

L3 SCIENCES DU VIVANT ANNEE 2009-2010
UE 6-3e Microbiologie Appliquée et Immunologie (MAI)
POLYCOPIE DE TP DE MICROBIOLOGIE & IMMUNOLOGIE

Matériel : 1 blouse en coton, un feutre indélébile, un élastique à cheveux.
LE COURS ET LES TD DOIVENT ETRE APPRIS ET COMPRIS

➤ **REDACTION DES COMPTE-RENDUS ET NOTATION :**

- **Microbiologie** : - un CR par binôme à rendre J3 pour la 1^o semaine ⇒ **note/10**
 - un CR par binôme à rendre J6 pour la 2^o semaine ⇒ **note/10**

La note obtenue tiendra compte des résultats, de la démarche suivie pendant la partie pratique et de la qualité du compte-rendu : précision, présentation, qualité de rédaction, orthographe ; les résultats seront regroupés par thème et les conclusions seront soulignées, ne pas oublier que les noms de genre commencent par une majuscule et les noms d'espèce par une minuscule.

- **Immunologie** : - un CR par binôme à rendre à la fin de la 2^o semaine ⇒ **note/20**
- ⇒ **note/20 : moyenne des CR de TP de Microbiologie et d'Immunologie**

➤ **UN EXAMEN THEORIQUE DE TRAVAUX PRATIQUES** aura lieu pendant les sessions de Mai et Juin sous forme d'un contrôle écrit de 30 minutes sans documents. ⇒ **note/20**

1ère semaine (J1, J2, J3)

PROGRAMME DU TP :

- I & II Techniques de base de bactériologie :

- travail stérile
- état frais
- coloration de Gram
- technique d'isolement des bactéries sur milieux gélosés

- II Identification bactérienne par l'étude des caractères métaboliques et antigéniques

- III Immunologie : isolement d'une protéine bactérienne B par immunoprécipitation (début)

I -TRAVAIL STERILE (J1, J2)

1) J1

A partir d'un bouillon Trypticase Soja (**TS**) de 10 mL (tube à essai), transvaser stérilement ≈ 2 mL dans 5 tubes à hémostase à l'aide d'une pipette Pasteur.

- 2 bouillons serviront au test de stérilité : les incuber 24h à 37°C.
- les 3 autres bouillons serviront pour l'identification des 3 souches (voir II).

2) J2

Les 2 bouillons non ensemencés sont-ils limpides ? Conclusion ?

II - IDENTIFICATION DE 3 SOUCHES (J1, J2, J3)

Chaque binôme reçoit 3 souches isolées sur gélose TS en vue d'une identification.

1) J1 : à faire sur les 3 souches

- Etude de la mobilité
- ensemencement d'un milieu semi-solide mannitol-mobilité : piqûre centrale avec 1 colonie
- ensemencement d'un bouillon TS de ≈ 2 mL avec 1 colonie

- Réisolement

- Faire sécher 3 géloses TS 30 min. à l'étuve
- Isoler à partir du bouillon TS ensemencé par 1 colonie chaque souche sur une gélose TS par la méthode des quadrants. **Flamber** entre chaque quadrant.

2) J2 : Etudier sur les 3 souches :

- **Caractères morphologiques (voir fiches techniques):**

- Gram : dessiner la forme exacte : incurvée ? ronde ? ovale ? groupement ?
- étude de la mobilité :
 - lecture du milieu mannitol-mobilité
 - état frais entre lame et lamelle à partir du bouillon TS (objectif x 40 à sec) (cf. fiche technique)

- étude macroscopique des colonies

- **Métabolisme énergétique** : Réaliser les 2 tests sur la même lame :

- catalase : 1 goutte de H₂O₂. Déposer les colonies avec l'anse de platine sans les disperser.
- oxydase : papier buvard + 1 petite goutte de TMPD. Déposer les colonies sans les disperser avec une pipette Pasteur à la limite de la goutte et du papier sec. C'est la colonie qui vire au rouge si ox+.

