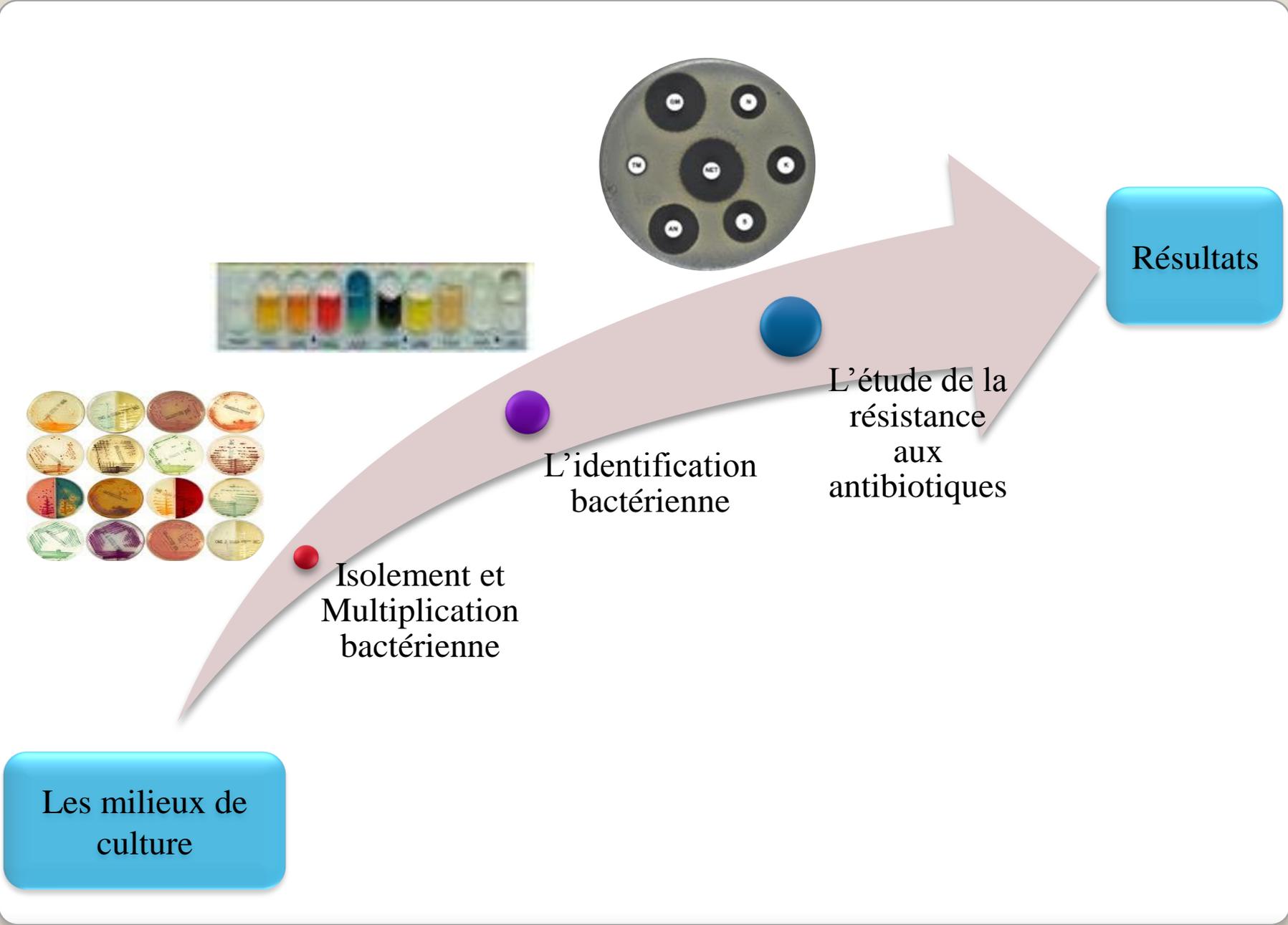


Chapitre 2 : Les techniques analytiques de laboratoire médical relevant de la microbiologie/ bactériologie.

