

TP MGF : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE BACTÉRIES

1. JOUR 1

1.1. ÉTUDE D'UN MÉLANGE POLYMICROBIEN

À partir des documents et du mélange bactérien « M » fournis, réaliser:

- Une coloration de Gram.
- Des isollements par la méthode des quadrants sur les milieux suivants :
 - gélose BCP (gélose lactosée au bromocrésol pourpre).
 - gélose Chapman.
 - Gélose Drigalski.
- Incuber les géloses ensemencées et identifiées pendant 24 heures à l'étuve à 37°C.

1.2. IDENTIFICATION D'UN BACILLE GRAM NÉGATIF

À partir des documents et de la souche pure présentée sur gélose notée « B + numéro » fournis :

- Réaliser un test de pré-orientation de recherche de l'oxydase.
- Ensemencer une galerie miniaturisée API 20 E (système miniaturisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles Gram -).
- Réaliser un isolement sur gélose nutritive ordinaire (GN ou GNO) pour contrôler la pureté de la souche.
- Incuber les géloses ensemencées et identifiées pendant 24 heures à l'étuve à 37°C.

1.3. IDENTIFICATION D'UN COQUE GRAM POSITIF

À partir des documents et de la souche pure présentée sur gélose Chapman notée « C » fournis :

- Réaliser un test de pré-orientation de recherche de la catalase.
- Procéder à un test d'identification rapide de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

2. JOUR 2

2.1. ÉTUDE D'UNE MÉLANGE POLYMICROBIEN

- Réaliser l'observation macroscopique des colonies obtenues sur les différents milieux ensemencés.
- Conclure.

2.2. IDENTIFICATION D'UN BACILLE GRAM NÉGATIF

- Contrôler la pureté de la souche utilisée par lecture de la gélose nutritive ordinaire.
- Révéler la galerie API 20 E.
- Identifier l'espèce bactérienne par démarche dichotomique, et par démarche probabiliste.

TP MGM : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE BACTÉRIES

COMPTE-RENDU

NOM – Prénom :

1. ÉTUDE D'UN MÉLANGE POLYMICROBIEN

1.1. ÉTUDE MICROSCOPIQUE DU MÉLANGE BACTÉRIEN M

Schéma	Micro-organisme	1	2	3
	Morphologie			
	Taille			
	Groupement			
	Coloration			
<u>Titre :</u>	Proportion			

1.2. EXAMEN MACROSCOPIQUE DES COLONIES OBTENUES APRÈS ISOLEMENTS

✓ Rappeler dans le tableau les caractéristiques des milieux ensemencés :

	Gélose BCP	Gélose Chapman	Gélose Drigalski
Couleur initiale			
Agent(s) sélectif(s)			
Bactéries sélectionnées			
Glucide (ou dérivés)			
Indicateur de réaction			

✓ Décrire les colonies obtenues sur les milieux ensemencés :

	Colonies 1	Colonie 2	Colonie 3
Gélose BCP			
Gélose Drigalski			
Gélose Chapman			

✓ Conclure.

2. IDENTIFICATION D'UN BACILLE GRAM NÉGATIF**SOUCHE N° :**

✓ Compléter le tableau de résultats suivant :

Milieu	Test	Observation	Interprétation
X	Coloration de Gram	bactéries en forme de bâtonnets, roses, isolés	Bacille Gram -
GNO (1)	Recherche de l'oxydase		
Pré-orientation :			
GNO (2)	Vérification de la pureté		
Conclusion :			
Galerie miniaturisée API 20 E			
Conclusion :			

- ✓ À partir des résultats obtenus et consignés dans le tableau précédent, construire l'arbre dichotomique d'identification de la souche étudiée.

- ✓ Compléter la fiche d'identification de la galerie miniaturisée API 20 E avec le code d'identification, la souche identifiée et le pourcentage d'identification.

ONPG	<u>ADH</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u>CIT</u>	H ₂ S	<u>URE</u>	TDA	IND	<u>VP</u>	<u>GEL</u>	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4

Identification :

% d'identification :

- ✓ Commentaires éventuels :

3. IDENTIFICATION D'UN COQUE GRAM POSITIF

- ✓ Compléter le tableau de résultats suivant :

Milieu	Sélectivité / Test	Observation	Interprétation
	Coloration de Gram	bactéries rondes, violettes, isolés, en grappes	Coque Gram +
Gélose Chapman	Recherche de la catalase		
Conclusion :			
X	Recherche de la protéine A et du récepteur au fibrinogène (test d'agglutination Slidex Staph Kit)	Schéma :	
Conclusion :			

- ✓ À partir des résultats obtenus et consignés dans le tableau précédent, construire l'arbre dichotomique d'identification de la souche étudiée.

TP MGM : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE BACTÉRIES**DOSSIER SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE**

- Fiche n°1 : Morphologies bactériennes et modes de groupement
- Fiche n°2 : Coloration de Gram
- Fiche n°3 : Milieux de base
- Fiche n°4 : Gélose BCP (gélose lactosée au bromocrésol pourpre)
- Fiche n°5 : Gélose Chapman
- Fiche n°6 : Gélose Drigalski
- Fiche n°7 : Examen macroscopique des colonies
- Fiche n°8 : Tests de pré-orientation : oxydase et catalase
- Fiche n°9 : Galerie d'identification miniaturisée API 20 E
- Fiche n°10 : Démarche dichotomique d'identification de certaines espèces d'entérobactéries à partir du caractère « Lactose »
- Fiche n°11 : Démarche dichotomique d'identification de certaines espèces d'entérobactéries à partir du caractère « TDA »
- Fiche n°12 : Méthode d'identification par méthode probabiliste
- Fiche n°13 : Démarche dichotomique d'identification des coques Gram+, catalase +
- Fiche n°14 : Identification rapide de *Staphylococcus aureus* par recherche de la protéine A et du récepteur au fibrinogène par test d'agglutination
- Fiche n°15 : Démarche dichotomique d'identification des coques Gram +, catalase -

