

MASTER 1 ICMV année 2013-2014
TRAVAUX PRATIQUES UE2-3 Pathologies Infectieuses

➤ **J1**

1) Evaluer la virulence de deux souches de *S. aureus*

Tests comparatifs *in vitro*

2 souches par binôme A et B en bouillon

- isolement sur gélose TS et faire une strie des 2 souches sur une même boîte au sang

Tests comparatifs *in vivo*

1 boîte NGM (nematode growth medium) contenant les nématodes

2 boîtes contenant les souches A et B (gélose TS+acide nalidixique 5µg/ml)

1 boîte témoin avec *E. coli* OP50

A partir de la boîte contenant les nématodes, transférer délicatement 10 vers sur chacune des 2 boîtes fournies, 6 vers sur la boîte témoin. Vérifier que les nématodes sont toujours vivants après transfert (mouvements)

2) Recherche de Mycobactéries

Recherche de mycobactéries dans **un prélèvement** pathologique d'**expectoration** (E1 à E10)

- Colorations de Kinyoun et de Gram
- Faire un réisolement sur gélose chocolat

3) Infections digestives

1 bouillon (coproculture) par binôme : D1 à D10

- Gram, état frais, isolement sur gélose Drigalski, Hektoen et TS

➤ **J2**

1) Evaluer la virulence de deux souches de *S. aureus*

Tests comparatifs *in vitro*

Lecture des milieux, effectuer un test coagulase sur les deux souches.

Tests comparatifs *in vivo*

Dénombrer les nématodes vivants sur chaque boîte

2) Recherche de Mycobactéries

A partir d'une colonie ayant poussé sur gélose chocolat, ensemercer un Kligler-Hajna

3) Infections digestives

Lecture des milieux Hektoen et Drigalski et identification de 2 souches :

- Choisir 1 colonie lactose- H₂S⁺ et l'ensemencer sur :
1 Kligler-Hajna, 1 urée-indole, 1 mannitol-mobilité
- Ensemencer 1 autre type de colonie (lac⁺ ou -) sur :
1 Kligler-Hajna, 1 urée-indole, 1 mannitol-mobilité

➤ J 3

1) Evaluer la virulence de deux souches de *S. aureus*

Tests comparatifs *in vivo*

Dénombrer les nématodes vivants sur chaque boîte et tracer une courbe de mortalité pour chaque souche.

Faire une conclusion générale sur l'ensemble de vos observations et interpréter les résultats obtenus sur les 2 souches.

2) Recherche de Mycobactéries

Interprétation du Kligler-Hajna. Identification ou orientation sur l'espèce bactérienne.

Conclusion générale

3) Infections digestives

Lecture des milieux

Kligler-Hajna, urée-indole, mannitol-mobilité : identification de l'espèce.

Sérotypage des Salmonelles :

Tableau de Kauffmann-White :

- 1) Recherche de l'antigène Vi: en fonction des résultats déterminer l'AgO et l'Ag H ou mettre au bain -marie 10 min à T° max.
- 2) Détermination de l'Ag O : rechercher une agglutination granulaire.
- émulsionner une colonie provenant du Kligler sur une lame avec 1 goutte de sérum polyvalent OMA ; idem avec OMB.
OMA : groupes ABDEL
OMB : groupes CFGH

- **en fonction des résultats obtenus avec les sérums polyvalents**, émulsionner avec 1 goutte des sérums monovalents O4,5, O9, O3,10,15 et/ou O6,7,8.

3) Détermination des antigènes H

Tester les sérums Hi, Hg, m, Hb, Hc et/ou Hd en fonction des résultats de l'Ag O : Prélever les bactéries dans l'eau de condensation du tube Kligler. On recherche une agglutination floconneuse et rapide.

Donner l'ensemble de vos résultats : Etat frais , Gram, tests biochimiques...

Conclure

FICHES TECHNIQUES

1) Coloration de Kinyoun

- **principe**

La fuschine colore toutes les bactéries.

L'acide sulfurique agit comme décolorant : les mycobactéries ont la propriété de ne pas se décolorer.

Le bleu de méthylène est un colorant de contraste.

Kinyoun : fuschine + phénol + alcool

Gabett : bleu de méthylène + acide sulfurique + alcool

- **Mode opératoire :**

-réaliser un étalement en couche mince (2 gouttes de bouillon)

-laisser sécher

-fixer à l'éthanol : recouvrir la lame d'alcool et attendre 10 à 15 minutes jusqu'à évaporation complète.

-recouvrir l'étalement avec la solution de Kinyoun, laisser en contact 5 minutes

-rincer doucement à l'eau pendant 30 secondes.

-recouvrir avec la solution de Gabett

-laisser en contact 6 mn. Rincer doucement à l'eau

-sécher

2) Les coques Gram+

2-1) famille des MICROCOCCACEAE

Espèces	catalase	oxydase	Type respiratoire	Coagulase libre	mannitol	DNase
<i>Micrococcus spp</i>	+	+(ou -)	AS	-	-	+ ou -
<i>S. aureus</i>	+	-	AAF	+	+	+
<i>S. saprophyticus</i>	+	-	AAF	-	+	-
<i>S. epidermidis</i>	+	-	AAF	-	-	- ou(+)

2-2) famille des STREPTOCOCCACEAE

Genres : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*,...

