dans le mélange bactérien initial.

Dans notre cas :

- ✓ *Staphylococcus aureus*, va apparaître aussi bien sur le milieu enrichi et sur le milieu Chapman
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* : essentiellement, cette espèce va apparaître sur gélose ordinaire avec une pigmentation caractéristique (verte) et odeur de jasmin, toutefois elle pousse sur le milieu enrichi et ± sur gélose hecktoen.
- ✓ *Escherichia coli* va apparaître sur milieu Hecktoen essentiellement ainsi que sur milieu enrichi et sur milieu ordinaire.

L'appréciation de la taille des colonies, couleur, odeur des colonies sur différents milieux utilisés va permettre une purification des différentes espèces les unes des autres.

✓ Résultats attendus

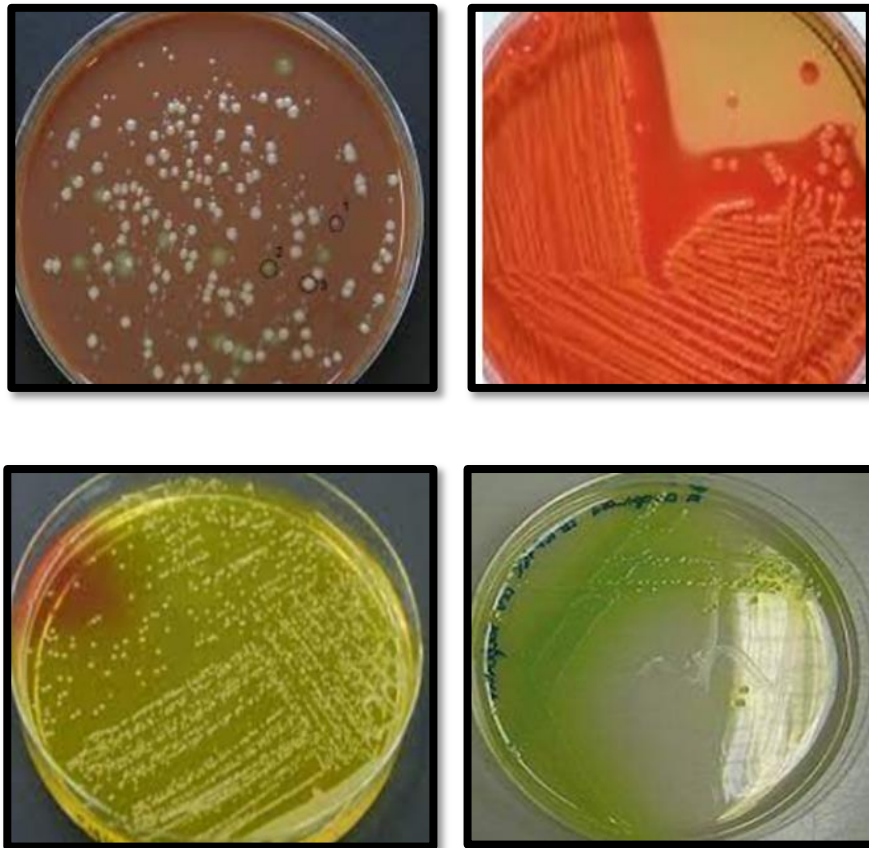


Figure 08. Résultats de la culture bactérienne

5. Conservation des souches sur gélose en profondeur et à la surface.

La conservation de souches bactériennes purifiées sur milieu gélosé en profondeur (bactéries aero-anaérobie facultatif) ou en surface surtout pour les bactéries aérobies strict. Dans notre cas : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* inoculée en profondeur par plusieurs piqures centrale d'une culture dense dans une gélose nutritive ordinaire. Pour le *Pseudomonas aerogenosa* une conservation la surface est recommandée vu le caractère aérobie strict de cette bactérie.