FICHE N°1 : MORPHOLOGIES BACTÉRIENNES ET MODES DE GROUPEMENT

Formes sphériques : coques	Formes allongées
<p>★Forme ronde : ● Ex. : <i>Staphylococcus</i></p> <p>★Forme ovale (ovoïde) : ● Ex. : <i>Streptococcus</i></p>	<p>★ Formes droites :</p> <p>court ■ Long ■■</p> <p>épais ■■ fin —</p> <p>Bouts ronds ●● bouts carrés ■■</p> <p>Coccobaccille ● Fusiforme ●</p> <p>★ Formes particulières</p> <p>➤ Forme incurvée) ex : <i>Vibrio</i></p> <p>➤ Forme spiralée ~ ex : <i>Treponema</i></p>
<p>★Mode de groupement :</p> <p>➤ isolé ● ●</p> <p>➤ par deux (diplocoques) ●●</p> <p>➤ En flamme de bougie ●● ex. : <i>Streptococcus pneumoniae</i></p> <p>➤ En grain de café ●● ex. : <i>Neisseria</i></p> <p>➤ Par quatre : tétrade ●●●● ex : <i>Micrococcus</i></p> <p>➤ En amas ●●●●●●●●</p> <p>➤ En chaînette ●●●●●●●●</p>	<p>★ Modes de groupement :</p> <p>➤ isolés ■ ■■ ■■</p> <p>➤ diplobacille ■■</p> <p>➤ En amas ■■</p> <p>➤ En chaînette ■■■■■■</p> <p>➤ En palissade ■■■■</p>

FICHE N°2 : COLORATION DE GRAM

Coloration de base de la bactériologie, découverte d'une manière fortuite par M. GRAM en 1883.

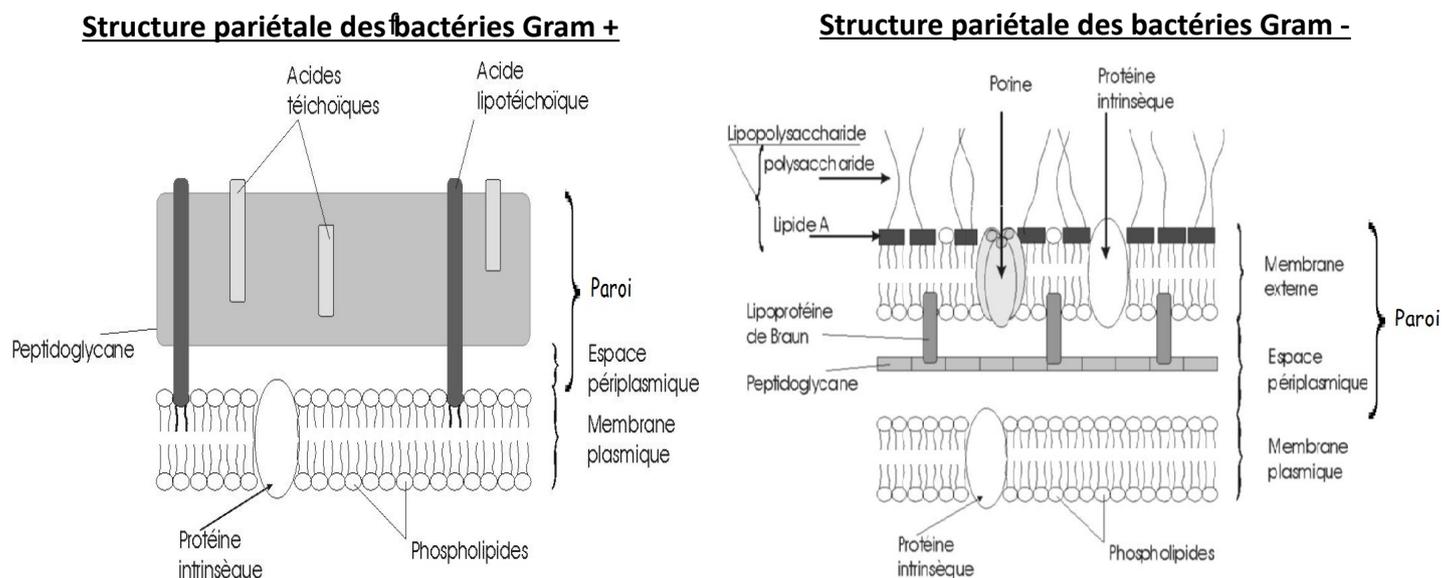
1. BUT

Faire une orientation vers un groupe bactérien, famille ou genre = **1^{ère} étape de la démarche d'identification.**

2. PRINCIPE

C'est une coloration **double, différentielle.**

Elle dépend de la composition chimique de la paroi de la bactérie et, par conséquent, la dissolution par l'alcool plus ou moins rapide des complexes colorés formés.



- 1) Les **bactéries fixées sur le frottis** sont imprégnées d'un premier colorant : le **violet de gentiane** ou le **cristal violet**.
- 2) Le colorant est fixé par un "**mordant**" : le **lugol** (= étape de mordantage : technique qui renforce la coloration par formation d'un précipité).
- 3) On fait agir un décolorant : l'**alcool**. C'est l'étape de **différenciation** :
 - **Les bactéries Gram + résistent à cette décoloration** : l'épaisse couche de peptidoglycane qui constituent leur paroi retient davantage le colorant. Les bactéries apparaissent colorées en **violet**.
 - **Les bactéries Gram – ont une paroi désorganisée par l'alcool** : elles **sont décolorées**.
- 4) Pour rendre visibles les bactéries Gram – décolorées par l'alcool, on utilise un **second colorant** ayant une teinte contrastante, rose : la **fuschine** ou la **safranine**. Les bactéries Gram – apparaissent colorées en **rose**.

3. TECHNIQUES

3.1. RÉALISATION D'UN FROTTIS

La réalisation du frottis est une étape préalable à la coloration. Elle s'effectue en trois temps :

1) **Étalement de la préparation :**

- Utiliser une lame propre, sèche et dégraissée.
- Étaler une goutte de suspension bactérienne en un film mince et régulier par mouvement régulier et circulaire à l'aide de l'anse.
- Faire un étalement de 2 à 3 cm de diamètre en décrivant des spirales partant du centre vers l'extérieur puis de l'extérieur vers le centre sans trop appuyer.

2) **Séchage du frottis :**

- Sécher le frottis à proximité du bec électrique. Il est sec lorsqu'il a un aspect mat.

3) **Fixation du frottis :**

C'est le procédé qui consiste à **tuer les bactéries sans altérer la structure** et à les **fixer sur la lame**.

- Verser sur la lame de l'alcool à 90° (ne pas verser l'alcool directement sur le frottis mais le recouvrir lentement, et ne pas faire déborder pour ne pas lessiver le frottis).
- Laisser en contact 3 minutes.
- Égoutter l'alcool restant.
- Rincer à l'eau distillée à l'aide de la pissette.
- Laisser sécher la lame à proximité du bec électrique.