Etudier selon l'identification présomptive de la famille ou du genre :

- **Caractères métaboliques**

- pour les bacilles Gram -

Fermentation du mannitol

Ensemencement d'une galerie API 10E

Ensemencement d'une galerie d'identification simplifiée en tubes (**voir fiches techniques**) :

- milieu de Kligler-Hajna
- milieu de Clark et Lubs (pour réaction de RM et VP)
- milieu urée-indole de Ferguson
- recherche de la nitrate réductase sur mannitol-mobilité

- pour les staphylocoques (coques Gram +, catalase +)

Fermentation du mannitol

Recherche d'une DNase : ensemencer une gélose à l'ADN

Recherche de la coagulase libre: ensemencer un bouillon pour staphylocoagulase

- pour les streptocoques (coques Gram +, catalase -)

Fermentation du mannitol

Etude des caractères antigéniques (à faire éventuellement J3) : **Recherche du polyside**

C pariétal : 1- extraction du polyside C : mettre 20 colonies en suspension dans 0.5 mL d'enzyme d'extraction. Incuber 10 min. à 37°C au bain-marie

2- réaction d'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques de chaque polyside C de groupe (groupes A, B, C et D)

3) J3

- bacilles Gram -

Révélation et lecture de la galerie d'identification en tubes

Test ONPG : **uniquement** si la bactérie est lactose - (voir milieu de Kligler-Hajna)

Révélation et lecture de la galerie API 10E

Comparaison des résultats obtenus par les 2 méthodes

- staphylocoques

Révélation de la DNase

Recherche de la coagulase libre: mélanger 0,5 mL de bouillon pour staphylocoagulase avec 0,5 mL de plasma de lapin. Placer à 37°C. Regarder toutes les 30 min si un caillot s'est formé. En cas de résultat négatif, garder le tube à 37°C jusqu'à la prochaine séance.

Recherche de la coagulase liée : agglutination de particules de latex sensibilisées par du fibrinogène. Comparer les résultats des 2 tests de recherche de la coagulase.

COMPTE-RENDU de la semaine 1 de microbiologie par binôme : à rendre impérativement en J3 à la fin de la séance :

- travail stérile
- identification de chaque souche : classer les résultats par souche et non par jour.
- contenu, principe, mode de lecture des milieux urée-indole, Kligler, Clark et Lubs.
- principe de recherche de la nitrate réductase
- définition de la famille des entérobactéries.
- Schémas pour la recherche du polysaccharide C des streptocoques

NB : - **Ne pas oublier le n° des 3 souches étudiées.**
 - **Les comptes-rendus ne doivent pas décrire les techniques utilisées mais doivent comporter les résultats et la démarche suivie si possible sous forme de tableau.**

**III TP IMMUNOLOGIE : isolement d'une protéine bactérienne B par immunoprécipitation
 JOUR 1 (suite : voir 2° semaine, J4-J5-J6)**

L'objectif de ce travail pratique est d'isoler une protéine d'intérêt d'un extrait cellulaire, par immuno-précipitation.

Ce travail a été établi pour mettre en pratique des techniques dans un contexte qui a été organisé de manière à épargner tout risque biologique.

Votre thématique de recherche est la bactérie Bac intracellulaire. Cette bactérie exprime un ensemble de protéines et notamment la protéine B, qui est une protéine cytoplasmique dotée d'une activité encore non caractérisée. Vous cherchez à isoler cette protéine pour en étudier ses propriétés fonctionnelles. L'approche que vous choisissez est **l'immuno-précipitation**.

I) Matériels d'étude

Vous disposez **d'extraits cytoplasmiques**

- de cellules infectées par la bactérie Bac et
- de cellules non infectées, pour témoin.

Ces extraits ont été obtenus en incubant les cellules dans un tampon de lyse : une solution tamponnée saline (le PBS) contenant 1% de *TritonX100* et des *inhibiteurs de protéases* (Annexe 1), pendant 20 minutes à 4°C, à raison de 40 millions de cellules/ml.

Après une centrifugation de 13000 *g* pendant 10 minutes, le surnageant a été conservé ; il correspond à l'extrait cytoplasmique. Les protéines contenues dans ces extraits ont été dosées par la *méthode de Bradford*. L'extrait a été ajusté à une concentration de 10 µg/µl à l'aide de tampon de lyse.