- I. les principes liés aux différentes techniques de stérilisation applicables à la microbiologie**
- II. Techniques d'examen microscopique**
- III. Utilisation des milieux de cultures**
- IV. Identification biochimique**
- V. Les antibiotiques et l'antibiogrammes**





C'est quoi un milieu de culture???

Nature:

Liquide, Solide (Agar-Agar polysaccharide complexe provenant d'algue marine ou gélatine);

Disponibilité:

milieux déshydratés. Flacons, tubes, Boites Pétri,

✓ **Attention aux précautions d'emplois**



Mélange de substances nutritives:

Acides aminés; Peptides; Bases nucléique; Sucres;

Système tampon maintenant:

le pH; les sels minéraux; les vitamines;

Autres facteurs de croissance:

Sang; protéines; Hémoglobine; Vitamine;

Les principaux produits utilisés

Les extraits de viande, les peptones et hydrolysats, les extraits de levure, l'agar-agar ou la gélose.

Les produits biologiques :sang de mouton ou de cheval, bile de bœuf, gélatine, sérum de cheval ou de bœuf....

Milieu de base

Gélose nutritive
Gélose Tryptone Soja
Gélose de base
Columbia
Gélose au sang frais

- 3 composants principaux : **les peptone** (des hydrolysats enzymatiques de protéines animal ou végétale riche en AA et en peptide), **extrait de viande** (sels minéraux, vitamines, protéine peu dégradées, glucides) et **extrait de levure** (AA, vitamines hydrosolubles)+chlorure de sodium à 5g/l.

Milieu enrichi

Gélose au sang cuit

Additionnés de diverses substances ‘sérum, œuf, sang, vitamine, viande. Etc.’

Milieu sélectif

Géloses: Mac Conkey,
Hektoen, Cétrimide, EMB,
SS, Chapman, Braid Parker,

- Additionnés de chlorure de sodium à forte concentration, de thiosulfate de sodium, d'antibiotiques, antiseptique, colorant qui inhibent les bactéries sensibles à ces éléments.

Milieux d'isolement
Gélose

Choix d'un milieu de culture

Type de prélèvement

Physiologiquement stérile
LCR, hémocultures, urines

Physiologiquement polymicrobien
Selles, crachats, PV ...

Exigence bactérienne

Non exigeante Exigeante Non exigeante Exigeante

Critères d'identification

Milieu non sélectif non enrichi Milieu non sélectif enrichi Milieu sélectif non enrichi Milieu sélectif enrichi

Lactose Hémolysé Lactose Lactose H₂S Hémolysé

BCP, CLED ...
Gélose au sang
Entérobactéries
Strepto A, Strepto B, Pncumo, Listeria ...

Gélose chocolat
H. influenzae
Neisseria spp

Mac Conkey Drigalski
Hektoën SS
Entérobactéries

Gélose au sang + ANC, +CAP ...
Chocolat +VCAT, +BAV...
GRAM +
Gonocoque, *H. influenzae*

Les bactéries
à Gram +/-

Gélose au sang frais → 'Sang de mouton ou de cheval'

Un milieu peu enrichi pas sélectif sur le quel les streptocoques se développent bien. ➤ Caractère hémolytique 'halo claire'

halo parfaitement
clair transparent
autour de la
colonie

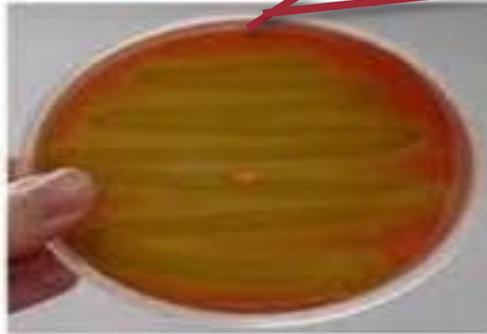


Beta Hemolysis

Hémolyse complète

Streptocoques des
groupes A, B, C, G, F

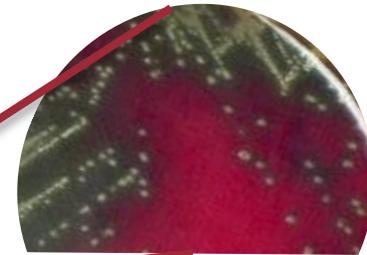
halo + petit à bords
irréguliers, souvent
verdâtre



Alpha Hemolysis

Hémolyse partielle

Streptocoques « non
groupables » dont *S.
pneumoniae*



Gamma Hemolysis

Absence d'hémolyse

autres
streptocoques et
entérocoques

Les bactéries
à Gram – et +

Gélose chocolat (au sang cuit)

Sang de mouton ou de cheval
+ vitamines (Polyvitex®)

Un milieu enrichi pas sélectif sur le quel les bactéries du genre *Haemophilus* se développent bien.

