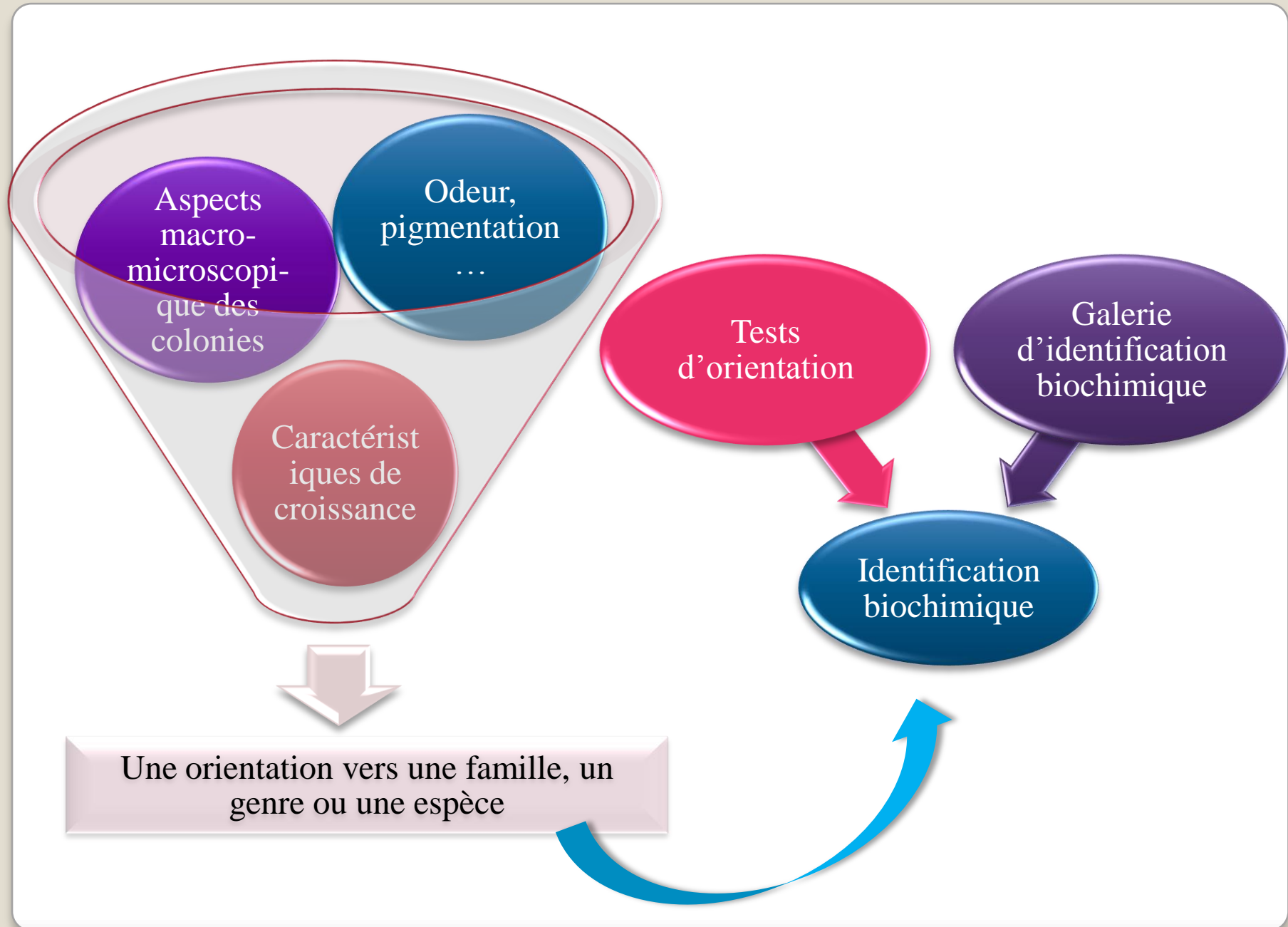


## Chapitre 2 : Les techniques analytiques de laboratoire médical relevant de la microbiologie/ bactériologie.

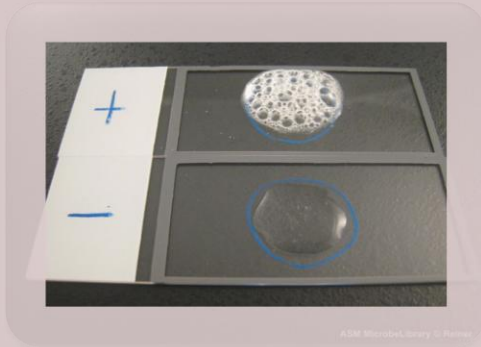
- I. les principes liés aux différentes techniques de stérilisation applicables à la microbiologie
- II. Techniques d'examen microscopique
- III. Utilisation des milieux de cultures
- IV. Identification biochimique
- V. Les antibiotiques et l'antibiogrammes



