

MASTER 1 D'INFECTIOLOGIE (ICMV)
UE 7.2 : INTERACTIONS HOTE-MICROORGANISME

TRAVAUX PRATIQUES

ANNEE 2013 - 2014

ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE FLORES COMMENSALES (J1 à J4)

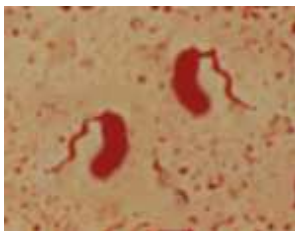
Flore cutanée humaine - Flore bucco-dentaire humaine - Flore nasale humaine

INDISPENSABLE

Blouse en coton
Feutre indélébile
Cheveux longs attachés
Polycopié lu et compris. Cours d'écologie bactérienne connus
Binôme choisi ; travail réparti

Un questionnaire de 10 à 20 questions (quizz) sera posé à J3 (exemple)

- 1) Définition de la famille des *Micrococcaceae*
- 2) Le test ONPG se fait chez les bactéries lactose +/- ?
- 3) Les entérobactéries sont nitrate réductase +/- ?
- 4) Le milieu de Drigalski est sélectif des
- 5) Dénombrement : 10 colonies pour 0,1 ml de dilution 10^{-4} correspondent àUFC/ ml.



I - ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE FLORES COMMENSALES

- Gram flore dentaire
- Flore cutanée humaine
- Flore buccale humaine
- Flore nasale humaine

J1

A. FLORE CUTANEE HUMAINE

1) Prélèvement

- Lavez vous les mains
- Frottez 5 à 6 fois 3 de vos doigts derrière votre oreille.
- Agiter ces doigts pendant 3 minutes dans une boîte de Petri contenant 5 mL d'eau stérile. Bien frotter la peau avec les ongles. Ceci constitue **l'échantillon pur P** (càd échantillon non dilué). A l'aide d'une pipette Pasteur remettez bien en suspension et transférez le contenu d'une pipette dans un tube à hémolyse (pour les étapes 3 et 4) et le contenu d'une pipette (environ 1.5 ml) dans un tube Eppendorff (pour l'étape 2).
- Evaluer en cm² la surface de peau prélevée.

2) Coloration de Gram

Centrifuger 5 min. à vitesse maximale le prélèvement pur **P**. Vider le tube par retournement au dessus du bac à Javel. Mettre le culot en suspension dans le surnageant restant à l'aide d'une micropipette et d'un cône stérile. Déposer 2 gouttes sur 2 lames. Faire une coloration de Gram sur 1 lame; conserver l'autre pour refaire la coloration si nécessaire. Estimer le % de chaque type de bactéries.

3) Dilutions en eau distillée stérile de l'échantillon pur P

Dans des tubes à hémolyse stériles, réaliser les dilutions 10⁻¹ et 10⁻² dans un volume final de 1 mL. Bien vortexer chaque tube

4) Ensemencement des milieux de culture et incubation

Prévoir 1 gélose par dilution.

Ensemencer 0.1 mL des dilutions suivantes sur les milieux suivants : vortexer la dilution avant de prélever 0.1 mL ; répartir sur la gélose puis étaler rapidement au râteau. Incuber

Milieu gélosé	Dilutions à ensemencer	Intérêt	Conditions d'incubation		
			T°	Durée	Atmosphère
TS + 5% sang de cheval	-1 -2	toutes bactéries AAF et AS	37° C	24 à 48h	air
Chapman	-1 -2	staphylocoques (microcoques)	37°C	24 à 48h	air

B - FLORE BUCCO-DENTAIRE HUMAINE

1) Prélèvement

- Avec un écouvillon stérile, frotter environ **2 cm² de la muqueuse buccale** (intérieur de la joue). Agiter l'écouvillon dans 2 mL d'eau stérile. Ceci constitue l'échantillon pur = non dilué (P)

2) Colorations de Gram

a) Frotter l'écouvillon « muqueuse » sur 2 lames. Faire une coloration de Gram sur 1 lame et conserver l'autre pour refaire la coloration si nécessaire. Estimer le % de chaque type de bactéries

b) Avec un autre écouvillon frotter une **dent du fond et la gencive l'entourant**. Frotter l'écouvillon « dent » sur 2 lames. Faire une coloration de Gram sur 1 lame et conserver l'autre pour refaire la coloration si nécessaire. Estimer le % de chaque type de bactéries et comparer avec la flore de la muqueuse.