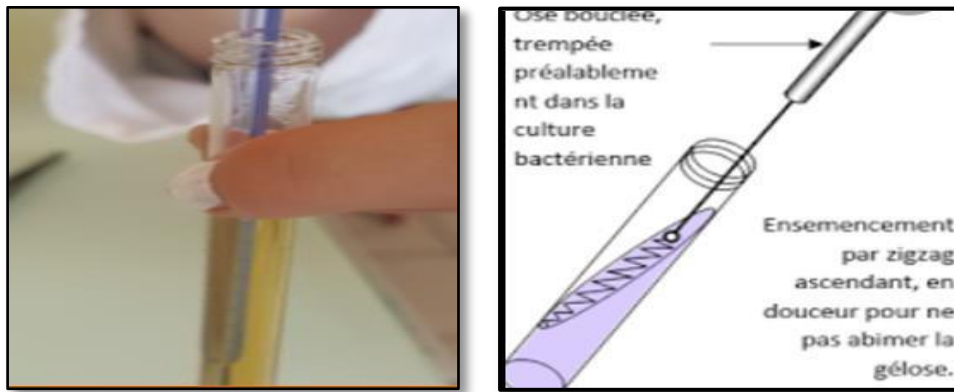


Figure 09. Conservation des souches

TP. N° 02

Etude de la sensibilité des bactéries aux Antibiotiques
(Antibiogramme standard)

Objectifs :

Après isolement, purification et identification des souches responsables de pathologies infectieuses, une étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries est indispensable qui a pour but :

- ✓ De guider le clinicien dans le choix des antibiotiques
- ✓ La surveillance en continue de l'évolution de la résistance bactériennes aux antibiotiques.
- ✓ Outil supplémentaire de l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

L'antibiogramme standard est une technique in vitro d'étude de la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques par diffusion sur milieux gélosé. Technique s'effectue au moyen de méthodes hautement standardisées afin d'assurer la qualité de l'investigation et de garantir la comparabilité et la reproductibilité. Les deux comités : Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (**EUCAST**) et l'Institut américain pour les standards cliniques et de laboratoire (**CLSI**) fixent des lignes directrices correspondantes.

1. La technique de diffusion sur gélose (Antibiogramme standard) :

Une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle convient pour la majorité des bactéries pathogènes ; elle permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier. Comme la plupart des techniques de diffusion en gélose, la méthode est standardisée :

- ✓ Densité bactérienne
- ✓ Un disque avec une quantité définie d'un antibiotique
- ✓ Composition et épaisseur du milieu de culture,
- ✓ Température d'incubation,
- ✓ Durée d'incubation.

Techniques décrite doit être suivie sans aucune modification. Le diamètre en millimètres de la zone d'inhibition renseigne sur la sensibilité à l'antibiotique.

2. Matériel & Méthodes :

2.1. Milieu de culture

Gélose Mueller-Hinton (MH) est employée pour les bactéries autres que celles à croissance lente. Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes. La Gélose MH-F additionnée de 5% de sang de cheval défibriné et de 20 mg/L de β -NAD, est employée pour *Streptococcus* spp. dont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella* sp., *Corynebacterium* et autres bactéries à Croissance lente.). Le milieu (MH) :

- ✓ Ne doit pas contenir des inhibiteurs des antibiotiques.
- ✓ Teneur ionique (Ca^{2+} , Mg^{2+}) doit être contrôlée, car excès de cations bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) inhibent l'action des polymyxines.
- ✓ Un pH compris entre 7,2 et 7,4.
- ✓ Epaisseur bien déterminé (de 4 mm $\pm$ 0.5 mm), pour ne pas influencer la diffusion des antibiotiques à partir des disques chargés.



Figure 10. Milieu Mueller-Hinton (MH)

2.2. Préparation de l'inoculum

La suspension bactérienne doit être préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune, pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland, ce qui correspond à un inoculum d'environ 1 à 2 $\times 10^8$ UFC/ML. La suspension bactérienne est standardisée à l'aide du témoin 0,5 McFarland. Il est recommandé d'employer un spectrophotomètre pour ajuster l'inoculum. On peut également comparer à l'œil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland.

Tableau 02. Préparation de l'étalon de turbidité 0,5 McFarland

1	Ajouter 0,5 mL d'une solution à 0,048 mol/L de BaCl_2 (1,175% p/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à 99,5 mL d'une solution 0,18 mol/L (0,36 N) de H_2SO_4 (1% v/v) et agiter vigoureusement.
2	Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et des cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13.
3	Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.
4	Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
5	Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un Vortex.
6	Renouveler l'étalon ou vérifier son absorbance après 6 mois de conservation.
7	Il convient de vérifier les étalons achetés dans le commerce en s'assurant que l'absorbance se situe dans les limites fixées.

**Figure 11.** Etalon de turbidité 0,5 McFarland

2.3. Inoculation de la gélose Mueller-Hinton

L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

- ✓ Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube pour éviter une sur-inoculation des boîtes.
- ✓ Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions.