PBS : NaCl (137 mM), KCl(2,7 mM), Na₂HPO₄ 2H₂O (8,1 mM) KH₂PO₄ (1,5 mM),
 pH=7,4

Inhibiteurs de protéases : Complete Mini (Roche Diagnostics) ; Cocktail d'inhibiteurs ; **cf Annexe 1**

II) Immuno-précipitation de la protéine bactérienne

JOUR 1

A partir des 500 µl d'extraits cytoplasmiques de cellules infectées dont vous disposez, vous allez immuno-précipiter la protéine B de la manière suivante :

- 1) Ajouter dans le tube 50 µl de *protéine A- Sépharose*.
- 2) Placer sous agitation à 4°C pendant 30 minutes.
- 3) Centrifuger 10 secondes à 13000 g.
- 4) Récupérer le surnageant et le transférer dans un nouveau tube Eppendorf.
- 5) Séparer les échantillons en 2 :
Placer 200 µl de surnageant dans un tube Eppendorf noté **E** (pour essai) et
Placer 200 µl de surnageant dans un tube Eppendorf noté **T** (pour témoin).
Ajouter dans les deux tubes 200 µl de PBS.
- 6) Ajouter dans le tube **E** : 5 µg d'*anticorps anti-protéine B* (IgG2a) et
Ajouter dans le tube **T** : 5 µg d'*anticorps « contrôle isotypique »* (IgG2b)
- 7) Placer sous agitation à 4°C pendant une heure.

Faire les manip du TP de Microbiologie pendant l'heure d'incubation

- 8) Ajouter dans les tubes **E** et **T** : 70 µl de protéine A- sépharose.
- 9) Placer sous agitation sur roue à 4°C pendant 30 min.

Terminer (si nécessaire) les manip du TP de Microbiologie pendant l'incubation

Reprendre les tubes E et T sur la roue dans la chambre froide

- 10) Centrifuger 10 secondes à 13000 g.
- 11) Eliminer le surnageant.
- 12) Ajouter au culot de protéine A- sépharose : 1 ml de tampon I. Mélanger brièvement au vortex. Centrifuger 10 secondes à 13000g. Eliminer le surnageant.
- 13) Répéter cette étape.
- 14) Ajouter au culot de protéine A - sépharose : 1 ml de tampon II. Mélanger brièvement au vortex. Centrifuger 10 secondes à 13000g. Eliminer le surnageant.
- 15) Répéter cette étape.
- 16) Ajouter au culot de protéine A - sépharose: 1 ml de tampon III. Mélanger brièvement au vortex. Centrifuger 10 secondes à 13000g. Eliminer le surnageant.
- 17) Répéter cette étape.
- 18) Ajouter au culot de protéine A - sépharose : 1 ml de tampon IV. Mélanger brièvement au vortex. Centrifuger 10 secondes à 13000g. Eliminer le surnageant.
- 19) Répéter cette étape.
- 20) Ajouter au culot de protéine A – sépharose : 20 µl d'eau
- 21) Assécher la protéine A- sépharose et la congeler.

Matériels :

Protéine A – sépharose: Protein A sepharose CL-4 (Amersham Biosciences Europe); **cf Annexe 2**

Anticorps : Ac anti-protéine bactérienne B (BD Biosciences); **cf Annexe 3**
Ac IgG2b controle (Beckman Coulter France); **cf Annexe 4**

Tampon I: NaCl (150 mM), Tris-HCl pH=8 (20 mM), EDTA (5 mM), Triton X100(1%)

Tampon II: NaCl (150 mM), Tris-HCl pH=8 (20 mM), EDTA (5 mM), Triton X100 (0,5%), SDS (0,1%)

Tampon III: NaCl (500 mM), Tris-HCl pH=8 (20 mM), Triton X100 (0,5%)

Tampon IV: Tris-HCl pH=8 (50 mM)

2ème semaine (J4, J5, J6)

PROGRAMME DU TP :**I - CMI et CMB vis à vis de la streptomycine - Dénombrements bactériens****II - Etude d'un mélange de bactéries****A] identification partielle****B] antibiogrammes par diffusion en gélose****III Immunologie : isolement d'une protéine bactérienne B par immunoprécipitation (suite)****I - CMI et CMB VIS A VIS DE LA STREPTOMYCINE (J4, J5, J6)**

CMI : plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible

CMB : plus faible concentration d'antibiotique ne laissant subsister que 0.01% de l'inoculum initial

1) J4 : Préparation commune aux CMI et CMB :

- **Inoculer** un bouillon **TS** avec 1 colonie de la souche donnée sur gélose TS et incubé ce bouillon 1 à 2h à 37°C en bain-marie agité.