Type respiratoire : AAF, anaérobie préférentiel, croissance favorisée par CO₂

espèces	Catalase	Capsule	Oxydase	Hémolyse	Groupe de Lancefield	Aspect macroscopique
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	β	A	Petites colonies S Translucides
<i>S. agalactiae</i>	-	-	-	β	B	
<i>S. equi</i>	-	-	-	β, γ	C	
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	γ	D	
<i>S. sanguis</i>	-	-	-	α, γ	non groupable/H	
<i>L. lactis</i>	-	-	-	γ	N	
<i>S. salivarius</i>	-	-	-	α, γ	non groupable/K	
<i>S. pneumoniae</i>	-	+	-	α	non groupable/C	Idem + ombiliquée après 48 H

3) les bacilles Gram-

Pour les caractères biochimiques des bacilles Gram -, consulter et apporter les poly de L3 et de TP d'UE2 (interactions hôte/micro organismes) du M1, savoir le TD métabolisme de L3.

	Oxydase	Catalase	Type Respiratoire	Ciliature	Culture Sur TS	Aspect au Gram
Famille des Entérobactéries	-	+ (ou -)	AAF	Péritriche ou immobile	+	Polymorphe Coloration Bipolaire
<i>Pseudomonas</i>	+ (-)	+	AS	Pôlaire	+	
<i>Vibrio</i>	+	+	AAF	Pôlaire	+	Incurvé
<i>Aeromonas</i>	+	+	AAF	Péritriche	+	
<i>Acinetobacter</i>	-	+	AS	Immobile	+	Coccobacille par 2
<i>Campylobacter</i>	+	+ ou -	MA	Pôlaire	-	Spiralé
<i>Alcaligenes</i>	+	+	AS	Péritriche	+	
<i>Flavobacterium</i>	+	+	AS	Immobile	+	
<i>Brucella</i>	+	+	AS	Immobile	-	coccobacille
<i>Bordetella</i>	+ (ou -)	+	AS	Immobile	-	Petit bacille
<i>Francisella</i>	+	+ faible	AS	Immobile	-	Petit bacille
<i>Pasteurella</i>	+ ou -	+ (ou -)	AAF	Immobile	+	Petit bacille
<i>Haemophilus</i>	+ faible et lente	+ ou (-)	AAF	Immobile	-	Petit bacille fin polymorphe

Caractères des vibrions

	ONPG	Mannitol	Saccharose	Croissance sur TS
<i>V. cholerae</i>	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	-	-
<i>V. mimicus</i>	+	+	-	+

Espèce	mobilité	Exigence en Facteur X (hémine)	Exigence en facteur V (NAD)	Hémolyse sur sang frais et/ou chocolat
<i>H. influenzae</i>	-	+	+	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	+	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	-	+	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	-	+	-
<i>Pasteurella multocida</i>	-	-	-	-

4) Les coques Gram – aérobies stricts

Espèces	catalase	oxydase	Culture sur Milieu ordinaire	Hémolyse	Capsule	Glucose
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Branhamella catarrhalis</i> Gram variable !	+	+	+	-	-	-

4) Composition des milieux

- Composition gélose Hektoen :

Peptone, levure, NaCl, thiosulfate de sodium, sels biliaires, citrate de fer ammoniacal, salicine, lactose, saccharose, fuschine acide, bleu de bromothymol, agar.

NB : Le test oxydase n'est pas valable sur le milieu Hektoen.

Milieu sélectif permettant les isolement et différenciation des entérobactéries pathogènes (Salmonelles, Shigella...)

Principe de sélection :

L'inhibition de la flore à Gram positif est due à la présence des sels biliaires qui peuvent également inhiber légèrement la croissance de quelques souches de microorganismes à Gram négatif.

-En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies.

-Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en jaune orangé les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose-négatif.

Caractéristiques	Microorganismes
Colonies jaune saumon	<i>Escherichia coli, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Arizona, Serratia</i>
Colonies jaune saumon à centre noir	<i>Proteus vulgaris</i>
Colonies vertes à centre noir	<i>Proteus mirabilis, Salmonella</i>
Colonie vertes ou bleuâtres	<i>Shigella, Salmonella, Providencia, Proteus morgani, Proteus rettgeri</i>
Petites colonies bleues ou brunâtres	<i>Pseudomonas (oxydase positive)</i>

- Composition gélose Drigalski :

Peptone, extrait de viande, extrait de levure, désoxycholate de sodium, lactose, cristal violet, bleu de bromothymol, agar.

Les vibrions halophiles poussent sur Hektoen mais pas sur Drigalski. Les vibrions halotolérants (*V. cholerae* et *V. mimicus*) poussent sur tous les milieux.