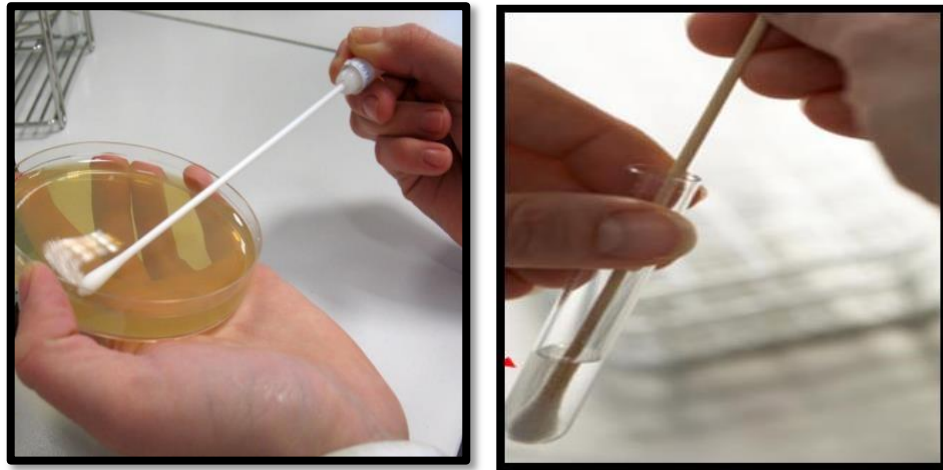


Figure 12. Écouvillon imbibé dans la suspension bactérienne et étaler sur la surface du Milieu MH

2.4. Dépôt des disques d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose inoculée et séchée. Une fois déposés ILS ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide. Le nombre de disques déposés par boîte est limité du fait du chevauchement des zones d'inhibition et pour limiter les interférences entre les antibiotiques. Un maximum de six disques convient pour les boîtes de 90 mm de diamètre, douze (ou seize) pour celles de 150 mm de diamètre et seize pour les boîtes carrées de 120 mm.



Figure 13. Distributeur de disques d'antibiotique sur la surface de milieu MH

Tableaux 03. Liste des antibiotiques à tester sur les enterobactéries, les *Pseudomonas* et les *Staphylococcus*

Enterobacterie	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Liste standard Ampicilline ou Amoxicilline Amoxicilline-acide clavulanique Ticarcilline Ticarcilline-acide clavulanique ¹ Témocilline ¹ Pipéracilline Pipéracilline-tazobactam Cefadroxil ou céfalexine Céfoxitine Céfotaxime ou ceftriaxone Ceftazidime Céfépime Céfixime Imipénème ou méropénème Ertapénème Amikacine Gentamicine Acide nalidixique Lévofoxacine Ciprofloxacine Triméthoprim Cotrimoxazole Nitrofurantoïnes Fosfomycine	Liste standard Ticarcilline Ticarcilline-acide clavulanique Pipéracilline Pipéracilline-tazobactam Ceftazidime Céfépime Ceftolozane-tazobactam Imipénème Méropénème Tobramycine Amikacine Ciprofloxacine Aztréonam Gentamicine	Liste standard Céfoxitine (dépistage) Gentamicine Erythromycine Clindamycine Quinupristine-dalfopristine Norfloxacine (dépistage) Fluoroquinolone Linézolide Acide fusidique Cotrimoxazole Rifampicine

2.5. Incubation des boîtes de Pétri

Les milieux MH inoculés sont incubés idéalement dans les 15 min. qui suivent le dépôt des disques, Incuber les boîtes à une température et atmosphère appropriés. Il est possible d'effectuer la lecture après 16 à 24 h et on peut aller à 48h et 72h pour certaines espèces.

Tableau 04. Conditions d'incubation des bactéries

Organisme	Conditions d'incubation
<i>Enterobacterales</i>	35±2°C en aérobiose 16 à 24 h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35±2°C en aérobiose 16 à 24 h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±2°C en aérobiose 16 à 24 h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35±2°C en aérobiose 16 à 24 h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35±2°C en aérobiose 16 à 24 h
<i>Enterococcus</i> spp.	35±2°C en aérobiose 16 à 24 h (35±2°C en aérobiose 24 h minimum pour les glycopeptides)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en aérobiose 16 à 24 h
Streptocoques des groupes A, B, C, G	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en aérobiose 16 à 24 h
Streptocoques du groupe viridans	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en aérobiose 16 à 24 h
<i>Haemophilus</i> spp.	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en aérobiose 16 à 24 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en aérobiose 16 à 24 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en aérobiose 16 à 24 h
<i>Pasteurella</i> sp.	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en aérobiose 16 à 24 h
<i>Campylobacter</i> sp.	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en micro-aérobiose 24 h à 48 h
<i>Helicobacter pylori</i>	35±2°C en présence de concentration proche de 5% CO ₂ en micro-aérobiose 48 à 72 h