- **Préparer** pendant ce temps **la gamme de dilution de l'antibiotique** :

Une solution mère d'antibiotique à 10 g/L est distribuée

Préparer dans des tubes à hémolyse bouchés coton des dilutions géométriques de raison 2 de l'antibiotique **dans du bouillon MH** stérile sous un volume final de 1 mL de façon à obtenir une gamme allant de 1024 à 8 mg/L et 1 tube témoin sans antibiotique soit 9 tubes.

- **Préparer l'inoculum** : faire une dilution du bouillon de culture au moins au 1/10 **en bouillon MH** (cette dilution doit être parfaitement limpide)

- **Répartir** 1 mL de cette suspension bactérienne dans chaque tube de la gamme d'antibiotique (la concentration finale en antibiotique va de 512 à 4 mg/L). **Commencer** par le tube témoin.

- **Numération** de l'inoculum initial :

- Faire **sécher 30 min. 1 gélose TS** avant utilisation

- Le tube témoin sans antibiotique (1 mL de bouillon MH + 1 mL de suspension bactérienne diluée au 1/10 en bouillon MH) est utilisé pour évaluer l'inoculum initial (il devrait renfermer $\cong 10^6$ bactéries viables/mL) :

Faire 4 dilutions de raison 10 en eau distillée stérile (50 μ L dans 450 μ L) : 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ qui serviront pour l'interprétation des CMB car elles correspondent respectivement à 10%, 1%, 0.1% et 0.01% de survivants.

Ensemencer 50 μ L des différentes dilutions et de l'échantillon non dilué (100% de survivants) sur la gélose TS.

- **Incuber** les tubes et les boîtes 18 à 24h à 37°C.

2) J5 - Lecture de la CMI

Déterminer la CMI

Précisez la catégorie S, R ou I de la souche

Dénombrer les colonies bactériennes de l'inoculum. Calculer le nombre de bactéries par mL de bouillon (chaque bactérie a donné naissance à une colonie) en tenant compte des dilutions.

- Détermination de la CMB

Dénombrer les survivants sur milieu gélosé pour tous les tubes limpides (sans pratiquer de dilution) : **Sécher 30 min.** 1 gélose TS - **Ensemencer 50 μ L** de chaque tube limpide sur cette gélose TS - **Incuber** les géloses à 37°C.

3) J6 - Lecture de la CMB - Déterminer la CMB en comparant le nombre de survivants dénombrés dans chaque tube limpide à la gamme étalon de l'inoc. initial.

II - ETUDE D'UN MELANGE DE GERMES (J4, J5, J6)

Chaque binôme reçoit un **bouillon TS** renfermant un mélange de germes pour identifications et antibiogrammes.

A] IDENTIFICATION PARTIELLE

1) J4

- Etude morphologique

- état frais : mettre 1 anse de bouillon entre lame et lamelle. Observer.

- Gram : mettre 2 gouttes de pipette Pasteur sur une lame

⇒ - types de germes présents (forme, groupement, mobilité, Gram)

- choix de milieux de culture sélectifs ou non pour l'isolement de ces bactéries

- Isolement sur milieux solides

Faire **sécher les géloses 30 min. à l'étuve** avant l'isolement :

- sur milieu non sélectif (gélose TS) qui permettra la croissance de ttes les bactéries

- sur milieu(x) sélectif(s) pour inhiber certaines bactéries :

- milieu de Chapman sélectif pour staphylocoques et microcoques

- milieu de Drigalski sélectif pour bacilles Gram- courants (entérobactéries, Pseudomonas, Vibrions)

2) J5

- **Voir la qualité** des isollements. Si besoin, réisoler

- **Lecture** des milieux Chapman et Drigalski.