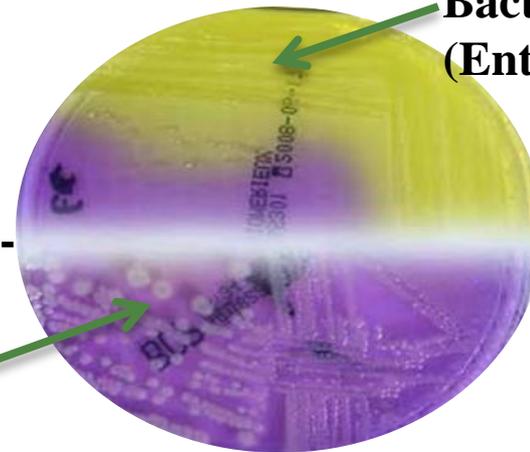


Gélose BCP

Un milieu qui permet l'isolement de nombreuses espèces, caractérisé par un critère de différenciation ➤ fermentation du lactose



Bactérie Lactose-
(*Pseudomonas*,
Staphylococcus,
Enterococcus)



Bactérie Lactose+
(Entérobactéries)

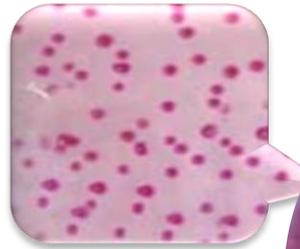
Les bactéries
à Gram -

Gélose Mac Conkey

Inhibiteur : sel biliaire et cristal violet



Gélose Mac Conkey



Bacilles Gram-
Lactose +



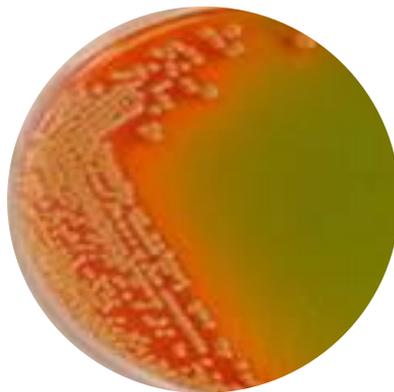
Bacilles Gram-
Lactose -

Gélose Hektoen

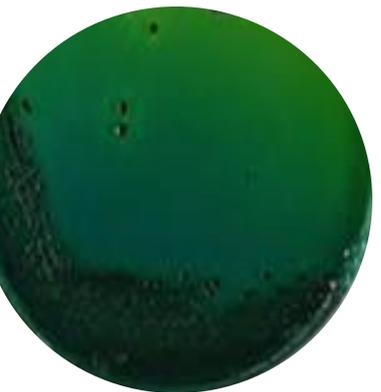
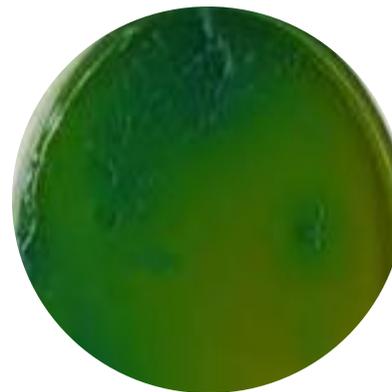
Inhibiteur des Gram+ : Bleu de bromothymol et la fuchsine acide