TP. N° 03

Lecture et interprétation des résultats de l'antibiogramme standard

Objectifs :

La réalisation de l'antibiogramme standard est suivie d'une interprétation des résultats. Ces derniers doivent tout d'abord être validés par des souches de références (souche de contrôle de qualité). Par la suite on a recours à des tables de lecture choisie selon la recommandation du comité qu'on a choisie de poursuivre ces recommandations dès le départ de notre étude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme standard), Exemple : Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (**EUCAST**) et l'Institut américain pour les standards cliniques et de laboratoire (**CLSI**).

1. Lecture des boîtes après incubation

- ✓ Un inoculum et un ensemencement corrects doivent conduire à une culture confluyente. La présence de colonies isolées indique que l'inoculum est trop faible et le test est à refaire.
- ✓ La culture doit être répartie sur toute la surface de la gélose de façon à obtenir des zones d'inhibition circulaires.
- ✓ Vérifier que les diamètres des zones d'inhibition sont dans les limites du contrôle de qualité.
- ✓ La bordure de la zone d'inhibition doit être lue à l'œil nu et au niveau de la complète inhibition de la culture ; la boîte étant placée à 30 cm de l'œil.
- ✓ Mesurer les diamètres des zones d'inhibition au millimètre le plus proche avec une règle, un pied à coulisse ou un système de lecture automatisé.
- ✓ Interpréter les diamètres des zones d'inhibition par référence aux tableaux où figurent les diamètres critiques (EUCAST ; CLSI).

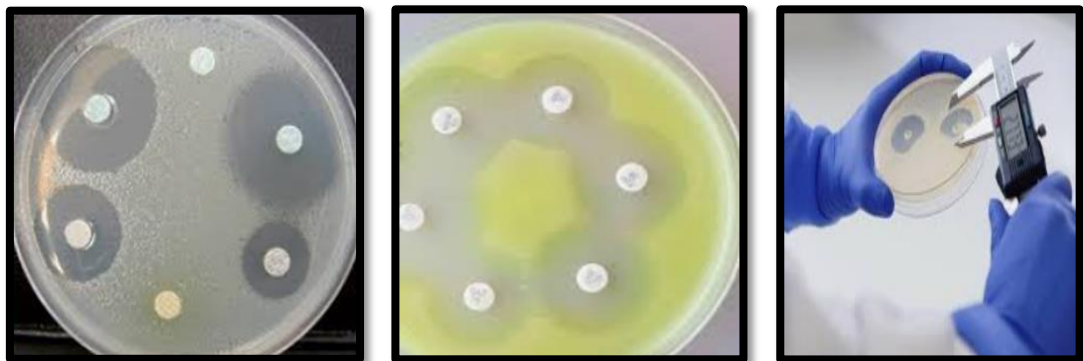


Figure 14. Mesure des diamètres des zones d'inhibition

2. Contrôle de qualité (validation de test)

Des souches du contrôle de qualité pour apprécier la performance globale du test. Les souches recommandées sont des souches sensibles, mais des souches résistantes peuvent être également employées pour confirmer que la méthode détecte un mécanisme de résistance connu.

Tableau 05. Souches de contrôle de qualité ATCC

Organisme	Caractéristiques de la souche	Référencement ATCC	Référencement dans les autres collections
<i>Escherichia coli</i>	Sensible	ATCC 25922	NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434
	β -lactamase TEM-1	ATCC 35218	NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5923 CCUG 30600 CECT 943
	<i>mcr-1</i> positive		NCTC 13846
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BLSE (SHV-18)	ATCC 700603	NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensible	ATCC 27853	NCTC 12903 CIP 76110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108
<i>Staphylococcus aureus</i>	Faible production de β -lactamase	ATCC 29213	NCTC 12973 CIP 103429 DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794
	Hétérorésistante à l'oxacilline, <i>mecA</i>		NCTC 12493