3.2. COLORATION DE GRAM

Sur un frottis fixé, sec et refroidi, réaliser les étapes de colorations suivantes :

- **Colorer** au **violet de gentiane** : plonger la lame dans le bain de violet pendant **1 minute**.
- **Rincer** la lame à l'eau courante (bien égoutter la lame).
- **Fixer** le violet avec du **lugol** : plonger la lame dans le bain de lugol pendant **1 minute**.
- **Rincer** la lame à l'eau courante (bien égoutter la lame).
- **Décolorer** à l'**alcool** : faire couler sur la lame de l'alcool jusqu'à ce que l'alcool n'entraîne plus de colorant : **environ 5 secondes**.
- **Arrêter** alors **immédiatement** la décoloration par un **rinçage à l'eau courante**.
- **Colorer** à la **fuchsine** : plonger la lame dans le bain de fuchsine pendant **1 minute**.
- **Rincer** la lame à l'eau courante (bien égoutter la lame).
- Laisser sécher complètement (entre deux feuilles de papier filtre, sans frotter).

4. OBSERVATION

- Observer à l'objectif à immersion **x 100** avec une goutte d'huile à immersion.
- Régler l'éclairage en pleine lumière (condenseur haut et diaphragme ouvert).
- Noter : - la **coloration** : **bactérie Gram + : violette / bactérie Gram - : rose**.
 - la **morphologie** (description détaillée de la forme).
 - les **groupements** (indispensable pour les Gram +).
 - les **proportions relatives des divers types de bactéries** selon la morphologie et le Gram dans le cas d'un mélange.

FICHE N°3 : MILIEUX DE BASE

Les milieux de base sont recommandés pour la culture de **micro-organismes non-exigeants** quant à leurs besoins nutritifs.

1. BOUILLON NUTRITIF ORDINAIRE (BNO)

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Peptone tryptique	6,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Extrait de boeuf	1,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Extrait de levure	1,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Chlorure de sodium	5,0 g·L ⁻¹	Équilibre électrique et osmotique
Eau	qsp 1 L	Hydratation
<i>pH ≈ 6,5</i>		

Milieu non sélectif permettant la culture des espèces non-exigeantes ;

Milieu nutritif de base, absence de glucides fermentescibles, d'indicateur coloré et d'inhibiteur.

2. GÉLOSE NUTRITIVE ORDINAIRE (GNO)

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Peptone tryptique	6,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Extrait de boeuf	1,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Extrait de levure	1,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Chlorure de sodium	5,0 g·L ⁻¹	Équilibre électrique et osmotique
Agar	15,0 g·L ⁻¹	Solidification / Gélification
Eau	qsp 1 L	Hydratation
<i>pH ≈ 7,4</i>		

Consistance du milieu	Solide
Sélectivité du milieu (si sélectivité, préciser)	Milieu non sélectif (Il est cependant possible de rajouter divers antibiotiques pour rendre le milieu sélectif) Milieu nutritif de base, absence de glucides fermentescibles, d'indicateur coloré et d'inhibiteur.
Résultat(s) attendu(s)	Culture des espèces non exigeantes : - Contrôle de la pureté de la souche. - Différenciation des colonies dans le cas d'un mélange polymicrobien. - Réalisation des tests enzymatiques de pré-orientation (oxydase et catalase). - Réalisation de tests d'agglutination d'identification. - Réalisation de suspension bactérienne.

3. GÉLOSE TRYPTICASE-SOJA (GTS)

Pour la culture de **micro-organismes exigeants**, on peut utiliser des **milieux plus riches**.

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Peptone tryptique de caséine	15,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Peptone papainique de soja	5,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Chlorure de sodium	5,0 g·L ⁻¹	Équilibre électrique et osmotique
Agar	15,0 g·L ⁻¹	Solidification / Gélification
Eau	qsp 1 L	Hydratation
pH ≈ 7,3		

Consistance du milieu	Solide
Sélectivité du milieu (si sélectivité, préciser)	Milieu non sélectif (Il est cependant possible de rajouter divers antibiotiques pour rendre le milieu sélectif) Milieu nutritif de base (plus enrichi que la GNO)
Résultat(s) attendu(s)	Culture de toutes les espèces peu ou pas exigeantes : - Contrôle de la pureté de la souche. - Différenciation des colonies dans le cas d'un mélange polymicrobien. - Réalisation des tests enzymatiques de pré-orientation (oxydase et catalase). - Réalisation de tests d'agglutination d'identification. - Réalisation de suspension bactérienne.

FICHE N°4 : GÉLOSE BCP (gélose lactosée au bromocrésol pourpre)

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Peptone	5,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Extrait de viande	3,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Lactose	10,0 g·L ⁻¹	Source de carbone et d'énergie
Bromocrésol Pourpre	10,0 g·L ⁻¹	Indicateur coloré de pH (jaune en milieu acide / violet en milieu basique)
Agar	15,0 g·L ⁻¹	Solidification / Gélification
Eau	qsp 1 L	Hydratation
<i>pH ≈ 6,8</i>		

Consistance du milieu	Solide	
Sélectivité du milieu (si sélectivité, préciser)	- Milieu non sélectif . - Mise en évidence de l' acidification du milieu due à l' utilisation du lactose par fermentation .	
Résultat(s) attendu(s)	Milieu violet : Absence d'acidification du milieu. La souche ne fermente pas le lactose. ⇒ Souche Lactose -	Milieu jaune : Acidification du milieu due à la fermentation du lactose par la souche. ⇒ Souche Lactose +

FICHE N°5 : GÉLOSE CHAPMAN

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Peptones	10,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Extrait de viande de boeuf	1,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Chlorure de sodium	75,0 g·L ⁻¹	À cette concentration = inhibiteur Sélection des souches halophiles
Mannitol	10,0 g·L ⁻¹	Source de carbone et d'énergie
Rouge de phénol	0,025 g·L ⁻¹	Indicateur coloré de pH : (jaune en milieu acide / rouge en milieu basique)
Agar	15,0 g·L ⁻¹	Solidification / Gélification
Eau	qsp 1 L	Hydratation
<i>pH ≈ 7,4</i>		

Consistance du milieu	Solide	
Sélectivité du milieu (si sélectivité, préciser)	<ul style="list-style-type: none"> - Sélection des espèces halophiles. - Sélection des coques Gram +, catalase +. - Mise en évidence de l'acidification du milieu due à l'utilisation du mannitol. 	
Résultat(s) attendu(s)	<p>Présence de colonies + milieu rouge :</p> <p>Pas d'utilisation du mannitol par la souche</p> <p>⇒ Souche halophile Mannitol -</p>	<p>Présence de colonies + milieu jaune :</p> <p>Utilisation du mannitol par la souche</p> <p>⇒ Souche halophile Mannitol +</p> <p>⇒ Suspicion de <i>Staphylococcus aureus</i> si les colonies sont dorées</p>