- **Comparaison** des isollements entre eux. Aspect macroscopique des colonies.

- **Identification présomptive** de chaque germe :

- Gram - oxydase - catalase

- type respiratoire : les résultats seront donnés

AUCUN AUTRE TEST D'IDENTIFICATION à faire

B] ANTIBIOGRAMMES : sensibilité aux antibiotiques par la méthode des disques (diffusion en gélose) à faire sur chaque souche du mélange

- Pour chaque souche, faire sécher 10 min. 2 géloses de Mueller-Hinton.

- Préparer l'inoculum (**voir fiche technique** : la préparation de l'inoculum diffère selon le type de bactéries)

- **Ensemencer** ces 2 géloses MH avec la même suspension bactérienne. Tester :

Boîte 1 : sulfamides, triméthoprim, acide nalidixique, péfloxacin, vancomycine, gentamicine.

Boîte 2 : amoxicilline, amoxicilline+acide clavulanique, céfalotine, benzylpénicilline, méticilline, métronidazole.

2) J6

- Lire l'antibiogramme (**voir fiche technique**)

COMPTE RENDU de la semaine 2 de microbiologie par binôme : à rendre en J6 à la fin de la séance :

- CMI et CMB, dénombrement du témoin : résultats détaillés et calculs
- identification présomptive des germes du mélange.
- contenu, mode de lecture et résultats obtenus pour les milieux TS, Chapman, et Drigalski
- Interprétation des antibiogrammes sous forme d'un tableau :

Nom ATB	abréviation	famille	Mode d'action	Diamètre (mm)	CMI (mg/l)	Sensibilité (S/R/I)	remarques

Remarques :

- Précisez si les résistances sont naturelles (cf votre cours)
- Notez les éventuelles synergies et expliquez-les
- Commentez les résistances aux beta-lactamines
- **Ne pas oublier le n° de la souche pour CMI/CMB et la lettre du mélange**

Les comptes-rendus ne doivent pas décrire les techniques utilisées mais doivent comporter les résultats et la démarche suivie si possible sous forme de tableau.

III TP IMMUNOLOGIE isolement d'une protéine bactérienne B par immunoprécipitation (suite et fin) J4-J5-J6

III) Séparation électrophorétique des protéines immuno-précipitées

JOUR 4

14) Préparation des *gels d'acrylamide*. Stockage à 4°C sous scellofrais jusqu'à J5.

JOUR 5

15) Ajouter dans chaque tube 30 µl de *tampon de charge*, auquel a été ajouté du *β-Mercaptoéthanol*.

16) Faire *bouillir les échantillons* 10 minutes.

17) Centrifuger les tubes 10 secondes à 13000 g.

18) Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette chargée d'un embout fin.

19) Charger les gels d'acrylamides avec 20 µl de vos échantillons.

20) Déposer, en plus, 15 µl de « *marqueurs de poids moléculaire* », et 30 µg d'extraits cytoplasmiques, préalablement bouillis pendant 10 minutes.

21) Soumettre les échantillons à la migration (40 mA pour 2 gels).

Marqueurs de poids moléculaire : Low molecular weight markers (Amersham Biosciences Europe) ; cf **Annexe 4**

Tampon de charge (3x concentré) : Tris-HCl 1M pH=6,8 (150mM), glycérol (30 %), SDS (6 %), Bleu de bromophénol (0,5 %)

Gel de séparation (12,5%) :

pour 2 gels : 4,15 ml d'eau; 3,1 ml d'acrylamide/bisacrylamide (40%); 2,5 ml de Tris-HCl 1,5M pH=8,8; 200 µl de SDS (10%); 50 µl d'APS (10%); 10 µl de TEMED

Gel de concentration (5%):

pour 2 gels : 2,5 ml d'eau; 0,625 ml d'acrylamide/bisacrylamide (40%); 1,8 ml de Tris-HCl 0,5 pH=6,8; 100 µl de SDS (10%); 25 µl d'APS (10%); 5 µl de TEMED

Tampon de migration : Tris-base (25 mM), glycine (190 mM), SDS (0,1%)

Préparation :

Préparer 1 litre de tampon de migration concentré 1x à partir de la solution concentrée 10x.