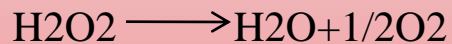


# Tests biochimiques d'orientation

## Tests du métabolisme respiratoire

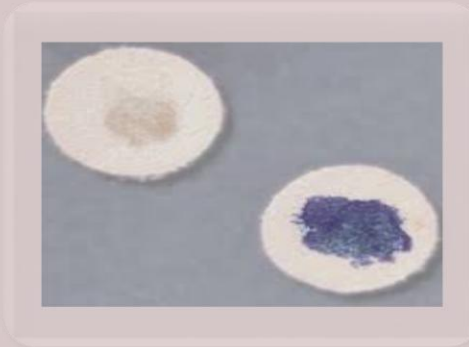


### Recherche de la **catalase**



Une libération d'O<sub>2</sub>  
gazeux

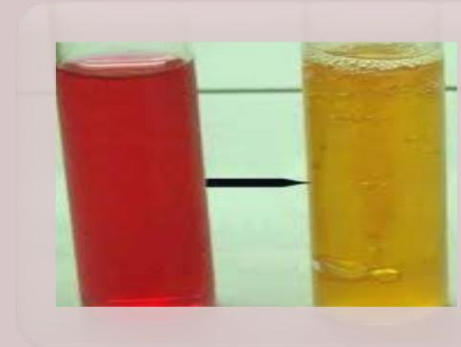
(recherchée chez les  
Gram+)



### Recherche de la **cytochrome oxydase**

Disque imprégné d'un réactif (chlorhydrate de diméthylparaphénylène diamine) qui donne un semi quinone de couleur violette en présence de l'enzyme.

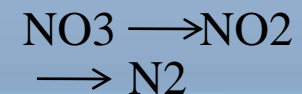
(chez les Gram-)



### Recherche de la **Nitrate réductase NR**

\*Méthode classique  
(milieu > Mannitol-  
mobilité-nitrate)

\*Galerie  
biochimique (Glu)

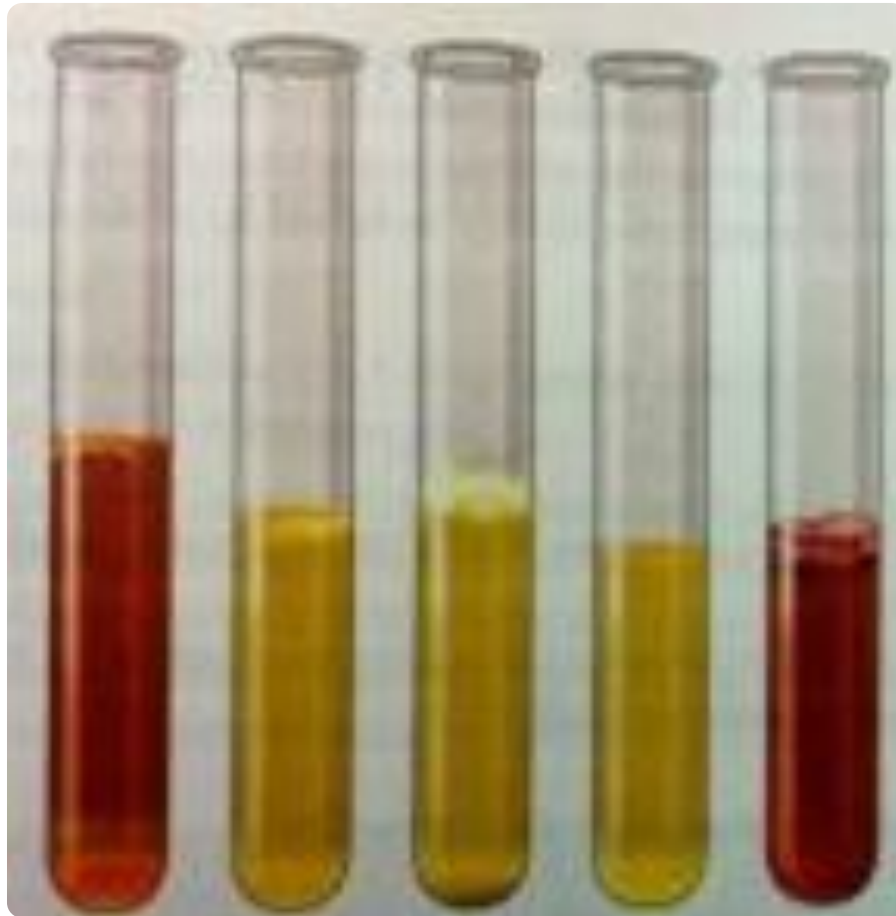


# Nitrate réductase NR

## En tube

Ajout du réactif de Griess  
Ou N1 (acide sulfnilique)  
+N2 ( $\alpha$ -naphtylamine)