Tableau 06. Diamètres et CMI critique de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Antibiotiques	CMI (mg/L)		Charge du disque	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Cible	Limites acceptables		Cible	Limites acceptables
Acide fusidique	0,125	0,06-0,25	10	29	26-32
Amikacine	2	1-4	30	21	18-24
Ampicilline	-	-	2	18	15-21
Amoxicilline-acide clavulanique ¹⁻²	Note ¹⁻²	Note ¹⁻²	2 / 1	22	19-25
Azithromycine	1	0,5-2	-	-	-
Céfoxitine	2	1-4	30	27	24-30
Ceftaroline	0,25	0,125-0,5	5	27	24-30
Ceftobiprole	0,25-0,5	0,125-1	5	25	22-28
Chloramphénicol	4-8	2-16	30	24	20-28
Ciprofloxacine	0,25	0,125-0,5	5	24	21-27
Clarithromycine	0,25	0,125-0,5	-	-	-
Clindamycine	0,125	0,06-0,25	2	26	23-29
Dalbavancine	0,06	0,03-0,125	-	-	-
Daptomycine	0,25-0,5	0,125-1	-	-	-
Doxycycline	0,25	0,125-0,5	-	-	-

Tableau 07. Diamètres et CMI critique d'*Escherichia coli* ATCC 25922

Antibiotiques	CMI (mg/L)		Charge du disque	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Cible	Limites acceptables		Cible	Limites acceptables
Acide nalidixique	2	1-4	30	25	22-28
Amikacine	1-2	0,5-4	30	22-23	19-26
Amoxicilline	4	2-8	20	21	18-24
Amoxicilline-acide clavulanique ^{1,4}	4	2-8	20/10	21	18-24
Ampicilline	4	2-8	10	18-19	15-22
Ampicilline-sulbactam ^{2,4}	2	1-4	10/10	21-22	19-24
Aztréonam	0,125	0,06-0,25	30	32	28-36
Céfadroxil	-	-	30	17	14-20
Céfalexine	8	4-16	30	18	15-21
Céfépime	0,03-0,06	0,016-0,125	30	34	31-37
Céfixime	0,5	0,25-1	5	23	20-26
Céfotaxime	0,06	0,03-0,125	5	28	25-31
Céfoxitine	4	2-8	30	26	23-29
Cefpodoxime	0,5	0,25-1	10	25-26	23-28
Ceftaroline	0,06	0,03-0,125	5	27	24-30
Ceftazidime	0,125-0,25	0,06-0,5	10	26	23-29
Ceftazidime-avibactam ^{4,6}	0,125-0,25	0,06-0,5	10-4	27	24-30
Ceftibutene	0,25	0,125-0,5	30	31	27-35
Ceftobiprole	0,06	0,03-0,125	5	28	25-31
Ceftolozane-tazobactam ^{3,4,5}	0,25	0,125-0,5	30/10	28	24-32

Tableau 08. Diamètres et CMI critique de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Antibiotiques	CMI (mg/L)		Charge du disque	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Cible	Limites acceptables		Cible	Limites acceptables
Amikacine	2	1-4	30	22	18-26
Aztréonam	4	2-8	30	26	23-29
Céfépime	1-2	0,5-4	30	28	25-31
Ceftazidime	2	1-4	10	24	21-27
Ceftazidime-avibactam ^{3,5}	1-2	0,5-4	10-4	24	21-27
Ceftolozane-tazobactam ^{1,3,4}	0,5	0,25-1	30/10	28	25-31
Ciprofloxacine	0,5	0,25-1	5	29	25-33
Colistine ⁸	1-2	0,5-4	-	-	-
Doripénème	0,25	0,125-0,5	10	31-32	28-35
Fosfomycine	4	2-8	-	-	-
Gentamicine	1	0,5-2	10	20	17-23
Imipénème	2	1-4	10	24	20-28
Lévofloxacine	1-2	0,5-4	5	22-23	19-26
Méropénème	0,5	0,25-1	10	30	27-33
Netilmicine	2	0,5-8	10	18	15-21
Pipéracilline	2-4	1-8	-	-	-
Pipéracilline-tazobactam ^{1,3,4}	2-4	1-8	30/6	26	23-29
Ticarcilline	16	8-32	-	-	-
Ticarcilline-acide clavulanique ^{2,4}	16	8-32	75/10	24	20-28
Tobramycine	0,5	0,25-1	10	23	20-26

- ✓ Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

1. Souches sensibles(S) : (Souches sensibles à posologie standard): les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte en utilisant un schéma thérapeutique standard (posologie standard). (CMI < ou égale à la concentration basse, diamètre de la zone d'inhibition < ou égale au diamètre critique bas).