Bacilles Gram-
Lactose + H2S-



Bacilles Gram-
Lactose - H2S -

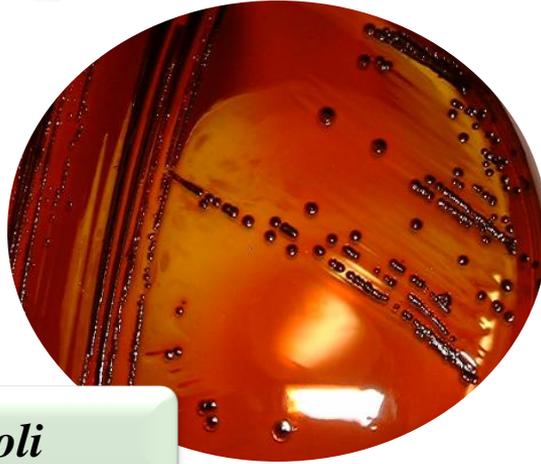


Bacilles Gram-
Lactose - H2S+

Les bactéries
à Gram -

Gélose EMB

Inhibiteurs: Eosine et bleu de méthylène



E. coli



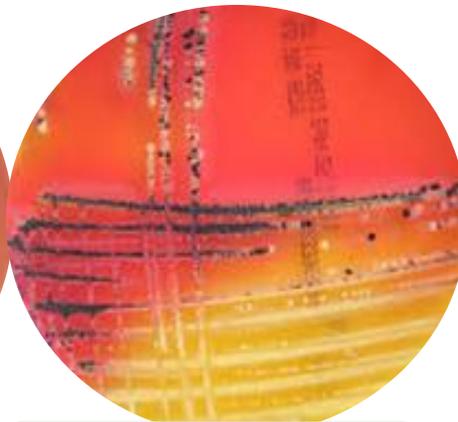
Salmonella sp.

Gélose SS : *Salmonella-Shigella*

Inhibiteurs: Sels biliaires, vert brillant, citrate de sodium à forte concentration



Milieu SS



Mélange des
Bacilles Gram-



Bacilles Gram-
Lactose – H₂S +
Salmonella sp.



Bacilles Gram-
Lactose – H₂S-
Shigella sp.

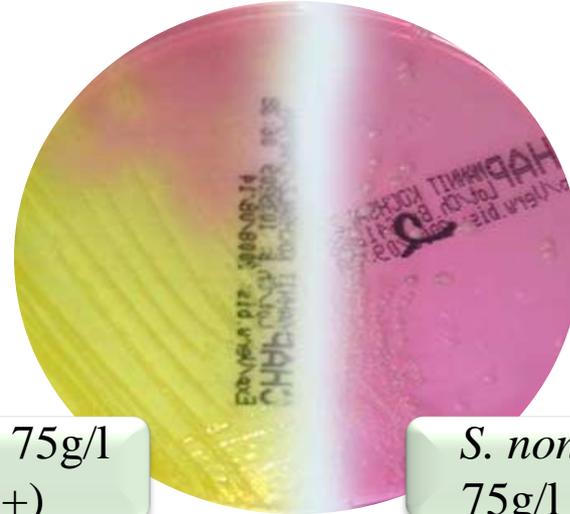
Les bactéries à
Gram +
*Staphylococcus
aureus*

Gélose Chapman

Inhibiteur : Chlorure de sodium à très forte
concentration



S. aureus (NaCl 75g/l
R, Mannitol +)



S. non aureus (NaCl
75g/l R, Mannitol -)

Gélose Braid Parker

Inhibiteur : Chlorure de lithium et tellurite de potassium



Réduction de tellurite en tellure
Protéolyse (halo clair)
Activité lécithinase (tour opaque)

**milieu de
culture + ATB**

Gélose Cétrimide

Antiseptique : bromure de N-cétyl-N, N, N-triméthylammonium
Antibiotique: acide nalidixique



***P. aeruginosa* pigmentation verte et pyocyanique**



Autres milieux
de culture +
ATB

Pour *Brucella* ➤ la gélose de base **Columbia** additionnée de 5 à 10% de sérum de cheval décomplémenté et 1% de glucose est rendue sélectives par addition:
➤ d'antibiotiques ➤ **Polymyxine B, bacitracine, acide nalidixique, nystatine, vancomycine**