FICHE N°6 : GÉLOSE DRIGALSKI

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Peptone	15,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Extrait de viande	3,0 g·L ⁻¹	Source d'azote organique (acides aminés, peptides)
Extrait de levure	3,0 g·L ⁻¹	Source d'acides aminés et de vitamines
Lactose	15,0 g·L ⁻¹	Source de carbone et d'énergie
Désoxycholate de sodium	1,0 g·L ⁻¹	Inhibiteur des bactéries Gram +, sauf le genre <i>Enterococcus</i> Sélection des bactéries entériques Gram -
Cristal violet	0,005 g·L ⁻¹	Inhibiteur des bactéries Gram + Sélection des bactéries Gram -
Bleu de bromothymol	0,080 g·L ⁻¹	Indicateur coloré de pH (jaune en milieu acide / vert-bleu en milieu neutre et basique)
Thiosulfate de sodium	1,0 g·L ⁻¹	Équilibre électrique et osmotique
Agar	11,0 g·L ⁻¹	Solidification
Eau	qsp 1 L	Hydratation
<i>pH</i> ≈ 7,4		

Consistance du milieu	Solide	
Sélectivité du milieu (si sélectivité, préciser)	- Sélection des bactéries Gram - de culture facile	
Résultat(s) attendu(s)	Présence de colonies + milieu vert-bleu : Absence d'acidification du milieu. La souche ne fermente pas le lactose. ⇒ Souche Lactose -	Présence de colonie + milieu jaune : Acidification du milieu due à la fermentation du lactose par la souche. ⇒ Souche Lactose +

FICHE N°7 : EXAMEN MACROSCOPIQUE DES COLONIES

1. CONDITIONS DE L'EXAMEN MACROSCOPIQUE DES COLONIES

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation.

2. ASPECT DES COLONIES

La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments :

						Techniques d'observation
Forme	 Circulaire	 Filamenteuse	 Irrégulière	 Rhizoïde	 Fusiforme	Observation vue de dessus
Élévation	 Plane	 Elevée	 Convexe	 Bombée	 Bossue	Observation vue de profil
Bord	 Régulier	 Dentelé	 Lobé	 Filamenteux	 Bouclé	Observation vue de dessus
Pigmentation	crème	jaune	rouge	verdâtre	Orange ...	Observation de la couleur de la colonie
Taille	D < 1 mm Petite		1 mm < D < 3 mm Moyenne		D > 3 mm Grande	Mesure du diamètre (D) à l'aide d'une règle graduée
Opacité	transparente		translucide		opaque	Observation du passage de la lumière à travers la colonie
Consistance	Homogène ou crémeuse (facile à prélever)		Grumeleuse (difficile à prélever)		Filante ou muqueuse (prélèvement avec des fils)	Observation lors du prélèvement à l'anse
Surface	Lisse (si brillant)			Rugueuse (si terne, mat)		Observation vue de dessus

3. LES TROIS PRINCIPAUX TYPES DE COLONIES

En rassemblant les critères précédemment décrits, trois sortes de colonies peuvent être distinguées :

TYPES DE COLONIES	CRITÈRES D'OBSERVATION
S (= smooth = lisse)	Colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées, de consistance crémeuse et donnant des suspensions homogènes.
R (= rough = rugueuse)	Colonies à surface rugueuse et bord dentelés, plates, de consistance sèche et donnant des suspensions hétérogènes.
M (= mucous = muqueuse)	Colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées, filantes sous l'anse et donnant des suspensions hétérogènes

FICHE N°8 : TESTS DE PRÉ-ORIENTATION : OXYDASE ET CATALASE

	RECHERCHE DE LA CATALASE	RECHERCHE DE L'OXYDASE												
INTÉRÊT	Ce test est essentiel pour pré-orienter l'identification des bactéries Gram +.	Ce test est essentiel pour pré-orienter l'identification des bactéries Gram -.												
PRINCIPE	<p>On recherche la présence d'une enzyme respiratoire : la catalase.</p> <p>Si la bactérie possède cette enzyme, elle est capable de réaliser la réaction suivante :</p> $2 \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	<p>On recherche la présence d'un complexe cytochrome oxydase dans une chaîne respiratoire.</p> <p>Si la bactérie possède ce complexe, elle est capable d'oxyder un substrat incolore (N-N-diméthyl-paraphénylène-diamine) en son produit rose violacé :</p> $\text{Substrat réduit (incolore)} \xrightarrow{\text{Cytochrome oxydase}} \text{Produit oxydé (rose / violet)}$												
TECHNIQUE	<ul style="list-style-type: none"> → Sur une lame, placer une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂). → Prélever un peu de culture sur milieu solide à l'aide d'une pipette Pasteur et la placer dans le liquide sans agiter. 	<ul style="list-style-type: none"> → Sur une lame, imbiber 1/2 disque oxydase avec une goutte de réactif. → Déposer un peu de culture à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée puis observer. 												
LECTURE DES RÉSULTATS	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Observation</th> <th style="width: 50%;">Interprétation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Absence de bulles</td> <td>→ Souche catalase -</td> </tr> <tr> <td>Présence de bulles</td> <td>→ Souche catalase +</td> </tr> </tbody> </table>	Observation	Interprétation	Absence de bulles	→ Souche catalase -	Présence de bulles	→ Souche catalase +	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Observation</th> <th style="width: 50%;">Interprétation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Disque incolore</td> <td>→ Souche oxydase -</td> </tr> <tr> <td>Tâche violette</td> <td>→ Souche oxydase +</td> </tr> </tbody> </table>	Observation	Interprétation	Disque incolore	→ Souche oxydase -	Tâche violette	→ Souche oxydase +
Observation	Interprétation													
Absence de bulles	→ Souche catalase -													
Présence de bulles	→ Souche catalase +													
Observation	Interprétation													
Disque incolore	→ Souche oxydase -													
Tâche violette	→ Souche oxydase +													
CAUSES D'ERREURS ET PRÉCAUTIONS	Ne pas prélever les bactéries sur une gélose contenant du sang : l'hémoglobine peut décomposer l'eau oxygénée et donner lieu à des faux positifs.	<ul style="list-style-type: none"> - Ne pas prélever les bactéries avec une anse métallique. - Ne pas humidifier trop fortement le disque. - Prélever suffisamment de bactéries . 												