Laver soigneusement les plaques et les monter sur le système de préparation de gel. Préparer le gel de séparation et le couler. Doucement déposer de l'eau par-dessus et attendre la polymérisation. Eliminer l'eau, préparer le gel de concentration et le couler. Placer le peigne. Attendre la polymérisation. Monter les plaques sur le système de migration et ajouter le tampon de migration.

Préparer le tampon de charge réducteur. Ajouter 10 µl de β-Mercaptoéthanol à 300 µl de tampon de charge (3x concentré).

IV) Révélation des protéines séparées électrophorétiquement : J5 et J6

22) *Coloration des gels d'acrylamide au bleu de Coomassie* : placer les gels pendant une heure, sous agitation, dans une solution contenant du bleu de Coomassie (0,25%), du méthanol (45%), et de l'acide acétique (10%)

TRAVAIL REALISE PAR FABIEN :

23) *Décoloration des gels*: placer les gels dans une solution contenant du méthanol (45%) et de l'acide acétique (10 %) pendant le temps nécessaire, sous agitation. (Changer régulièrement la solution pour décolorer plus rapidement).

24) Rincer le gel à l'eau.

V) Analyse des résultats

JOUR 6

Sur vos gels, vous visualisez les protéines du « marqueur de poids moléculaire », les protéines contenues dans les extraits cytoplasmiques des cellules infectées ou des cellules non infectées, pour témoin. Vous observez aussi les protéines immuno-précipitées avec l'anticorps anti-protéine B ou l'anticorps « contrôle isotypique ».

Analyser vos résultats. La technique d'immuno-précipitation vous a-t-elle permis d'atteindre votre objectif : isoler la protéine B, à partir d'extraits cytoplasmiques de cellules infectées par la bactérie Bac A ? Discuter des avantages et des inconvénients de l'utilisation de la technique d'immuno-précipitation à des fins d'étude fonctionnelle d'une protéine d'intérêt.

Travail préliminaire à la séance de travail pratique.

Il vous est demandé de réfléchir sur :

- le rôle, dans le tampon de lyse, du *TritonX100*
- l'importance d'ajouter, au tampon de lyse, des *inhibiteurs de protéases*
- le choix des conditions de lyse : *pendant 20 minutes à 4°C*
- le principe du dosage des protéines par la *méthode de Bradford*
- l'intérêt de la *protéine A - sépharose*
- la structure des *anticorps*
- l'intérêt de faire une expérience témoin avec un anticorps « *contrôle isotypique* »
- l'intérêt de *laver la protéine A- sépharose* à la fin de l'expérience
- la composition du *tampon de charge*
- le rôle du *β -Mercaptoéthanol*
- l'importance de faire *bouillir les échantillons*
- le principe de la séparation des protéines sur un *gel d'acrylamide*, en présence de SDS
- l'intérêt d'utiliser un *marqueur de poids moléculaire*
- le principe *coloration des gels d'acrylamide au bleu de Coomassie*



ANNEXE 1 :

Product	Complete, Mini; Protease Inhibitor Cocktail Tablets
Company	Roche Applied Science
Price	Get Quote
Catalog Number	11836153001
Quantity	25 tablets
Size	25 tablets
Target	Protease, Calpain II, Cathepsin B, Elastase, leukocyte, Elastase, pancreatic, Papain, Plasmin, Thermolysin, Trypsin
Protease Inhibitors	Pancreas extract, Pronase, Thermolysin, Chymotrypsin, Papain
More Information	Roche Applied Science: Product Info

ANNEXE 2 :**Table 1.** Medium characteristics.

Ligand density:	~3 mg protein A/ml drained medium
Available capacity*:	~20 mg human IgG/ml drained medium
Bead structure:	4% cross-linked agarose
Bead size range:	45-165 μ m
Mean bead size:	90 μ m
Max linear flow rate**:	150 cm/h at 25°C, HR 16/10 column, 5 cm bed height
pH stability***:	
Long term:	3-9
Short term:	2-10
Chemical stability:	All commonly used aqueous buffers, 6 M guanidine-hydrochloride, 8 M urea.
Physical stability:	Negligible volume variation due to changes in pH or ionic strength.
Sanitization:	Sanitize the packed column with 2% Hibitane/20% ethanol or with 70% ethanol.

