

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

TRAVAUX PRATIQUES

ANNEE 2014 - 2015

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

A. FLORE CUTANEE HUMAINE

1) Prélèvement

- Lavez vous les mains
- Frottez 5 à 6 fois 1 écouvillon stérile derrière votre oreille.
- Décharger l'écouvillon en l'agitant bien dans un tube Eppendorf stérile contenant 1 mL d'eau stérile.
- Evaluer en cm² la surface de peau prélevée.

2) Coloration de Gram

- Frotter l'écouvillon sur une lame de microscope.
- Faire une coloration de Gram.
- Estimer le % de chaque type de bactéries.

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

- Dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 mL, réaliser les dilutions 10⁻¹ et 10⁻² dans un volume final de 500 µL.
- Bien vortexer chaque tube

4) Ensemencement des milieux de culture et incubation

Prévoir 1 gélose pour 2 dilutions.

Ensemencer 50 µL des dilutions suivantes sur les milieux suivants : vortexer la dilution avant de prélever 50 µL ;

Déposer la goutte sur la gélose puis étaler rapidement au râteau. Incuber

Conditions d'incubation

Milieu gélosé	Dilutions à ensemencer	Intérêt	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 un tube Eppendorf stérile contenant 1 mL d'eau stérile. Ceci constitue l'échantillon pur = non dilué (P)

2) Colorations de Gram

- a) Frotter l'écouvillon « muqueuse » sur 1 lame.
Faire une coloration de Gram.
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 1 lame. Faire une coloration de Gram. Estimer le % de chaque type de bactéries et comparer avec la flore de la muqueuse.

3) Dilutions en eau distillée stérile pour la muqueuse buccale seulement

Dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 mL, réaliser les dilutions 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ et 10⁻⁴ dans un volume final de 500µL. Bien vortexer chaque tube

4) Ensemencement des milieux de culture et incubation

Prévoir 1 gélose 2 dilutions.

Ensemencer 50µL des dilutions suivantes sur les milieux suivants : vortexer la dilution avant de prélever 50µL ; 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
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 un tube Eppendorf stérile contenant 200µL d'eau stérile. Ceci constitue l'échantillon pur = non dilué (P)

2) Colorations de Gram

- Frotter l'écouvillon « nez » sur 1 lame.
- Faire une coloration de Gram.
- Estimer le % de chaque type de bactéries

3) Dilutions en eau distillée stérile

Dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 mL, réaliser les dilutions 10⁻¹, 10⁻² dans un volume final de 500 µL. Bien vortexer chaque tube

4) Ensemencement des milieux de culture et incubation

Prévoir 1 gélose pour 2 dilutions.

Ensemencer 50µL des dilutions suivantes sur les milieux suivants : vortexer la dilution avant de prélever 50µL ; 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	-1 -2	toutes bactéries AAF et AS	37° C	24 à 48h	air
Chapman	-1 -2	toutes bactéries AAF et AS et bactéries exigeantes ou Staphylocoques et Microcoques	37°C	24 à 48h	air

J 2

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) Recherche de SARM dans le prélèvement par PCR Multiplex

A partir d'une colonie suspecte sur gélose Chapman, faire une PCR permettant la recherche de SARM.

Matériel nécessaire :

- Coffret de polymérase : GoTaq
- Couple d'amorces (ou d'oligonucléotides ou de primers) permettant d'amplifier une séquence d'ADN spécifique de 3 gènes :
 - **Gène *mecA* : Fragment de 297pb**
 - *mecA* S : ACGAGTAGATGCTCAATATAA
 - *mecA* NS : CTTAGTTCTTTAGCGATTGC
 - **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 de 25µL final dans un tube de PCR de 100µL.

MIX de PCR colonie :

5X Green Flexi Buffer :	5,00 µL
dNTP (10mM) :	0,50 µL
MgCl ₂ (25mM) :	4,00 µL
Amorce Sens (S) <i>mecA</i> (10µM) :	2,00 µL
Amorce Non Sens (NS) <i>mecA</i> (10µM) :	2,00 µL
Amorce Sens (S) 16SrRNA (10µM) :	2,00 µL
Amorce Non Sens (NS) 16SrRNA (10µM) :	2,00µL
Amorce Sens (S) <i>femA</i> (10µM) :	1,50 µL
Amorce Non Sens (NS) <i>femA</i> (10µM) :	1,50 µL
GoTaq polymérase (5U/µL) :	0,125 µL
Colonie :	0,00 µL car colonie..
Eau stérile :	4,375 µL

Les témoins :

Vous avez à disposition de l'ADN génomique de :

- SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
- SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
- SERM : *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline

1 personne par groupe va devoir réaliser un MIX de PCR spécifique pour les 3 témoins :