Pour *Neisseria* pathogène 'gonocoques et méningocoques' ➤ les gélose **enrichies** rendues sélectives par addition: ➤ d'antibiotiques ➤ **VCN: Vancomycine, colistine, nystatine** ou **VCNT Vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime** ou **VCAT: Vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime**

La température d'incubation (Etuve), l'aérobiose et l'anérobiose « jarres anaérobies » et la durée dépend de la bactérie recherchée

Techniques d'ensemencement

Sur milieu solide en boîte

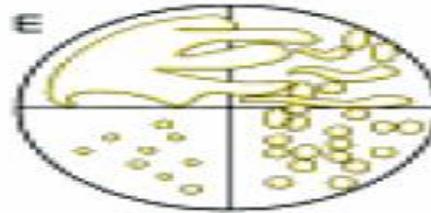
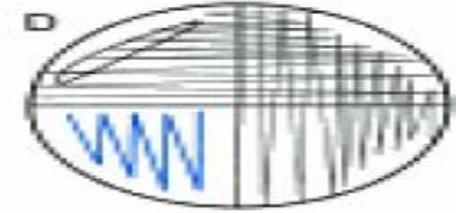
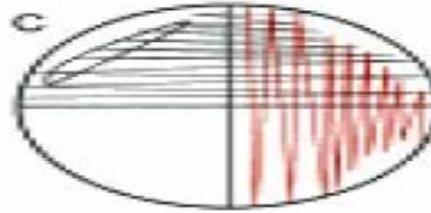
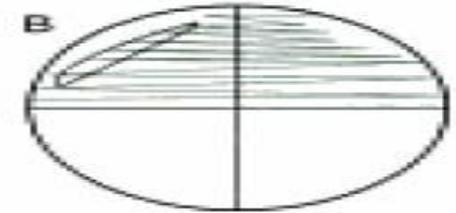
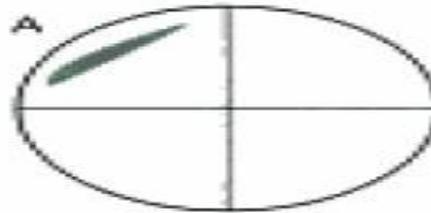
La méthode de 4 quadrants

Isolement des différentes bactéries à partir d'un mélange poly-microbiens.

la morphologie

Oriente vers une famille, un genre voire une espèce précise

Poursuivre l'analyse par des tests d'identifications et antibiogramme



Une subculture ou repiquage est nécessaire pour l'obtention d'une culture pure et avoir un inoculum suffisant pour les tests à effectuer

Ensemencement pour dénombrement des bactéries

Une appréciation semi-quantitative de la quantité de bactéries présentes.

Ensemencement en stries

Estimation de la quantité de bactéries dans les urines

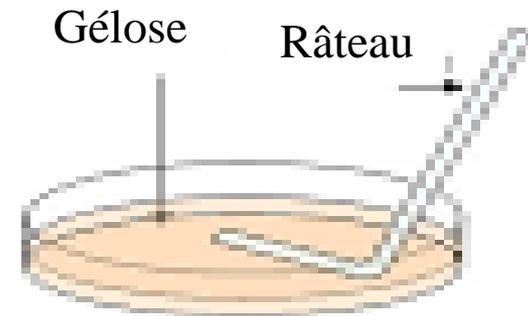
Par des stries serrées bord à bord



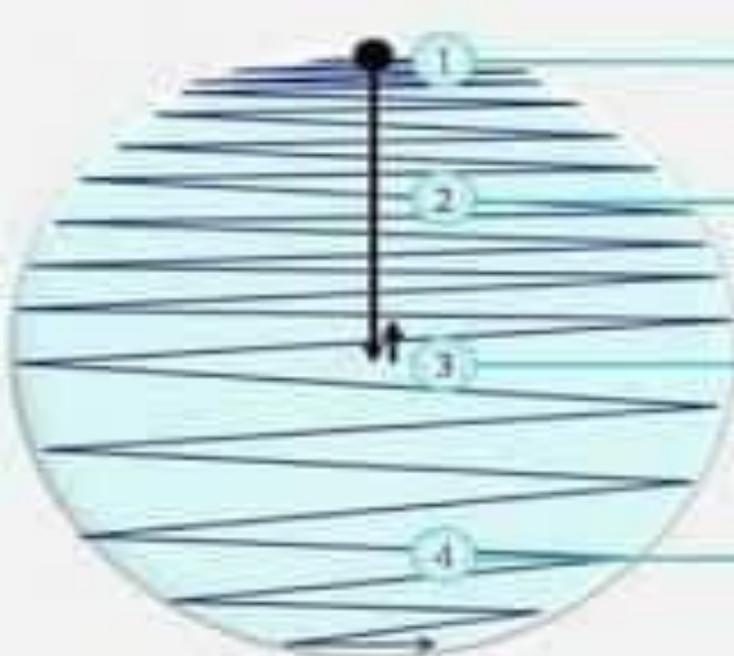
Ensemencement par la technique du râteau