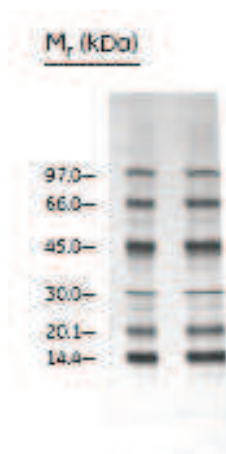
ANNEXE 3 :**BioCytex**

DATA SHEET

Mouse IgG2b
(Cat #5117-P)

MOUSE IgG2b ISOTYPIC CONTROL, PURIFIED

Clone	2DNP 14G5
Isotype	IgG2b, kappa
Partner of fusion	P3X63Ag8/653
Immunogen	DNP-BSA
Specificity	This antibody recognizes DNP (2,4-Dinitrophenyl). This molecule is not expressed on normal human leukocytes, platelets and red cells.
Application	Flow cytometry.
Form	Purified immunoglobulin in PBS-BSA 0.1%, pH 7.2, liquid, 1 mL.
Size	0.1 mg
Suggested amount	Use this isotypic control at the same concentration than the specific monoclonal antibody tested.
Preservative	Sodium Azide < 0.1%.
Storage	As delivered at +2-8°C until expiration date. After opening, aliquote contents and freeze at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing.
HLDA Workshop	N/A

ANNEXE 4 :

Protein	M _r (Da)	R _f
Phosphorylase b	97 000	0.16
Albumin	66 000	0.26
Ovalbumin	45 000	0.41
Carbonic anhydrase	30 000	0.57
Trypsin inhibitor	20 100	0.71
α -Lactalbumin	14 400	0.80

FICHES TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE

COLORATION DE GRAM

a) Réaliser un frottis sur une lame :

- **soit à partir d'un bouillon** : Déposer 2 gouttes de bouillon non dilué

- **soit à partir d'une partie d'une colonie** : dissocier la colonie dans une goutte d'eau

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

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

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

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

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

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

h) 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.

- **Gram**

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.

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

Condensateur monté jusqu'à la lame si le microscope le permet.

- **Etat frais**

L'objectif x 40 ne doit jamais recevoir d'huile.

Diaphragme fermé. Objectif x 40 à sec (sans huile). Placer l'objectif à environ 1 mm au-dessus de la lamelle. Condensateur baissé si le microscope le permet

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.

TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE

- **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 - bouillon staphylocoagulase

- **Milieux solides en boîtes** → Isolement en quadrant sur :

- gélose TS (peptones, extrait de viande, 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)
- gélose à l'ADN (peptone, ADN, NaCl 5%, agar). → Faire une strie.

- **Milieux solides en tubes : piqûre avec la pipette Pasteur**

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

REVELATION ET LECTURE DES MILIEUX D'IDENTIFICATION

Milieu	Test	Réactif à ajouter 1 goutte de :	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 d' a Naphtol	Rouge rose en 10'- tube incliné	jaune jaune, beige
Gélose à l'ADN	DNase	HC1	halo clair	
Mannitol- Mobilité	Mannitol Gazogène Mobilité	0 0 0	Jaune bulle gélose trouble	rouge - gélose limpide
	Nitrate réductase	nitrite 1 et 2 poudre de zinc	rouge reste incolore	incolore devient rouge

TECHNIQUE DE L'ANTIBIOGRAMME PAR DIFFUSION EN GELOSE

➤ **Protocole**

Préparation de l'inoculum : 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 réaération 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 paillasse (prédifusion de l'antibiotique).
Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

➤ **Lecture et interprétation**

Mesurer les diamètres d'inhibition. Les comparer aux diamètres critiques. Classer la souche dans l'une des 3 catégories S, I ou R pour chaque antibiotique.

Rechercher les synergies, les antagonismes et les repousses de bactéries.

Interpréter pour les 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.

Comparer la sensibilité aux antibiotiques d'une même famille (quinolones, aminosides, β -lactamines).