3) Dilutions en eau distillée stérile

Dans des tubes à hémolyse stériles, réaliser les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} dans un volume final de 1 mL. Bien vortexer chaque tube

4) Ensemencement des milieux de culture et incubation

Prévoir 1 gélose par dilution.

Ensemencer 0.1 mL des dilutions suivantes sur les milieux suivants : vortexer la dilution avant de prélever 0.1 mL ; répartir sur la gélose puis étaler rapidement au râteau. Incuber

Milieu gélosé	Dilutions	Intérêt	Conditions d'incubation		
			T°	Durée	Atmosphère
TS + 5% sang de cheval	-2 -3 -4	toutes bactéries AAF et AS	37° C	24 à 48h	air
Chapman	P	staphylocoques (microcoques)	37° C	24 à 48h	air

C. FLORE NASALE HUMAINE

1) Prélèvement (muqueuse nasale)

- Avec un écouvillon stérile, frotter environ **1 cm² de la muqueuse nasale** (intérieur de la narine). Agiter l'écouvillon dans 2 mL d'eau stérile. Ceci constitue l'échantillon pur = non dilué (P)

2) Colorations de Gram

Frotter l'écouvillon « nez » sur 2 lames. Faire une coloration de Gram sur 1 lame et conserver l'autre pour refaire la coloration si nécessaire. Estimer le % de chaque type de bactéries

3) Dilutions en eau distillée stérile

Dans des tubes à hémolyse stériles, réaliser les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} dans un volume final de 1 mL. Bien vortexer chaque tube

4) Ensemencement des milieux de culture et incubation

Prévoir 1 gélose par dilution.

Ensemencer 0.1 mL des dilutions suivantes sur les milieux suivants : vortexer la dilution avant de prélever 0.1 mL ; répartir sur la gélose puis étaler rapidement au râteau. Incuber

Milieu gélosé	Dilutions	Intérêt	Conditions d'incubation		
			T°	Durée	Atmosphère
TS + 5% sang de cheval	-2 -3	toutes bactéries AAF et AS	37° C	24 à 48h	air
Chocolat ou Chapman	-2 -3	toutes bactéries AAF et AS et bactéries exigeantes ou Staphylocoques et Microcoques	37° C	24 à 48h	air

5) Recherche de SARM dans le prélèvement par PCR Multiplex

Matériel nécessaire :

- Coffret de polymérase : Taq...
- Couple d'amorces (ou d'oligonucléotides ou de primers) permettant d'amplifier une séquence d'ADN spécifiques de 3 gènes :

- o **Gène *mecA* : Fragment de 297pb**

- *mecA* S : ACGAGTAGATGCTCAATATAA
- *mecA* NS : CTTAGTTCCTTAGCGATTGC

- **Gène *rrn* = 16SrRNA : Fragment de 599pb**
 - 16SrRNA S : GCAAGCGTTATCCGGATTT
 - 16SrRNA NS : CTTAATGATGGCAACTAAGC
- **Gène *femA* : Fragment de 454pb**
 - *femA* S : CGATCCATATTTACCATATCA
 - *femA* NS : ATCACGCTCTTCGTTTAGTT

Réalisez votre mélange réactionnel de PCR dans un tube de PCR de 100µL.

MIX de PCR :

Tampon 10X :	2,5 µL
dNTP (10mM) :	0,5 µL
MgCl ₂ :	x µL
Amorce Sens (S) et Non Sens (NS) <i>mecA</i> (10µM) :	2,00 µL
Amorce Sens (S) et Non Sens (NS) <i>16SrRNA</i> (10µM) :	2,00 µL
Amorce Sens (S) et Non Sens (NS) <i>femA</i> (10µM) :	1,50 µL
Taq polymérase (XU/µL) :	x µL
Prélèvement pur :	3 µL
Eau stérile :	qsp 25 µL

Lancez l'amplification par PCR à l'aide d'un thermocycleur avec le protocole suivant

Protocole de PCR :

Dénaturation initiale :

94°C 5min

Amplification de 35 cycles :

94°C 30sec

55°C 50sec

72°C 1min

Elongation finale :

72°C 10 min

4°C infini

J2

1) Dénombrer les colonies de chaque type sur les différents milieux. Noter l'hémolyse sur gélose au sang

2) Identifier sommairement les bactéries : Gram, oxydase, catalase

3) Calculer la concentration de chaque type de bactéries par cm² de peau ou de muqueuse buccale. Ne pas oublier de tenir compte du volume du prélèvement.