Coloration de la pente du milieu	Produit formé	Test nitrate-réductases = NR <sup>1</sup>
Rouge (après une minute environ)	NO <sub>2</sub>	NR + Entérobactéries <sup>1</sup> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Vibrionaceae</i> <sup>2</sup> ...
Si incolore, rajouter un peu de poudre de zinc dans le tube de culture, laisser sédimenter sans agiter ; observer après 1 à 2 minutes	Coloration rose au voisinage de la poudre de zinc : présence de NO <sub>2</sub> , par réduction chimique des nitrates en nitrites par le zinc	NR – <i>Ps. putida</i> , <i>Neisseria</i> <sup>2</sup> ...
	Incolore : nitrates complètement réduits au-delà du « stade des nitrites » en N <sub>2</sub> ; présence de bulles gazeuses dans la culture témoignant de la réduction des nitrates en azote gazeux N <sub>2</sub>	NR + <i>Ps. aeruginosa</i> ...



**A**

1

2(+Zn)

1

2 (+Zn)

**B**

**C**

- A. Positif (rouge après l'addition du réactif : présence du nitrite  $\text{NO}_2$ )
- B. Positif (incolore après l'addition de la poudre du zinc: présence du nitrite  $\text{N}_2$  gazeux)
- C. Négatif: rouge après l'addition du Zinc: présence du nitrite  $\text{NO}_2$  réduit par le zinc mais pas par la nitrate réductase)

**Interprétation du test**

## Tests biochimiques d'orientation

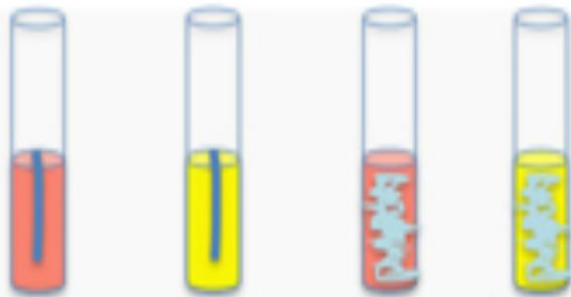
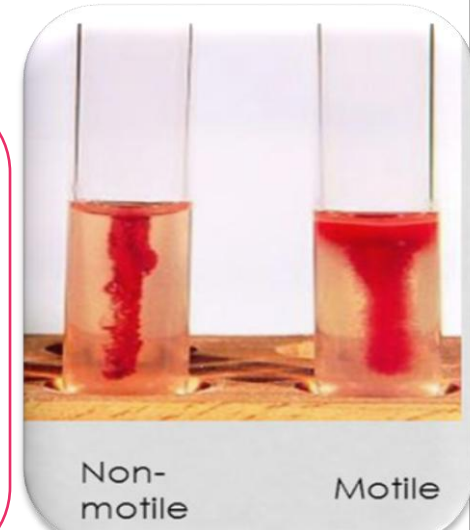
### Tests de coagulase libre *Staphylococcus* sp.

Le bouillon ensemencé par le staphylocoque à tester, incubé 18 heures à 37°C, est mis en contact volume à volume avec du plasma de lapin oxalaté pendant au moins 30 min à 37°C.