La suspension bactérienne peut être de 50, 100 ou 200 μ l

L'étalement se fait sur la totalité de la boîte



L'ensemencement en spirale est une technique automatisé par un appareil permet d'étalement un volume donné du centre de la boîte jusqu'au bord

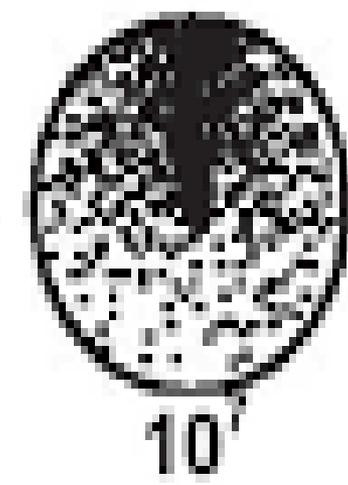
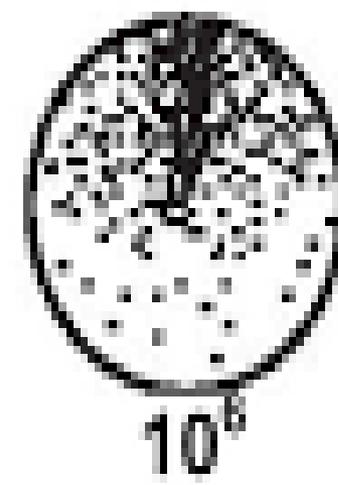
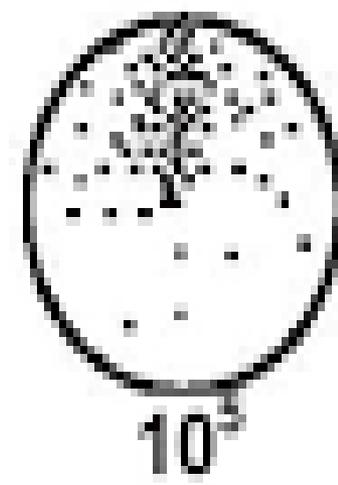
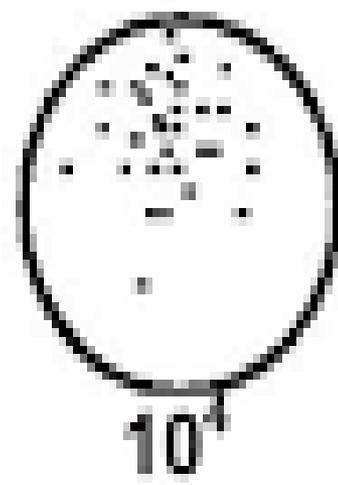


Décharger l'anse de 10 μ l

Tirer une verticale jusqu'au milieu de la boîte

Remonter légèrement pour décharger entièrement le prélèvement

Faire des stries horizontales en partant du point de dépôt.