	1 tube	3 tubes
5X Green Flexi Buffer :	5,00 µL	15,00µL
dNTP (10mM) :	0,50 µL	1,50µL
MgCl ₂ (25mM) :	4,00 µL	12,00µL
Amorce Sens (S) <i>mecA</i> (10µM) :	2,00 µL	6,00µL
Amorce Non Sens (NS) <i>mecA</i> (10µM) :	2,00 µL	6,00µL
Amorce Sens (S) 16SrRNA (10µM) :	2,00 µL	6,00µL
Amorce Non Sens (NS) 16SrRNA (10µM) :	2,00µL	6,00µL

Amorce Sens (S) <i>femA</i> (10µM) :	1,50 µL	4,50µL
Amorce Non Sens (NS) <i>femA</i> (10µM) :	1,50 µL	4,50µL
GoTaq polymérase (5U/µL) :	0,125 µL	0,375µL
ADNg témoin :	2,00 µL/tube	
Eau stérile :	2,375 µL	7,125µL

Une fois le MIX de PCR réalisé pour 3 tubes, en répartir 23µL dans chaque puits correspondant aux témoins. Ajouter ensuite 2µL de l'ADNg de chaque témoin dans les puits correspondant.

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

Protocole de PCR :

Dénaturation initiale :

95°C 5min

Amplification de 35 cycles :

95°C 30sec

55°C 50sec

72°C 1min

Elongation finale :

72°C 10 min

4°C infini

J 3

1) Migration, visualisation et interprétation des PCR

Préparer un gel d'agarose à 1% dans du TBE 0.5X

Peser 1g d'agarose dans un erlen

Ajouter 100mL de TBE 0.5X

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

Laisser refroidir sur pailasse jusqu'à ce que vous puissiez prendre l'eren 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

Déposer dans un puits 10µL de la PCR sans ajouter de tampon de migration

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

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

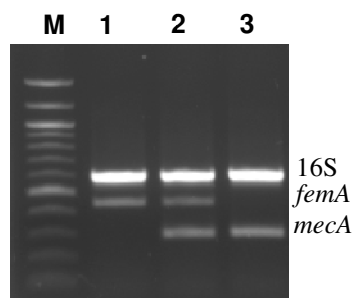
Retirer le gel de la cuve et enlever le surplus de tampon avec un sopalin

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

2) 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 isollements 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.

**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /
 TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO /
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL /
 TABELA IDENTYFIKACJI**

% de réactions positives après 18-24 h à 36°C ± 2°C / % of reactions positive after 18-24 hrs. at 36°C ± 2°C /
 % der positiven Reaktionen nach 18-24 h bei 36°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 18-24 h a 36°C ± 2°C /
 % di reazioni positive dopo 18-24 ore a 36°C ± 2°C / % das reacções positivas após 18-24 h a 36°C ± 2°C /
 % θετικών αντιδράσεων μετά από 18-24 ώρες στους 36°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 18-24 h. vid 36°C ± 2°C /
 % af positive reaktioner efter 18-24 timer ved 36°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 18-24 godzinach w 36°C ± 2°C

API STAPH	V4.1	0	3	FR	URE	PAL	AD	TR	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0	0
<i>Staphylococcus aureovarius</i>	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	9	1	0	0	40	0	15	90	1	0	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	60	0	1	85	35	0	0
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0	0
<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp <i>cohnii</i>	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0	0
<i>Staph. cohnii</i> ssp <i>urealyticum</i>	0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0	0
<i>Staphylococcus schweileri</i>	0	100	80	100	0	1	74	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0	0
<i>Staphylococcus xylosum</i>	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0	0
<i>Kocuria kristinae</i>	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97	0
<i>Kocuria varians/rosea</i>	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95	0
<i>Micrococcus</i> spp	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91	0

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge *	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)		
TRE	D-trehalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLITol)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NiTrates en nitrites		
PAL	β-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	ZYMA + ZYM B / 10 min jaune violet	
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min incoloro-rose pâle violet-rose	
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFfinose)	rouge	jaune
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl-αD- glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl-αD- Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
ADH	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatif (0) et positif (GLU).

- * Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.
- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. III
TABLES DES SYMBOLES	p. IV



bioMérieux® sa
 au capital de 11 879 045 €
 673 620 399 RCS LYON
 69280 Marcy-l'Etoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tél. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France

Le logo est une marque déposée et protégée qui est la propriété exclusive de bioMérieux sa ou de l'une de ses filiales.