### Tests de mobilité Milieu mannitol-mobilité

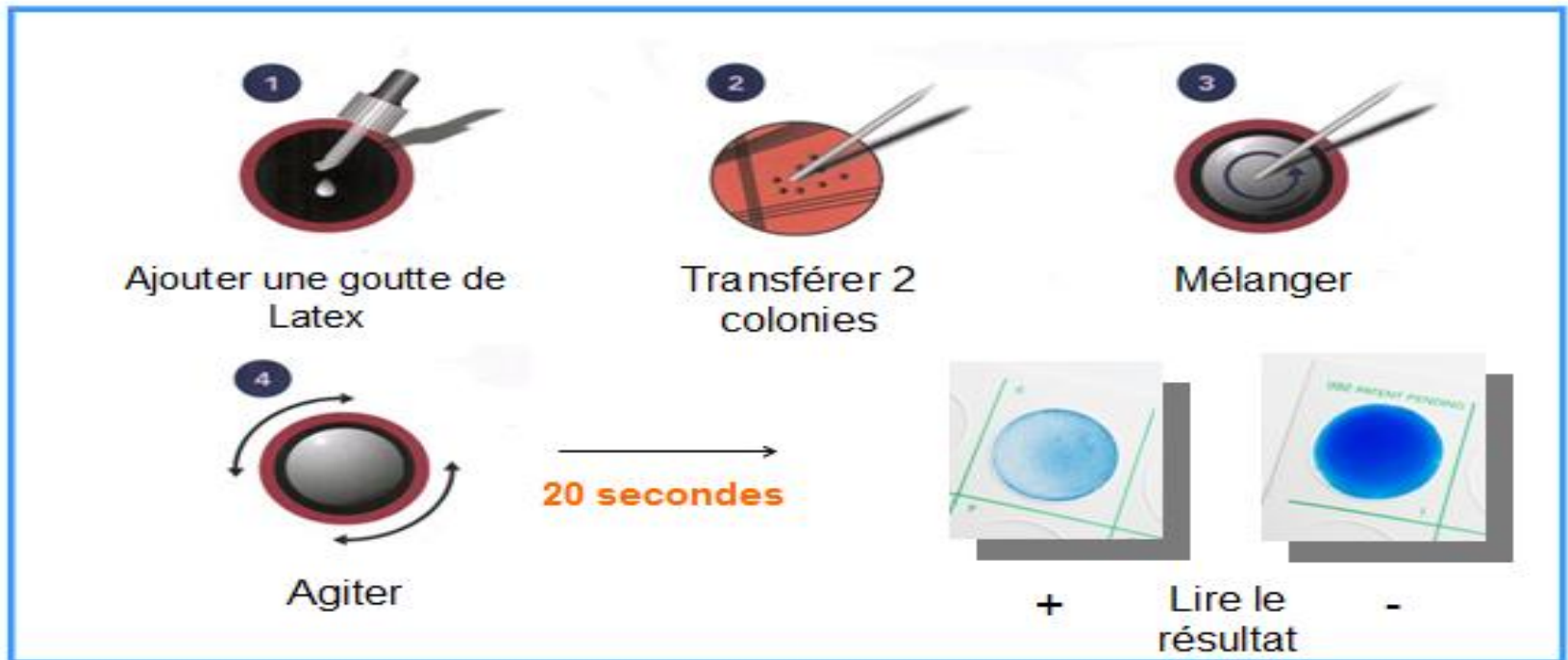
Milieu semi-solide ensemencé par une pique centrale. La mobilité est définie par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la pique



Immuable et non fermentant    Immuable et fermentant    mobile et non fermentant    mobile et fermentant

Test d'agglutination

Ce test est basé sur l'utilisation d'hématies ou de particules de latex sensibilisées avec des anticorps spécifiques du pathogène recherché (fibrinogène, protéine A, antigène capsulaire pour *S. aureus*) (Polyosides C pour streptocoques bêta-hémolytique)



# Galleries d'identification biochimique

Milieux en tube .Galerie classique

Galerie Api  
Microgalerie biochimique

Automate d'identification

Galleries API	Nombre de tests biochimiques	Temps d'incubation en heures	Bactéries identifiées
API® 20 A	20 <u>Microtubes</u>	24	Bactéries anaérobies : <i>Clostridium...</i>
Rapid ID 32 A2	29 <u>Substrats déshydratés</u> <u>Cupules</u>	4	
API® 20 NE	20	24	Bacilles Gram – non entérobactéries et non fastidieux
API® 50 CH <sup>1</sup>	50 cupules 49 sucres	24 à 48	<i>Bacillus</i> et apparentés...
ID 32 GN <sup>2</sup>	32	24	Entérobactéries et autres bacilles à Gram – ( <i>Pseudomonas...</i> )
API® Campy	20	24	<i>Campylobacter...</i>
API 10 S	11	18 à 24	<i>Enterobacteriaceae</i> et autres bacilles à Gram – non fastidieux
API 20 E™	21	18 à 24	



Rapid 20E®	20	4	<i>Enterobacteriaceae</i>
ID 32 E <sup>2</sup>	32	24	<i>Enterobacteriaceae</i> et autres bacilles à Gram – non fastidieux
Rapid ID 32 E <sup>2</sup>	32	4	<i>Enterobacteriaceae</i>
API® 20 C AUX	20 cupules 19 tests	48 à 72	Levures
ID 32 C <sup>2</sup>	32	24	
API® <i>Candida</i>	12	18 à 24	<i>Candida</i> (levures)
API® <i>Listeria</i>	10	18 à 24	<i>Listeria</i>
API® Staph	20		Staphylocoques, microcoques et germes apparentés
ID 32 Staph <sup>2</sup>	32 cupules 26 tests	24	Staphylocoques, microcoques et ex-microcoques
API® 20 Strep	20	4 puis 24	<i>Streptococcaceae</i> et germes apparentés
Rapid ID 32 Strep <sup>2</sup>	32	4	