Pré-orientation de l'identification des principaux genres et familles bactériennes

Coques	Gram +	Catalase +		Genre <i>Staphylococcus</i> Genre <i>Micrococcus</i>
		Catalase -		Genre <i>Streptococcus</i> Genre <i>Enterococcus</i>
	Gram -	Oxydase +		Genre <i>Neisseria</i> Genre <i>Moraxella</i>
Bacilles	Gram +	Grands	Catalase +	Genre <i>Bacillus</i>
			Catalase -	Genre <i>Lactobacillus</i> Genre <i>Clostridium</i>
	Gram -	Petits	Catalase +	Genre <i>Listeria</i> Genre <i>Corynebacterium</i>
		Oxydase +		Famille des <i>Vibrionaceae</i> Genre <i>Pseudomonas</i> et apparentés
Oxydase -		Famille des <i>Enterobacteriaceae</i> Genre <i>Acinetobacter</i>		

FICHE N°9 : GALERIE MINIATURISÉE D'IDENTIFICATION API 20 E

1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE

La galerie miniaturisée **API 20 E** est un système standardisé pour l'**identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles Gram - non fastidieux**, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés.

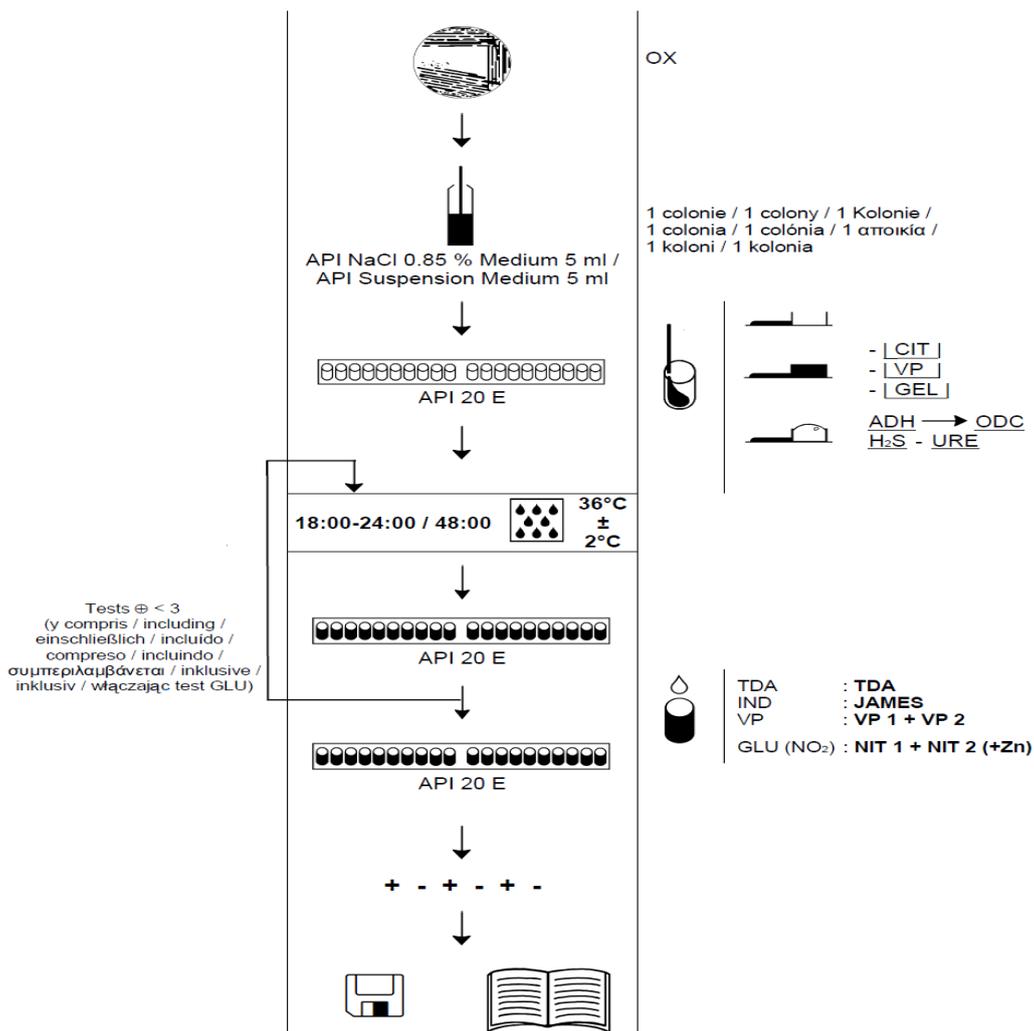
La galerie API 20 E comporte **20 microtubes** contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un **tableau de lecture**.



Les réactions se traduisent, après incubation, par des virages colorés (spontanés ou révélés par des réactifs)

2. MÉTHODOLOGIE



3. LECTURE

La lecture des résultats est donnée par le tableau suivant :

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incoloré	jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
[CIT]	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
H ₂ S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incoloré / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	jaune	<u>TDA / immédiat</u> marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	incoloré vert pâle / jaune	<u>JAMES / immédiat</u> rose
[VP]	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	incoloré / rose pâle	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> rose / rouge (5)
[GEL]	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAMnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARABinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.

(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).

(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

(5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue 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.