2. Souches résistantes (R) : les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique même après une exposition accrue de la bactérie en augmentant la dose d'antibiotique à administré : (CMI > à la concentration critique haute. de la zone d'inhibition > au diamètre critique haut).

Souches intermédiaires (I) : (sensible à forte posologie) : les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles la CMI mesurée est supérieure à la concentration critique

basse et inférieure ou égale à la concentration critique haute ; Diamètre de la zone d'inhibition > diamètre critique bas et inférieure ou égale au diamètre critique haut). La probabilité de succès thérapeutique est forte uniquement, en augmentant l'exposition de la bactérie à l'antibiotique, grâce à utilisation de forte posologie « Sensible à forte posologie ».

EUCAST : utilise deux catégories **S** et **R**

CLSI : utilise trois catégories **S** et **R** et **I**

Tableau 09. Table d'interprétation EUCAST (catégories **(S)** et **(R)**)

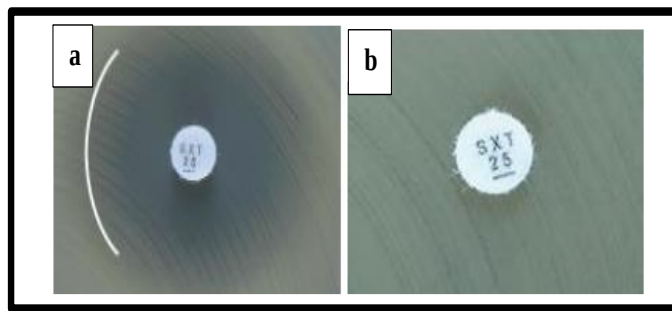
Macrolides, lincosamides et streptogramines	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Erythromycine	1 ¹	2 ¹	15	21 ^A	18 ^A
Azithromycine	1 ¹	2 ¹		Note ^A	Note ^A
Clarithromycine	1 ¹	2 ¹		Note ^A	Note ^A
Roxithromycine	1 ¹	2 ¹		Note ^A	Note ^A
Télithromycine	IE	IE		IE	IE
Clindamycine²	0,25	0,5	2	22 ^B	19 ^B
Lincomycine	2	8		EP	EP
Quinupristine-dalfopristine	1	2	15	21 ^C	18 ^C
Pristinamycine	1	2		EP	EP

Tableau 10. Table d'interprétation CLSI (catégories (S), (I) et (R))