Les tests  
(colorimétrique ou  
turbidimétrique)

une croissance  
bactérienne  
associée à une  
étude de  
métabolisme

Une activité  
enzymatique sans  
multiplication  
bactérienne

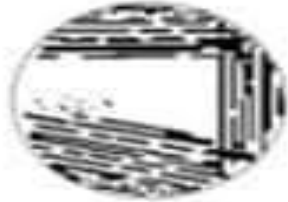
Des appareils de lecture permettant  
de faire bénéficier l'utilisateur de  
logiciels d'interprétation de  
l'identification

Une fiche technique complète est  
fournie



Le principe, la présentation du  
matériel, précaution d'utilisation,  
échantillons, mode opératoire

Api système –  
Exemple Api 20 E



1 colonie  
(ou plusieurs si petites)

opacité : 0,5 Mac Farland

Un étalon fournie en ampoules (solutions de sulfate de baryum)=> estimation de la densité des suspensions

La préparation d'une suspension d'opacité déterminée de la souche pure à identifier

API NaCl 0.85 % Medium 5 mL

Inoculation manuelle



api 20 E



- [ CIT ]  
- [ VP ]  
- [ GEL ]

ADH → ODC  
H<sub>2</sub>S - URE

l'humidité

18:00-24:00 / 48:00



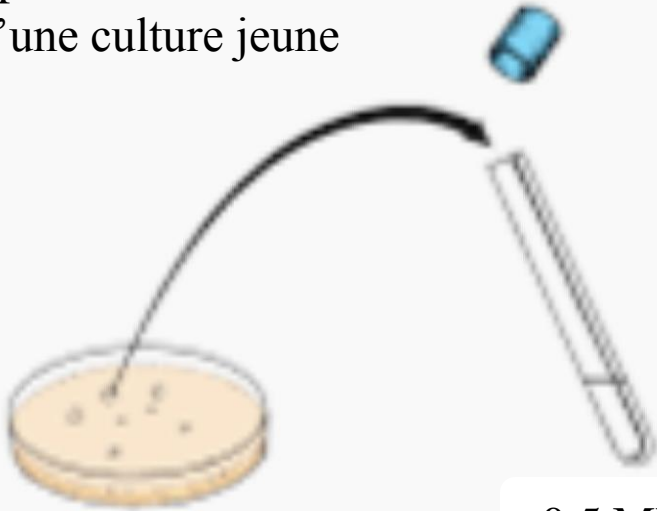
36°C  
±  
2°C

Instruction de remplissage de microtubes (Tube et cupule)