N : Nombre d' UFC par gramme ou par mL de produit initial

N = Nombre de colonies x facteur de dilution x1/ volumeensemencé (en ml)

Boîtes interprétables = boîtes qui contiennent entre 30 et 300 colonies.

Pour une boîte 10⁻³ le facteur de dilution est 1000.

4) Repiquer et incuber :

par un isolement selon la méthode des quadrants :

- une colonie de staphylocoque prédominant dans la flore cutanée : sur gélose TS
- une colonie de Streptocoque prédominant dans la flore buccale : sur gélose au sang de cheval

5) Migration, visualisation et interprétation des PCR

Préparer un gel d'agarose à 1% dans du TBE 1X

Peser 1g d'agarose dans un erlen

Ajouter 100mL de TBE 1X

Faire chauffer au micro-ondes jusqu'à ce que l'agarose soit dissout

Laisser refroidir sur paillasse jusqu'à ce que vous puissiez prendre l'erlen dans la main (55°C) sans vous brûler

Couler le gel et ajouter 1µL de BET (le gel est transparent)

Laisser solidifier l'agarose (le gel devient translucide)

Mettre le gel dans la cuve d'électrophorèse

Ajouter aux 25µL de PCR 5µL de tampon de charge (loading dye) 6X

Déposer dans un puits 10µL de la PCR

Déposer à gauche et à droite des échantillons 5µL de marqueur de taille 100pb DNA Ladder

Migration à 100V pendant 30min (ATTENTION : migration du - (= noir) vers le + (= rouge))

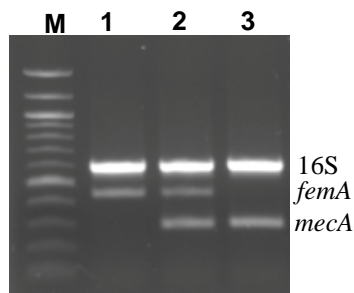
Retirer le gel de la cuve et enlever le surplus de tampon avec un sopalin

Visualisation sur plaque UV

Prise de photo.

Une fois la photo prise : **tout jeter dans une poubelle spéciale BET !!!**

Analyse et Interprétation des fragments de PCR obtenus à partir du schéma ci dessous :



M : 100pb ladder (Biolabs)

1 : *S. aureus* sensible à la méticilline

2 : *S. aureus* résistant à la méticilline

3 : *S. epidermidis* résistant à la méticilline

J 3

Identification des souches repiquées :

Ensemencer une galerie d'identification spécifique pour chaque souche isolée (voir annexe)

- Staphylocoques : galerie API et test coagulase par agglutination
- Streptocoques : galerie API et détermination du groupe par agglutination

J 4

Lecture des galeries d'identification (voir annexe). Conclusion sur les espèces présentes dans chacun des prélèvements

Le compte-rendu

1) La présentation : elle est importante !

C'est important de faire ressortir l'essentiel : inspirez-vous des résultats d'analyse d'un labo, type analyse de sang. La qualité de présentation valorise le contenu de votre CR.

2) Les détails en annexe

Le compte-rendu contiendra les résultats détaillés de chaque étape d'identification, les dessins des Gram du J1, le % de chaque type de bactéries à J1 et les calculs de dénombrement :

Présenter les résultats sous forme de tableaux : décrire chaque type de colonies prépondérantes (5 par prélèvement au plus), le nombre de colonies obtenues aux différentes dilutions et présenter le détail des calculs d'évaluation de la flore. Les résultats des galeries et tests seront présentés ainsi que la démarche menant à l'identification, en distinguant le diagnostic de genre et d'espèce.

3) Conclusion :

Référez vous au cours. Quelles sont les espèces bactériennes que l'on doit retrouver dans chacune des flores étudiées ? Quelle quantité ?? Si changement de concentration, qu'est ce que ça implique ?