**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION /
 TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO / ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ /
 IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL / TABELA IDENTYFIKACYJNA**

% de reações positivas após 4/24 h à 36°C ± 2°C / % of reactions positive after 4/24 hrs. at 36°C ± 2°C /
 % der positiven Reaktionen nach 4/24 h bei 36°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 4/24 h a 36°C ± 2°C /
 % di reazioni positive dopo 4/24 ore a 36°C ± 2°C / % das reacções positivas após 4/24 h a 36°C ± 2°C /
 % θετικών αντιδράσεων μετά από 4/24 ώρες στους 36°C ± 2°C / % positive reaktioner efter 4/24 timmar vid 36°C ± 2°C /
 % positive reaktioner efter 4/24 timer ved 36°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 4/24 godzinach w 36°C ± 2°C

API 20 STREP	V7.0	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	BIB	ARA	MAN	SOR	LAG	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	HEM
<i>Abiotrophia defectiva</i>		25	0	15	99	100	0	100	0	92	0	0	0	0	0	98	100	5	92	99	0	0
<i>Aerococcus urinae</i>		3	99	24	12	0	52	41	50	92	26	28	0	32	13	56	64	1	1	40	0	0
<i>Aerococcus viridans</i> 1		13	50	96	54	33	16	37	1	5	1	83	33	85	70	83	99	33	41	70	33	1
<i>Aerococcus viridans</i> 2		15	70	50	76	10	20	25	1	5	5	25	1	35	2	70	89	1	5	24	1	5
<i>Aerococcus viridans</i> 3		22	88	99	40	85	48	14	14	1	1	8	2	82	5	91	99	37	99	14	1	1
<i>Alloiococcus otitis</i>		0	25	0	100	0	3	100	1	90	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus avium</i>		99	60	99	94	15	0	24	1	99	0	99	40	100	95	95	99	1	40	15	0	1
<i>Enterococcus durans</i>		100	43	100	97	32	2	76	1	91	100	99	15	2	0	84	76	0	0	56	0	18
<i>Enterococcus faecalis</i>		99	46	99	97	1	0	21	4	99	92	98	1	98	92	92	100	0	1	96	2	1
<i>Enterococcus faecium</i> *		94	43	99	95	42	1	89	1	97	93	85	70	78	18	84	98	15	10	60	3	1
<i>Gardnerella vaginalis</i>		0	95	0	1	0	1	53	0	99	0	46	6	1	0	1	0	0	0	73	53	0
<i>Gemella haemolysans</i>		25	0	0	70	0	0	1	84	40	1	1	0	20	10	5	2	0	0	10	5	1
<i>Gemella morbillorum</i>		3	0	0	35	0	0	10	35	86	4	5	0	1	0	1	11	3	1	16	5	0
<i>Globicatella sanguinis</i>		4	40	98	40	52	16	100	0	9	0	76	95	71	47	76	100	71	95	100	90	0
<i>Granulicatella adiacens</i>		0	0	10	80	0	25	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> ssp cremonis		98	25	41	1	23	0	18	4	88	0	27	0	17	0	97	30	0	15	25	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> ssp lactis		90	40	99	35	3	0	35	3	96	95	95	15	45	1	72	87	4	5	90	3	1
<i>Leuconostoc</i> spp		91	1	60	5	55	0	65	2	70	10	37	35	29	4	35	65	0	42	11	0	0
<i>Listeria</i> spp		97	79	98	0	0	0	0	0	85	0	6	0	0	0	49	92	1	1	72	0	26
<i>Streptococcus agalactiae</i> **		100	99	1	1	4	79	1	96	99	99	98	0	1	1	50	87	0	1	35	4	75
<i>Streptococcus anginosus</i>		100	0	100	0	44	0	1	99	100	100	0	0	33	0	99	88	0	44	97	0	37
<i>Streptococcus bovis</i> I		99	1	100	1	34	2	1	0	100	0	0	1	97	1	100	100	65	98	98	98	1
<i>Streptococcus bovis</i> II 1		100	0	1	0	58	0	0	0	100	0	0	0	0	0	90	0	0	97	97	97	0
<i>Streptococcus bovis</i> II 2		100	2	100	0	89	97	99	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0	72	31	5	0
<i>Streptococcus bovis</i> II 3		99	1	100	0	99	0	6	0	100	0	0	0	0	0	100	6	6	100	93	0	0
<i>Streptococcus bovis</i> II 4		98	1	100	0	97	2	10	0	100	1	1	32	1	1	98	40	84	99	99	97	0
<i>Streptococcus canis</i>		0	1	25	4	95	1	80	100	100	100	100	0	0	0	99	1	0	1	99	0	100
<i>Streptococcus constellatus</i>		100	1	27	0	0	0	5	99	100	100	0	0	0	0	10	72	0	0	12	0	61
<i>Streptococcus dys. ssp dysgalactiae</i>		0	0	1	1	1	99	0	100	99	100	99	0	1	50	86	100	0	1	99	30	2
<i>Streptococcus dys. ssp equisimilis</i>		0	1	25	1	1	99	1	99	100	97	97	1	1	1	45	99	0	1	98	40	94
<i>Streptococcus equi</i> ssp equi		1	0	1	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	1	0	0	100	100	100
<i>Streptococcus equi</i> ssp zooepidemicus		0	1	15	0	0	100	1	99	100	99	85	0	0	99	100	0	0	0	99	99	99
<i>Streptococcus equinus</i>		100	0	95	0	28	0	1	1	100	0	0	0	30	0	25	7	25	15	17	10	0
<i>Streptococcus group L</i>		1	75	1	0	0	100	1	100	100	100	100	0	0	0	75	100	0	0	100	98	94
<i>Streptococcus intermedius</i>		100	0	87	0	0	0	44	99	100	100	0	0	0	0	99	99	3	3	99	0	40
<i>Streptococcus mitis</i> 1		1	0	3	1	21	0	25	35	99	19	14	1	0	1	94	7	3	26	67	5	0
<i>Streptococcus mitis</i> 2		0	0	3	0	31	0	35	50	100	99	1	0	1	0	100	1	1	31	84	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>		99	0	99	1	64	0	1	1	100	18	0	0	99	90	90	100	81	81	1	0	1
<i>Streptococcus oralis</i>		0	0	1	1	50	0	46	72	100	5	1	0	1	0	99	32	1	72	96	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		0	0	39	60	70	3	79	3	100	57	3	1	0	0	99	98	64	87	84	10	1
<i>Streptococcus porcinus</i>		100	5	99	1	19	99	1	97	97	100	98	0	88	88	83	99	0	0	50	0	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>		0	1	5	98	0	15	0	100	100	99	0	0	8	1	99	98	0	1	61	22	96
<i>Streptococcus salivarius</i>		85	0	98	1	8	0	70	20	100	0	0	0	5	1	96	67	34	88	74	1	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>		0	1	42	0	63	0	1	5	100	90	0	0	1	48	83	98	33	55	67	0	0
<i>Streptococcus suis</i> I		0	1	62	53	80	94	76	1	100	91	0	0	7	0	94	100	75	0	100	89	0
<i>Streptococcus suis</i> II		0	1	70	41	91	91	52	3	100	95	0	0	3	1	99	98	63	93	99	96	2
<i>Streptococcus uberis</i>		99	98	100	35	10	86	5	30	100	98	98	0	99	98	99	99	87	10	50	20	0