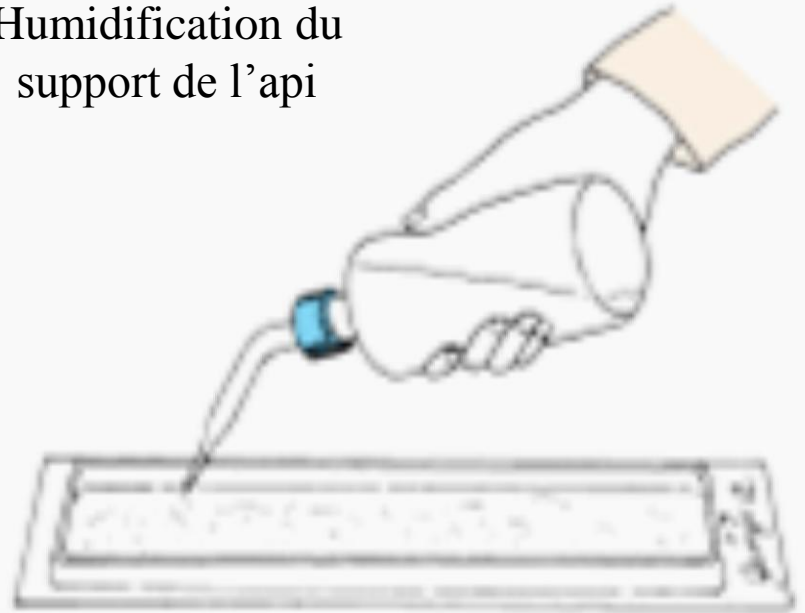
api 20 E

Suspension bactérienne  
d'une culture jeune

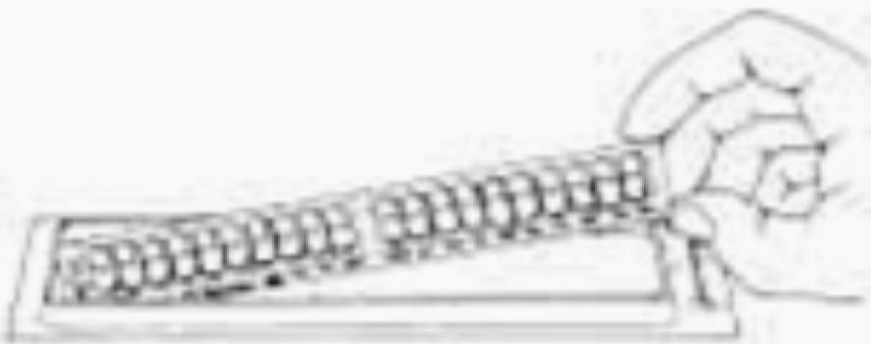


0.5 MF

Humidification du  
support de l'api



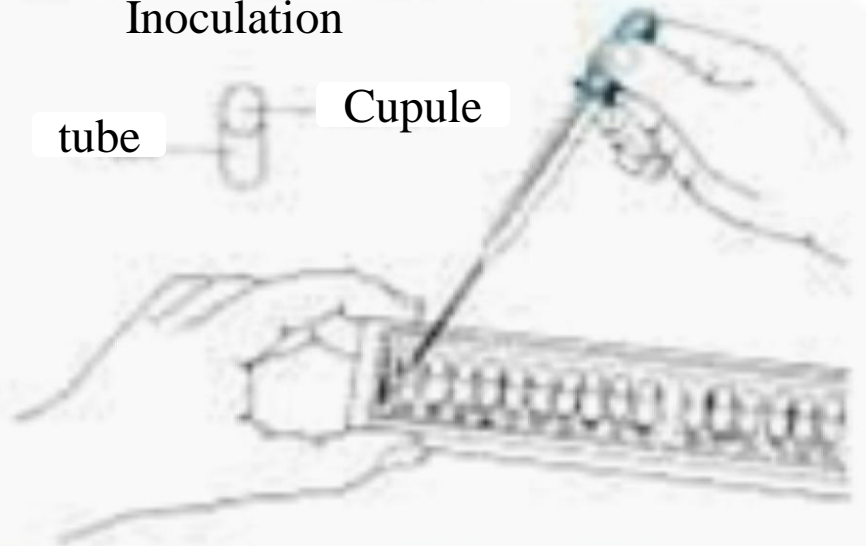
Dépôt de la galerie sur  
son support humidifié



Inoculation

tube

Cupule



# L'inoculation

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ouverte, **pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté** pour éviter la formation de bulles



Pour certains caractères:



Remplir de suspension le tube **et la cupule**  
Pour les tests :

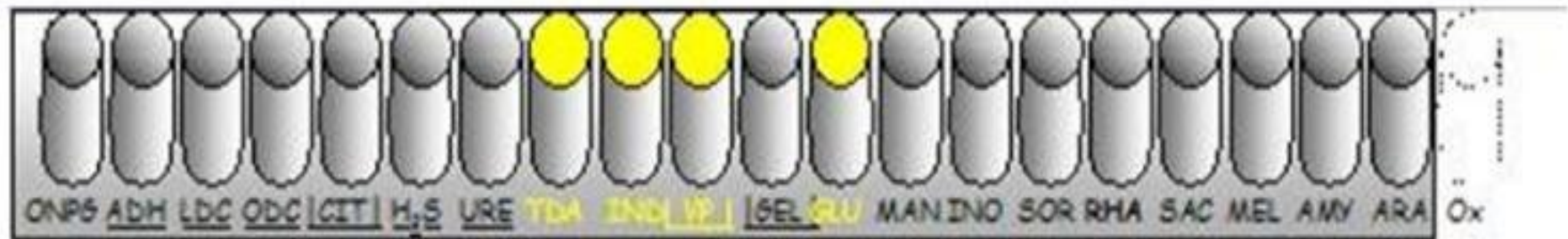
**CIT | VP | GEL**



Remplir le tube de suspension puis **recouvrir**  
d'huile de paraffine

Pour les tests **ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE**

Après 24h d'incubation à 37°C, dans quelles cupules doit-on rajouter des réactifs?