4) La note obtenue:

Elle tient compte de votre pratique pendant les séances (qualité des colorations, des isolements et des dénombrements, organisation, tenue des instruments, compréhension) autant que de la qualité du CR.

5) Au début du CR, présenter :

- la définition de la famille des entérobactéries
- le principe du test de groupage des streptocoques.

FICHE TECHNIQUE des TP de MICROBIOLOGIE

1) → **Règles à suivre lors des séances de TP.** Une étoile (*) indique que cette technique est décrite plus loin.

- Port de la blouse de rigueur. La blouse en coton doit être boutonnée.
- Nouer les cheveux longs. **S'asseoir pour manipuler et pour observer au microscope.**
- Se laver les mains. Désinfecter la paillasse*.
- Éviter les courants d'air ; limiter les déplacements ; éviter de parler .
- **Aucun pipetage à la bouche.**
- Ne pas porter ses doigts ou tout objet à sa bouche. Ne pas manger, boire, fumer.
- Éviter de mettre tout objet personnel en contact avec les bactéries.
- Marquer soigneusement les lames, tubes, boîtes, etc... avec un feutre indélébile.
- Les manipulations seront faites dans un rayon de 10 cm autour de la flamme du bec Bunsen.
- Ne pas éteindre la flamme sans couper l'arrivée du gaz.
- Ne pas laisser à proximité de la flamme des objets ou liquides inflammables (papiers, alcool, etc...).

→ **Désinfection.**

- **paillasse** : alcool 60° (ou eau de Javel à 3° chlorométriques) à l'aide d'un papier jetable.
- **peau contaminée** : **savon et alcool 60°.**
- **instruments** (pipette Pasteur, anse, etc...) : **flamage***.

→ **Aucun instrument (pipette, anse) ni objet contaminé ne doit être posé directement sur la paillasse.**

→ **Flamage des instruments et de l'orifice des tubes** : sert à stériliser localement tout objet métallique ou en verre.

Ouvrir la virole du bec Bunsen. Le flamage se fait dans le cône bleu de la flamme.

- **Orifice des tubes** : flamber 1 à 2 secondes. A faire après chaque ouverture et avant chaque fermeture de tube.
- **Anse de platine** : tenir l'anse verticalement ; placer la boucle métallique dans la flamme ; attendre qu'elle devienne rouge. La maintenir 5 secondes. A faire avant et après chaque utilisation.
- **Pipette Pasteur** : La pipette est utilisée soit boutonnée (fermée) pour prendre une colonie, soit ouverte pour prélever un liquide. Il faut l'ouvrir avant le flamage. Tenir la pipette horizontalement et passer lentement la partie effilée de la pipette 5 à 6 fois dans la flamme.

Laisser refroidir anses et pipettes environ 10 secondes avant tout contact avec un liquide, une colonie bactérienne...

Ne jamais passer du plastique ou la pince en bois dans la flamme.

2) **Étude macroscopique des colonies.** Choisir des colonies bien isolées. **Cette description doit mentionner :**

- **La taille : diamètre des colonies.** Vous pouvez mesurer cette taille à l'aide d'une règle graduée. On distingue les petites colonies (< 1 mm), les moyennes (1 à 3 mm), les grandes colonies (> 3 mm).
- **La forme avec vue de profil** (bombée, plate, ombiliquée, à bords surélevés ou en oeuf au plat) et **avec vue de dessus** (ronde, bords dentelés, en étoile, ovoïde).
- **L'aspect de la surface** (lisse, rugueuse, brillante).
- **L'opacité.** Les colonies opaques ne laissent pas passer la lumière contrairement aux translucides. Certaines sont très transparentes car laissent passer la lumière .
- **La consistance.** Elle se juge au moment du prélèvement. On distingue les colonies crémeuses des sèches et des muqueuses.
- **La couleur ou pigmentation.** La plupart des colonies isolées sur gélose ordinaire sont de couleur crème = sans pigment mais certaines sont blanc porcelaine, jaune, vert, ;

Cette description aboutit à distinguer **3 types principaux de colonies :**

- **Colonies S** (smooth en anglais) : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées de consistance crémeuse. Elles donnent des suspensions homogènes.
- **Colonies R** (rough en anglais) : colonies à surface rugueuse et bords souvent dentelés, plates, de consistance sèche. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
- **Colonies M** (pour muqueuse) : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées mais filantes au prélèvement à l'anse. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
- Tous les intermédiaires sont possibles (ex. **SR**).