4. IDENTIFICATION BACTÉRIENNE

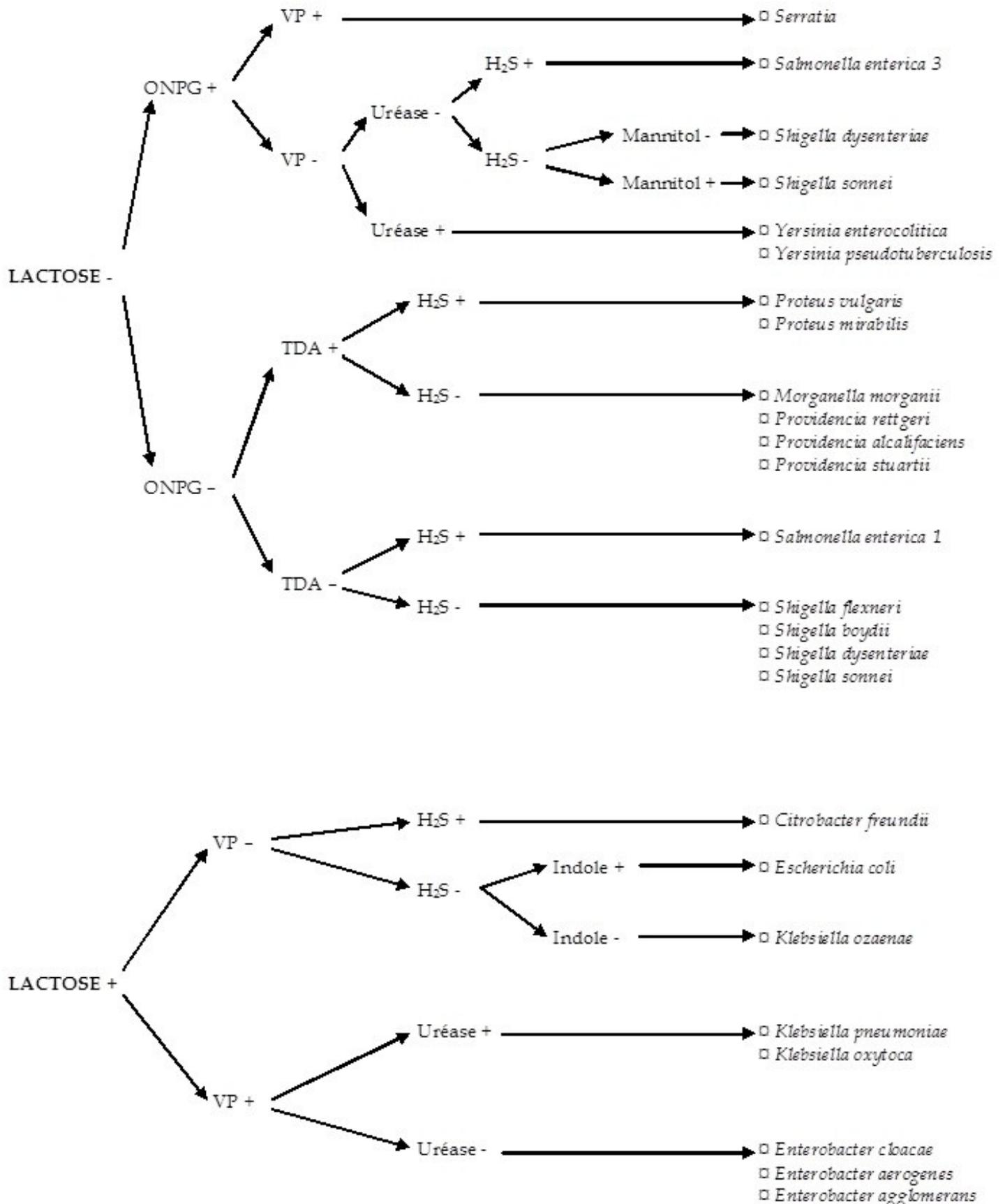
L'identification bactérienne peut s'effectuer :

- par démarche dichotomique.
- Par obtention d'un code d'identification et la consultation d'un catalogue d'identification API 20 E.
- Par l'outil de logiciels ou de sites en ligne :

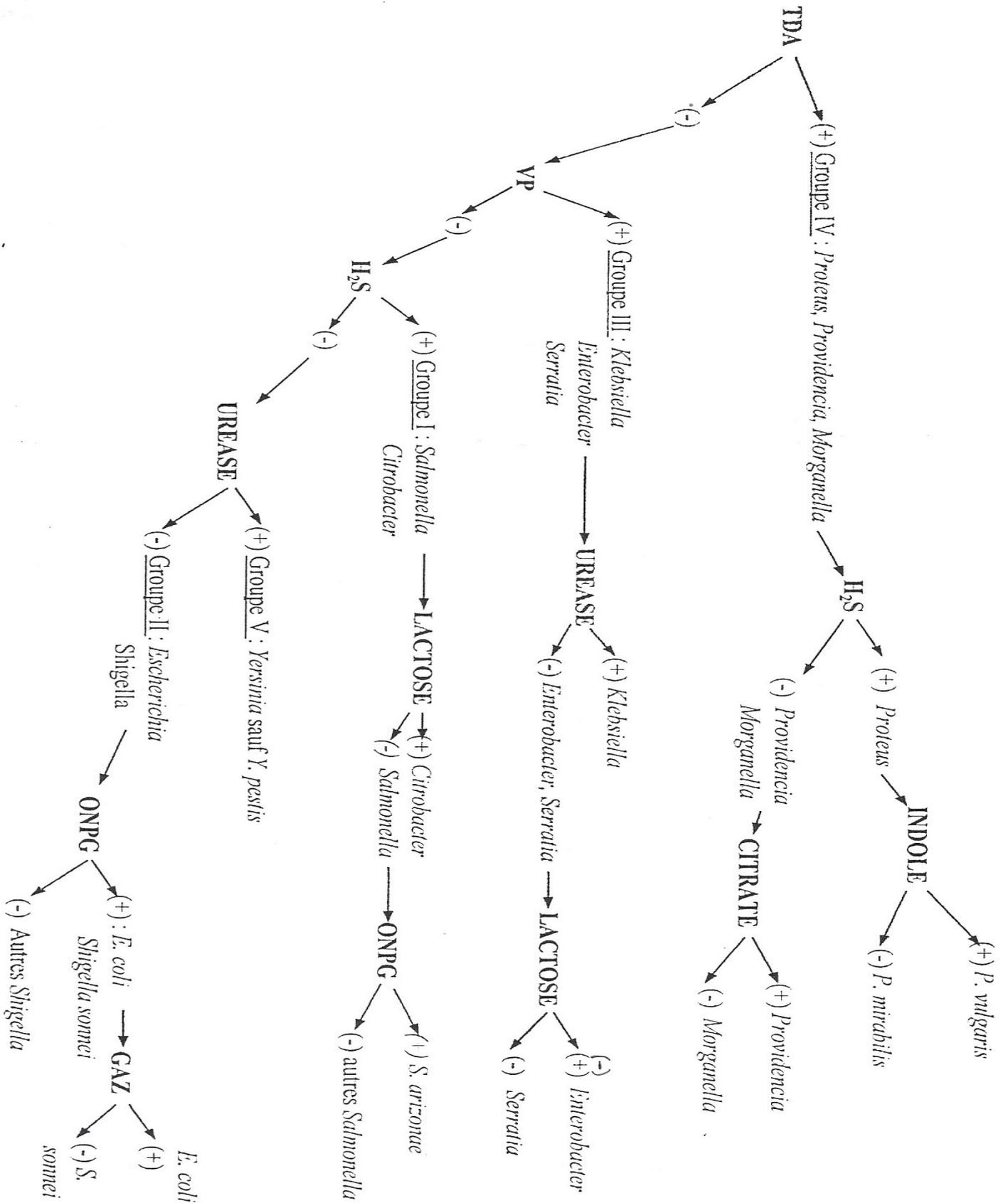
<https://lab.upbm.org/identifieur/>



FICHE N°10 : DÉMARCHE DICHOTOMIQUE D'IDENTIFICATION DE CERTAINES ESPÈCES D'ENTÉROBACTÉRIES À PARTIR DU CARACTÈRE « LACTOSE »



FICHE N°11 : DÉMARCHE DICHOTOMIQUE D'IDENTIFICATION DE CERTAINES ESPÈCES D'ENTÉROBACTÉRIES À PARTIR DU CARACTÈRE « TDA »



FICHE N°12 : MÉTHODE D'IDENTIFICATION PAR MÉTHODE PROBABILISTE

1. PRINCIPE DE BASE DE L'IDENTIFICATION PAR LA MÉTHODE PROBABILISTE

Sur le tableau d'identification des galeries miniaturisée API, figure une base de données qui sert à calculer pour chaque souche la probabilité d'observer le profil biochimique obtenu expérimentalement.

