

FICHES TECHNIQUES TP L3

COLORATION DE GRAM : à partir d'une colonie dissociée dans une très petite goutte d'eau

COLORATION DE GRAM : à partir d'un bouillon : Déposer 1 goutte de bouillon non dilué

Réaliser un frottis sur une lame :

Sécher lentement. Flamber à l'alcool 100° (1 ou 2 gouttes).

Recouvrir la lame de violet de gentiane (1 min.). Vider.

Recouvrir la lame de lugol (1 min.). Vider. Rincer à l'eau.

Décolorer à l'alcool 100° : recouvrir la lame 15 s. d'alcool 100°. Rincer immédiatement à l'eau.

Recommencer cette décoloration si la lame n'est pas transparente.

Recouvrir la lame d'eau. Ajouter 4 gouttes de fuchsine (1 min.). Rincer à l'eau.

Sécher en tamponnant délicatement la lame avec un papier absorbant. Marquer la lame.

EMPLOI DU MICROSCOPE

Nettoyer objectifs et oculaires au papier Joseph avant et après chaque utilisation. Ne pas coller les yeux sur les oculaires. L'objectif x 40 ne doit jamais recevoir d'huile.

- Lames colorées

Les bactéries sont tuées, fixées sur la lame et colorées.

Condensateur monté jusqu'à la lame si le microscope le permet. Diaphragme ouvert. Objectif x 100 à immersion (**avec huile**). Pour la mise au point, l'objectif trempe dans la goutte d'huile. **Nettoyer au papier Joseph** après utilisation de l'objectif.

- Etat frais

Les bactéries sont vivantes en bouillon.

Déposer une anse de bouillon entre lame et lamelle. Observer l'abondance, (la forme), le groupement et la mobilité des bactéries.

Condensateur baissé si le microscope le permet. Diaphragme fermé. Objectif x 40 à sec (**sans huile**).

Pour la mise au point, l'objectif est à environ 1 mm au-dessus de la lamelle.

TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE

- Milieux liquides

Pour tous les milieux liquides, dissocier dans le liquide une colonie prélevée avec l'anse métallique.

- ex :
- bouillon trypticase-soja (TS)
 - milieu de RM/VP (Clark et Lubs)
 - milieu urée-indole de Ferguson

- Milieux solides

- en boîtes de Petri. --> Isolement en quadrant.

- gélose TS (peptones, NaCl 5%, agar)
- milieu de Drigalski (peptone, lactose, bleu de bromothymol, cristal violet, sels biliaires, agar)
- milieu de Chapman (peptone, mannitol, rouge de phénol, NaCl 75 g/L, agar)

--> Faire une strie.

- gélose à l'ADN (peptone, ADN, NaCl 5%, agar).

- en tube.

Milieu	Ensemencement	Bouchon
mannitol-mobilité	Piqûre	fermé
viande-foie	Piqûre	entrouvert
Kliger-Hajna	strie sur la pente + piqûre du culot	entrouvert

REVELATION ET LECTURE DES MILIEUX D'IDENTIFICATION

Milieux de Drigalski et de Chapman : lire le métabolisme des sucres.

Milieu	Test	Réactif à ajouter	Lecture	
			test positif	test négatif
urée-indole	uréase indole TDA	0 Kovacs FeCl ₃	rouge anneau rose brun foncé	orange jaune, beige brun clair
Clark et Lubs	RM VP	rouge de méthyle 10 gouttes NaOH puis 10 gouttes α Naphtol	rouge rose en 10'- tube incliné	jaune jaune, beige
Gélose à l'ADN	DNase	HCl	halo clair	
Mannitol- Mobilité	Mannitol Gazogène Mobilité	0 0 0	jaune bulle épaisseur de la gélose trouble	rouge - épaisseur de la gélose limpide

TECHNIQUE DE L'ANTIBIOGRAMME PAR DIFFUSION EN GELOSE

- Protocole

Préparer la dilution suivante de manière à obtenir $\approx 10^6$ bactéries/mL :

- Entérobactérie ou Pseudomonas :

- 1 colonie dans 10 mL d'eau puis 3 gouttes de cette dilution dans 10 mL d'eau
- 1 anse de platine d'un bouillon de 18 heures dans 10 mL d'eau

- **Streptocoque** : 2 colonies dans 10 mL d'eau

- **Staphylocoque** : $\approx \frac{1}{2}$ colonie dans 10 mL d'eau

Vortexer la suspension.

Ensemencer une gélose de Mueller-Hinton (MH) préséchée par inondation puis réaspiration immédiate du surplus.

Quand la boîte est sèche, déposer à sa surface avec les distributeurs ou si nécessaire à l'aide d'une pince stérilisée par flambage des disques de papier buvard imprégnés d'antibiotique que vous espacerez de ≈ 3 cm.

Laisser la boîte 15 min. sur la pailleuse (prédiffusion de l'antibiotique).

Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

- Lecture et interprétation

Μεσυρερ λες διαμ\τρεις δ ινηβιτιον. Λες χομπαρερ αυξ διαμ\τρεις χριτιθυες. Χλασ σερ λα σουχη δανσ λ υνε δεσ 3 χατ\γοριες Σ, Ι ου Ρ πουρ χηαθυε αντιβιοτιθυε.

Ρεχηερχηερ λες σψνεργιες, λες ανταγωνισμεσ ετ λες ρεπουσσεσ δε βαχτ\ριες.

Ιντερπρ\τερ πουρ λες β-lactamines la présence et la nature de la β-lactamase (pénicillinase ou céphalosporinase ou absence de β-lactamase).

Commenter la sensibilité aux sulfamides et au triméthoprime et à l'association des 2 composés.