3) État frais.

- **A faire uniquement à partir d'un bouillon.** Déposer la suspension bactérienne avec l'anse de platine totalement refroidie (1 ou 2 anses) sur la zone centrale de la lame. **Éviter les excès de liquide** (risque de contamination et gêne l'observation)
- **Recouvrir d'une lamelle** le liquide. Éviter les bulles d'air. Recommencer au besoin.
- **Observer rapidement en faible luminosité SANS HUILE** : poser la lame avec lamelle sur la platine porte objet abaissé par rapport aux objectifs. Mettre l'**objectif x 40. Fermer le diaphragme. (Baisser le condensateur si le microscope le permet).** Monter la platine porte objet jusqu'à 1 mm de l'objectif, puis observer la préparation. Faire le réglage en abaissant progressivement la platine porte objet tout en affinant la netteté avec la vis micrométrique.

JETER l'état frais (lame et lamelle) dans le petit container jaune pour déchets contaminés.

4) Coloration de Gram : La coloration est en 4 temps principaux.

Les bactéries Gram⁻ apparaissent roses et les Gram⁺ violettes à l'observation microscopique.

Étape 1 : réalisation d'un frottis qui est séché et fixé.

- a) **A partir d'un bouillon** : déposer au centre de la lame 1 goutte de bouillon ; étaler
 - b) **A partir d'un isolement sur gélose** : déposer une petite goutte d'eau (flacon du portoir à colorants) au centre de la lame. Faire une suspension homogène avec une seule colonie prélevée à l'anse. Étaler sur environ ¼ de la lame.
- Laisser sécher en mettant la lame sur le chauffe lames.
 - Fixer le frottis en versant 1 ou 2 gouttes (pas plus) d'alcool 100° sur la lame et enflammer à l'aide d'une allumette.
 - **Laisser refroidir.**

Étape 2 : coloration au violet de Gentiane suivie d'un mordantage par une solution iodo-iodurée de Lugol.

- Recouvrir toute la lame de **Violet de Gentiane. Laisser 30 secondes.**
- **Rincer à l'eau** avec une pissette d'eau
- Ajouter le **Lugol. Laisser 30 secondes.**
- Rincer à l'eau . Egoutter la lame.

Étape 3 : décoloration à l'alcool

- Recouvrir la lame **d'alcool 100° . Attendre 10 secondes.**
- **Rincer immédiatement à l'eau** . Laisser un peu d'eau sur la lame.

Étape 4 : recoloration à la fuchsine.

- Ajouter la **Fuchsine. Laisser 30 secondes.**
- Laver abondamment à l'eau.
- Sécher délicatement la lame dans un papier jetable. Nettoyer au besoin **le dessous de la lame** avec un papier jetable . La lame doit être totalement sèche.
- **Observer à l'immersion en pleine lumière** : Mettre une goutte d'**huile à immersion** sur la lame totalement sèche . Observer à l'**objectif x 100** (objectif à immersion). **Ouvrir le diaphragme. (Monter le condensateur si le microscope le permet).** L'objectif doit toucher la goutte d'huile.

5) Gestion des déchets.

Matériels non contaminés (papier, allumettes, etc...) : poubelle à papier en bout de paille, sous les éviers.

Cultures bactériennes en boîtes et bouillons : grands containers jaunes pour déchets contaminés en bout de paille.

Pipettes Pasteur, lames et lamelles : petits containers jaunes posés sur les pailles pour chaque binôme.

6) Entretien des microscopes.

Manipuler avec soin le microscope. Ne jamais mettre d'huile sur l'objectif x 40.

Oter les lames dès l'observation terminée.

Nettoyer les lentilles des objectifs et des oculaires avec du papier Joseph en début et en fin de séance.

Nettoyer la platine porte objet et le corps du microscope à l'alcool 60°. Pas d'alcool sur les lentilles.

7) Ranger la paillasse en fin de séance : éteindre et nettoyer avec soin le microscope* ; remplir les flacons de colorants; évacuer les déchets dans les poubelles adéquates et les colorants usagés dans les bouteilles à déchets ; couper l'arrivée de gaz ; ordonner et désinfecter la paillasse.