La souche inconnue est identifiée à la souche pour laquelle la probabilité est la plus forte.

2. MÉTHODE DE CALCUL

- Soit un extrait du tableau de résultats de la galerie miniaturisée API 20 E :

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT
<i>Escherichia coli</i> 1	88	5	74	70	0
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	100	0	73	0	79
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	1	98	57

Les chiffres indiqués dans le tableau représentent le pourcentage de résultat positif de la souche considérée pour le test considéré (pour obtenir la probabilité de résultat positif, on divise le chiffre par 100).

Exemple :

D'après l'extrait du tableau de résultats :

- 100 % des souches de *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* sont ONPG + (probabilité de 1).
- 0 % des souches de *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* sont ADH + (probabilité de 0).
- 73 % des souches de *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* sont LDC + (probabilité de 0,73).
- 0 % des souches de *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* sont ODC + (probabilité de 0).
- 79 % des souches de *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* sont CIT + (probabilité de 0,79).

- Soit le profil biochimique obtenu pour la souche à identifier :

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT
Souche à identifier	-	-	-	+	-

Les probabilités d'obtenir ce profil pour les trois souches pris en exemple sont les suivantes :

- Pour *Escherichia coli* 1 : $(1 - 0,88) \times (1 - 0,05) \times (1 - 0,74) \times 0,70 \times (1 - 0) = 0,020748$.
La probabilité pour que la souche à identifier soit *Escherichia coli* 1 est 0,02078, soit 2,07 %.
- Pour *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* : $(1 - 1) \times (1 - 0) \times (1 - 0,73) \times (1 - 1) \times (1 - 0,79) = 0$
La probabilité pour que la souche à identifier soit *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* est 0, soit 0 %. La probabilité d'identification de la souche à identifier avec cette souche est nulle, donc impossible.
- Pour *Proteus mirabilis* : $(1 - 0,01) \times (1 - 0,01) \times (1 - 0,01) \times 0,98 \times (1 - 0,57) = 0,408884$.
La probabilité pour que la souche à identifier soit *Proteus mirabilis* est 0,408884, soit 40,9 %.

Les résultats obtenus avec ce profil biochimique partiel montrent que la probabilité la plus forte est en faveur de la souche *Proteus mirabilis*. Pour valider cette identification, il faut calculer avec le profil biochimique complet.

FICHE N°13 : DÉMARCHE DICHOTOMIQUE D'IDENTIFICATION DES COQUES GRAM +, CATALASE +

Orientation et démarche



Coque Gram⁺ catalase⁺

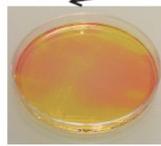
Aéro-anaérobie facultatif
ou pousse sur Chapman :
genre *Staphylococcus*

Aérobie Strict
ou pas de pousse sur Chapman :
genre *Micrococcus*
conclusion : contaminant du prélèvement
car présent sur la peau.

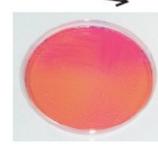
Prélèvement
observation de coques
bien ronds en amas

Isolement sur milieu non
sélectif : gélose au sang,
GN, CLED... Le contexte
permet de soupçonner un
Staphylococcus.

Isolement sur milieu Chapman



Milieu jaune donc
souche mannitol⁺ :
suspicion *Staphylococcus aureus*



Milieu inchangé donc
souche mannitol⁻ :
Staphylococcus non aureus

Pas de pousse :
genre *Micrococcus*
contaminant du
prélèvement.

Si pas de test
d'agglutination
possible: identification
GN + apiSTAPH
+ antibiogramme

Test d'agglutination permettant
la recherche de structures et antigènes
de *Staphylococcus aureus*

Ex. : le Pastorex Staph⁺ met en évidence
la présence du récepteur au fibrinogène,
de la protéine A, de l'antigène de capsule.
Si un ou plusieurs de ces éléments sont présent
le résultat sera positif.

Contexte

Si le *Staphylococcus* est majoritaire ou le seul germe isolé :
Réaliser une apiSTAPH pour identification
+ antibiogramme :
ATB STAPH ou Mueller-Hinton + disques
Ex. : *Staphylococcus epidermidis*,
Staphylococcus lugdunensis.

Le *Staphylococcus* est minoritaire, un germe majoritaire dont le pouvoir pathogène correspond au contexte a été également isolé sur d'autres milieux :
conclure *Staphylococcus* non aureus
contamination du prélèvement par
des *Staphylococcus* de la peau.

Résultat positif
identification *Staphylococcus aureus*
germe responsable de la pathologie.