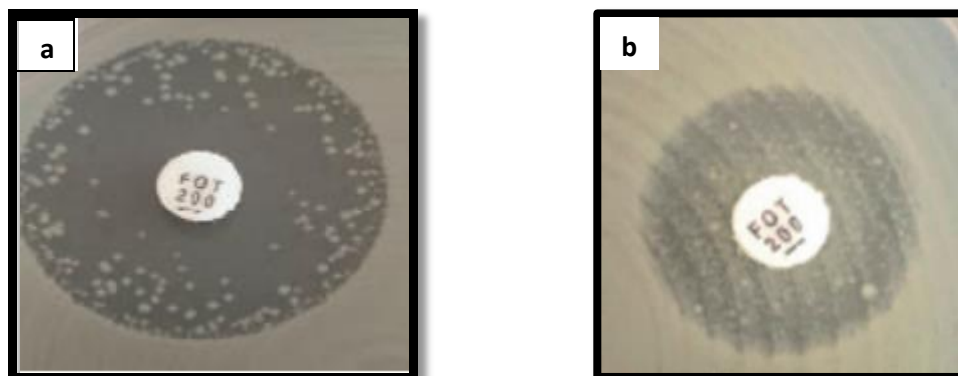
Test/ Report Group	Antimicrobial Agent	Staphylococcus spp. Indications	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL				Comments
				SD		I	R	S	SDD	I	R	
				S	D							
MACROLIDES												
(26) Not routinely reported on organisms isolated from the urinary tract.												
A	Azithromycin	All staphylococci	15 µg	≥18	–	14–17	≤13	≤2	–	4	≥8	
A	clarithromycin		15 µg	≥18	–	14–17	≤13	≤2	–	4	≥8	
A	erythromycin		15 µg	≥23	–	14–22	≤13	≤0.5	–	1–4	≥8	
O	Dirithromycin		15 µg	≥19	–	16–18	≤15	≤2	–	4	≥8	
TETRACYCLINES												
(27) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.												
B	Tetracycline	All staphylococci	30 µg	≥19	–	15–18	≤14	≤4	–	8	≥16	
B	Doxycycline		30 µg	≥16	–	13–15	≤12	≤4	–	8	≥16	
B	Minocycline		30 µg	≥19	–	15–18	≤14	≤4	–	8	≥16	See comment (26).
FLUOROQUINOLONES												
(28) Staphylococcus spp. may develop resistance during prolonged therapy with quinolones. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within 3 to 4 days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.												
C	Ciprofloxacin	All staphylococci	5 µg	≥21	–	16–20	≤15	≤1	–	2	≥4	
C	Levofloxacin		5 µg	≥19	–	16–18	≤15	≤1	–	2	≥4	
C	Moxifloxacin		5 µg	≥24	–	21–23	≤20	≤0.5	–	1	≥2	
O	Enoxacin		10 µg	≥18	–	15–17	≤14	≤2	–	4	≥8	(29) For testing and reporting of urinary tract isolates only.
O	Gatifloxacin		5 µg	≥23	–	20–22	≤19	≤0.5	–	1	≥2	
O	Grepafloxacin		5 µg	≥18	–	15–17	≤14	≤1	–	2	≥4	
O	Lomefloxacin		10 µg	≥22	–	19–21	≤18	≤2	–	4	≥8	
O	Norfloxacin		10 µg	≥17	–	13–16	≤12	≤4	–	8	≥16	See comment (29).
O	Ofloxacin		5 µg	≥18	–	15–17	≤14	≤1	–	2	≥4	
O	Sparfloxacin		5 µg	≥19	–	16–18	≤15	≤0.5	–	1	≥2	
Inv.	Fleroxacin		5 µg	≥19	–	16–18	≤15	≤2	–	4	≥8	
NITROFURANTOINS												
U	Nitrofurantoin	All staphylococci	300 µg	≥17	–	15–16	≤14	≤32	–	64	≥128	

✓ **Lecture interprétative de l'antibiogramme standard**

- Le **triméthoprime-sulfaméthoxazole**, un antagonisme, dû au milieu, peut conduire à des colonies minuscules autour du disque. Ce type de culture doit être ignoré et le diamètre de la zone d'inhibition mesuré là où la bordure est nette.



- a)** Une zone plus grande est visible autour du disque. Considérer la souche «sensible» si le diamètre ≥ 16 mm.
- b)** Culture au contact du disque, pas de zone d'inhibition visible. Rendre la souche «résistante».
- La fosfomycine, la présence de colonies dans la zone d'inhibition ne doit pas être prise compte.



- a)** Ignorer les colonies dans la zone d'inhibition et lire le diamètre externe.
- b)** Rapporter comme absence de diamètre d'inhibition

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Sanders E.R. 2012.** Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*. 63(63) : e3064.
2. **Morton H.E., Pulaski E.J. 1938.** The Preservation of Bacterial Cultures. I. *Journal of Bacteriology*. 35(2) : 163–183.
3. **Madigan M.T., Bender K.S., Buckley D.H., Sattley W.M., Stahl D.A. 2021.** *Brock Biology of Microorganisms*. 16e éd. Pearson Education.
4. **Willey J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. 2020.** *Prescott's Microbiology*. 11e éd. McGraw-Hill Education.
5. **Cappuccino J.G., Welsh C.T. 2018.** *Microbiology: A Laboratory Manual*. 12e éd. Pearson.
6. **Jorgensen J.H., Ferraro M.J. 2009.** Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*. 49(11) : 1749–1755.
7. **Hombach M., Bloemberg G.V., Bottger E.C. 2012.** Effects of clinical breakpoint changes in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 25(2) : 318–334.
8. **Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. 2016.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2) : 71–79.
9. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2024.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100. Wayne, Pennsylvania, USA.
10. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2025.** Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version en vigueur. Växjö, Sweden.
11. **Patel J.B., Cockerill F.R., Bradford P.A., et al. 2015.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 25th Informational Supplement.
12. **Doern G.V. 2011.** The clinical predictive value (or lack thereof) of the results of in vitro antimicrobial susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(9 Suppl.) : S11–S14.