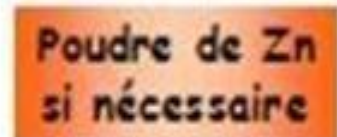


Recherche de la TDA

Recherche La production d'indole

Voie fermentative butane-diol

Recherche de la nitrate réductase



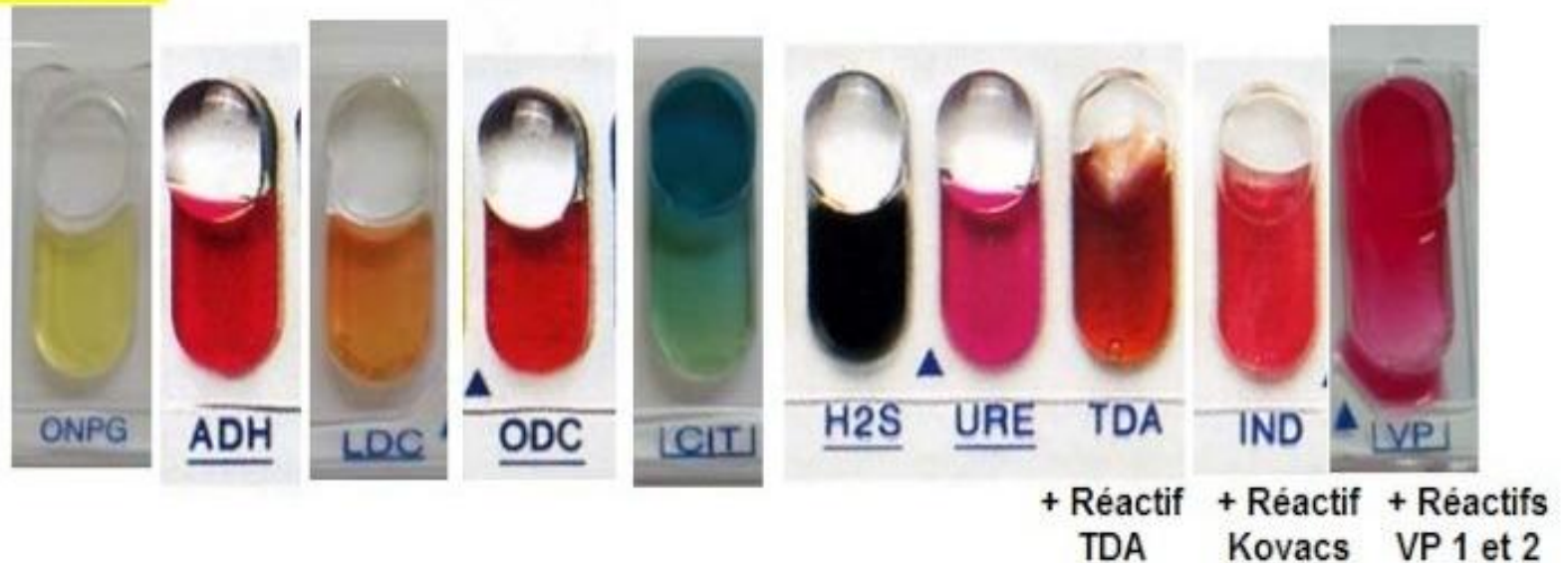
Lecture de la galerie

## Les 10 premiers tests

### Tests négatifs

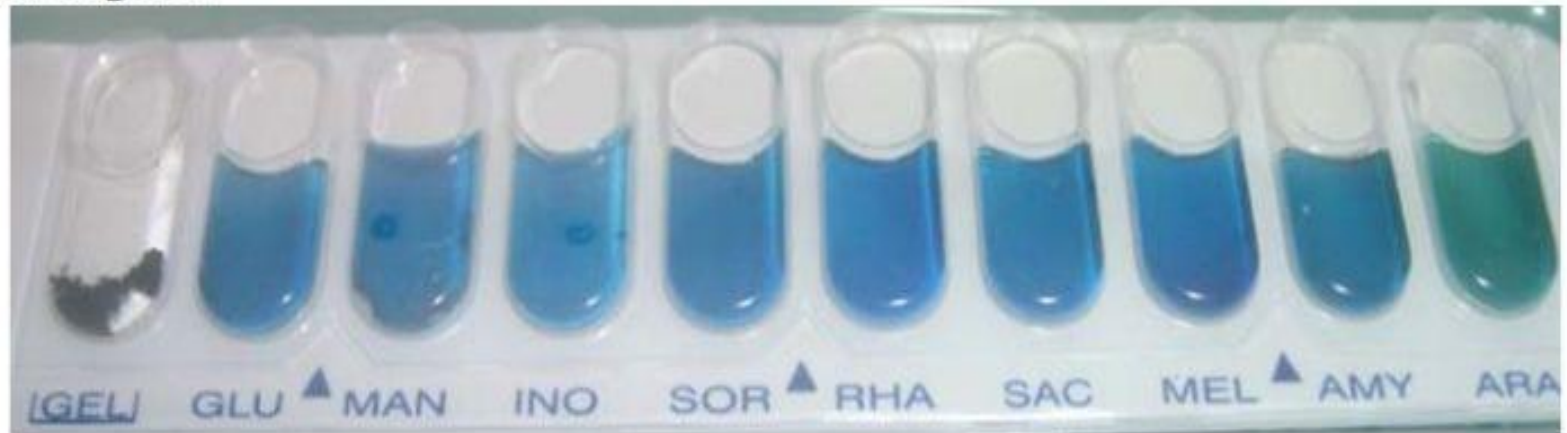


### Tests positifs



## Les 10 derniers tests

### Tests négatifs



### Tests positifs

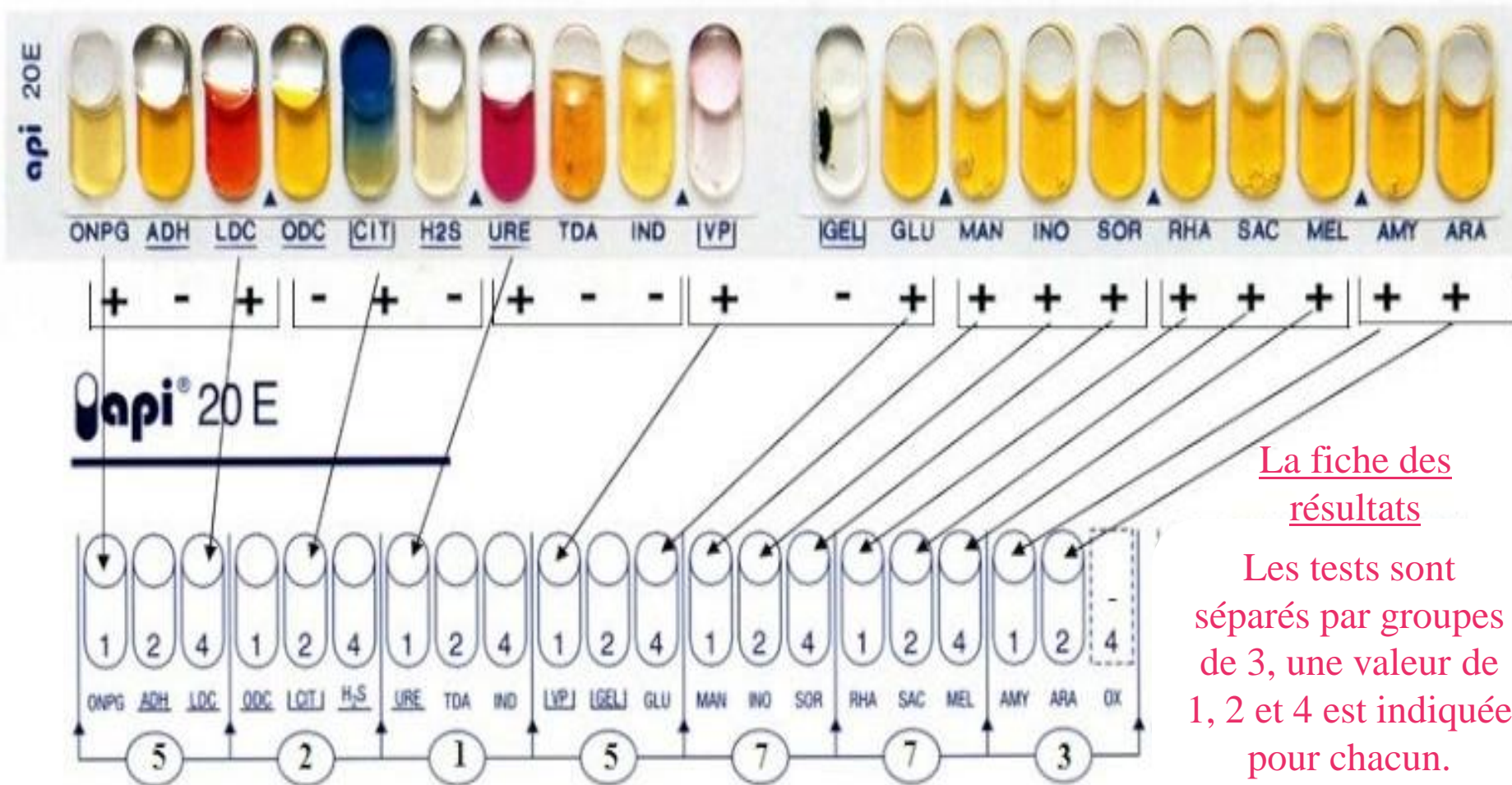


Après ajout des réactifs Nit 1 et Nit 2 : lecture de la NR (ici NR +)



# TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E

Microtube	Substrat:	Caractère recherché :	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Beta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S		Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter une goutte de réactif Kovacs	 	 
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes		 
[GEL]	Gélatine	gélatinase		Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Nitrate réductase		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement		



La fiche des résultats

Les tests sont séparés par groupes de 3, une valeur de 1, 2 et 4 est indiquée pour chacun.

Résultats reportés sur la fiche d'identification

<p>Code n°: 5 215 773 (55)</p> <p><u>Profile numérique à 7 chiffres</u></p>	<p>Ident. Les résultats sont toujours exprimés en % de positif</p>
---	--

Un service Apiweb TM, logiciel d'identification est proposé sur le site apiweb biomerieux

ou

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

**Question du Chapitre 2 partie 4:**

**Donner le mode d'utilisation de la galerie biochimique classique**