* si / if / wenn / se / čdy / om / hvis / gdy : *Enterococcus casseliflavus* / *VancoR* / *VanR* / *VAN* = R : { *Enterococcus casseliflavus* / *or* / *or* / *od* / *o* / *n* / *eller* / *lub* / *Enterococcus gallinarum* } possible / möglich / posible / possibile / postivel / πιθανόν / möglich / mulig / możliwość.
 ** Voir § Limites du test / See § Limitations of the method / Siehe § Limitierungen / Ver § Limites del método / Vedere § Limiti del metodo / Consultar § Limites do teste / Βλέπε § Περιορισμοί Μεθόδου / Se avsnittet "Metodens begränsningar" / Se § Metodens begränsninger / Patrz § Ograniczenia testu

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle		Bleu foncé/Violet	
				4 h	24 h	4 h	24 h
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β-glucosidase (ESCuline)	Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique-β-naphtylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
αGAL	6-bromo-2-naphtyl-αD-galactopyranoside	0,0376	α-GALactosidase	Incolore		Violet	
βGUR	acide naphтол-ASBI-glucuronique	0,0537	β-GIUcRonidase	Incolore		Bleu	
βGAL	2-naphtyl-βD-galactopyranoside	0,0306	β-GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine-β-naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
				4 h	24 h	4 h	24 h
<u>RIB</u>	D-ribose	1,4	acidification (RIBose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	acidification (ARABinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>SOR</u>	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>LAC</u>	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACTose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>TRE</u>	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>INU</u>	inuline	5,12	acidification (INULine)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>RAF</u>	D-raffinose	3,12	acidification (RAFfinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>AMD</u>	amidon (2)	2,56	acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>GLYG</u>	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

(1) Lors d'une deuxième lecture après 24 heures d'incubation, on peut remarquer un dépôt dans les tubes où ont été ajoutés les réactifs ZYM A et ZYM B. Ce phénomène est normal et ne doit pas être pris en considération.

(2) L'acidification de l'amidon est fréquemment moins forte que celle des autres sucres.

(3) Une coloration rose pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. III
TABLE DES SYMBOLES	p. IV



bioMérieux® sa
au capital de 11 879 045 €
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France

Le logo est une marque déposée et protégée qui est la propriété exclusive de bioMérieux sa ou de l'une de ses filiales.