Prélèvement urinaire

Techniques d'ensemencement

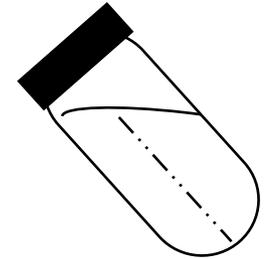
Sur milieu solide en tubes

Milieu incliné

- En strie longitudinale en strie médiane, en nappe, en touches sur la pente de la gélose



Ce procédé est utilisé pour la subculture des colonies isolées ou des cultures pures



- En strie transversale en surface sur la pente de la gélose



l'isolement des diverses espèces constitutives d'un mélange ou pour vérifier la pureté d'une culture



Milieu en culot

Ensemencement en piqûre

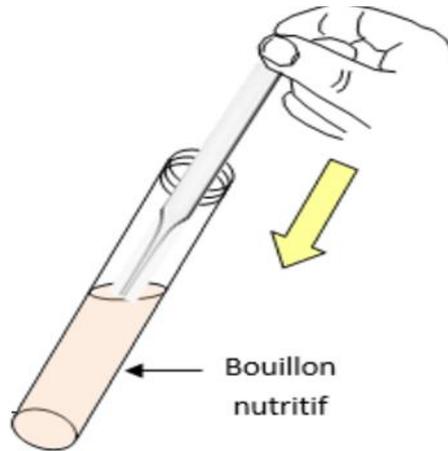


Techniques d'ensemencement

des milieux liquides

Les milieux liquides d'enrichissement ➤ Produit à analyser

Les milieux liquides d'identification ➤ Bactéries isolées en colonies pures ou en suspension



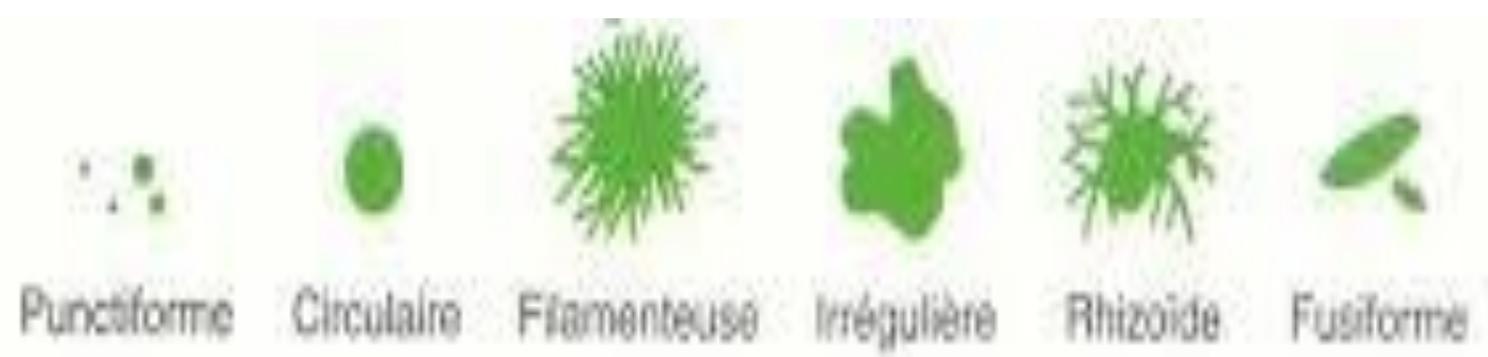
➤
Turbidité plus ou moins abondante.
Formation d'une pellicule à la surface du bouillon.
Dépôts de cellules au fond du tube.

Techniques d'ensemencement

Un examen à l'œil nu de boîtes de Pétri afin d'observer et noter l'aspect des colonies à savoir :

- Élévation des colonies** ➤ Plates, surélevées, bombées, colonies à centre ombiliqué, ...
- Contours des colonies** ➤ Lisses ou irréguliers, circulaire, ondulée, amiboïde,...
- Taille des colonies** ➤ Elle varie de 1/10e de mm à plus de 1cm
- Chromogénèse** ➤ Couleur du pigment, soluble ou insoluble dans le milieu.
- La surface des colonies** ➤ des colonies, brillantes, sèches, poudreuses, plissées, muqueuses, ... * Les colonies lisses « S » (Smooth) = pathogènes, des colonies rugueuses « R » (Rough) = saprophytes.
- L'opacité des colonies:** ➤ Colonies transparentes, translucides, opaques,...
- La consistance** ➤ Colonies à consistance granuleuse ou visqueuse.
- L'odeur** ➤ Présence ou absence

Forme



Élévation



Bord