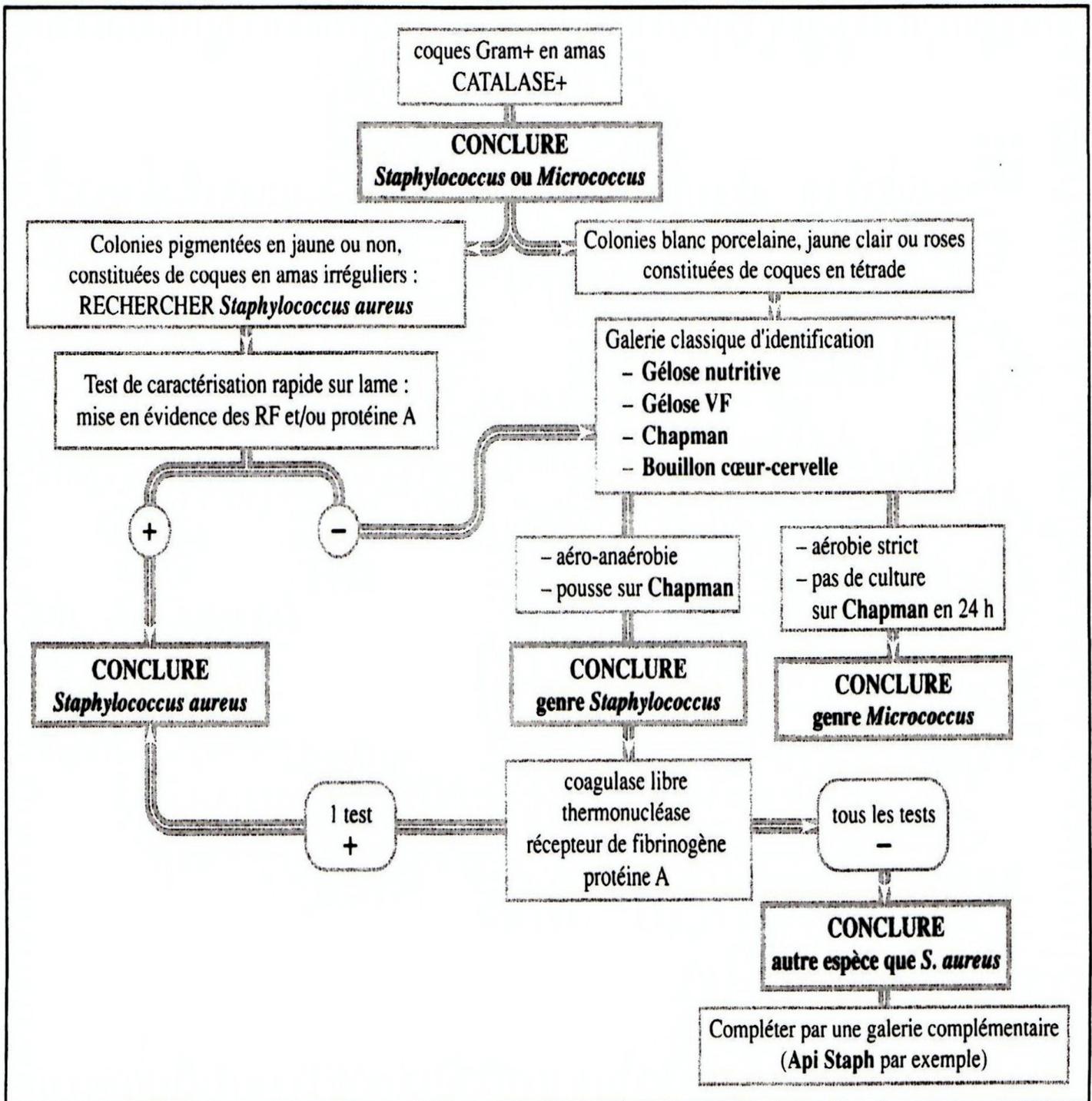
Réalisation antibiogramme :
ATB STAPH
ou Mueller-Hinton + disque à 37°C
et petit Mueller-Hinton inoculum
chargé + disque oxacilline à 30°C

Résultat négatif
identification *Staphylococcus* non aureus

Contexte

Analyse d'urine
possible *Staphylococcus saprophyticus*
qui est mannitol⁺ dans 92% des cas.
Il est responsable de 5 à 10% des infections
urinaires.
Réaliser une apiSTAPH pour identification
+ antibiogramme :
ATB STAPH ou Mueller-Hinton + disques

Autre
conclure *Staphylococcus* non aureus
selon le prélèvement proposer une apiSTAPH
mais la présence du germe n'a probablement
pas de signification pathologique.



FICHE N°14 : IDENTIFICATION RAPIDE DE *Staphylococcus aureus* PAR RECHERCHE DE LA PROTÉINE A ET DU RÉCEPTEUR AU FIBRINOGENÈ PAR TEST D'AGGLUTINATION

73 112

06125 H - FR - 03/2001

Slidex Staph-Kit

Pour diagnostic *in vitro*

Slidex Staph-Kit est un test d'agglutination de particules de latex et d'hématies pour l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* qui possèdent le facteur d'affinité pour le fibrinogène et/ou d'autres antigènes caractéristiques. Le kit permet l'identification rapide des souches de *Staphylococcus aureus* à partir des milieux d'isolement.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Staphylococcus aureus possède à sa surface un récepteur protéique pour un fragment du fibrinogène, la protéine A, des glycoprotéines et des acides téichoïques. Ainsi le réactif, constitué d'hématies sensibilisées par un anticorps monoclonal dirigé contre une glycoprotéine de surface, agglutine en présence de *Staphylococcus aureus*.

PRINCIPE

Les staphylocoques font partie des bactéries les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine et animale. Cliniquement, les espèces les plus importantes sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus*. Les infections les plus communes causées par *Staphylococcus aureus* sont cutanées, mais des atteintes sévères (septicémies, endocardites, méningites, pneumonies, ostéomyélites) peuvent être observées en milieu hospitalier (1).

La méthode la plus répandue pour l'identification de *Staphylococcus aureus* est la recherche de la coagulase. Ce test est basé sur la capacité des souches de *Staphylococcus aureus* à produire cette enzyme extracellulaire qui coagule le plasma de lapin. Ce test permet ainsi de différencier *Staphylococcus aureus* des autres espèces de staphylocoques, coagulase négative. D'autres méthodes, basées sur l'agglutination d'hématies ou de particules de latex, sont actuellement reconnues pour l'identification de *Staphylococcus aureus* (1, 2).

En effet, *Staphylococcus aureus* possède un récepteur protéique pour un fragment du fibrinogène. Ce récepteur est présent selon HALEK et MARSIALEK (3) sur 96 % des souches d'origine humaine et sur la plupart des autres biotypes. Des hématies de mouton stabilisées, sensibilisées par du fibrinogène sont agglutinées lorsqu'elles sont mises en présence d'une souche de *Staphylococcus aureus* portant ce récepteur. Certaines souches résistantes aux pénicillines M ne présentent pas d'affinité pour le fibrinogène (4).

A la surface de *Staphylococcus aureus* une protéine, la protéine A, réagit électivement avec le fragment Fc de la plupart des Ig d'isotype G. Cette protéine est produite sur tous les milieux mais faiblement sur gélose au sang. Elle est présente sur environ 90 % des souches (5). Des particules de latex sensibilisées par des IgG sont agglutinées lorsqu'elles sont mises en présence d'une souche de *Staphylococcus aureus* portant ce récepteur. Enfin, des protéines ou glycoprotéines et des acides téichoïques existent à la surface de *Staphylococcus aureus*. Les spécificités antigéniques sont extrêmement variables (1). Des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes protéiques de surface fixés sur des particules de latex agglutinent certains *Staphylococcus aureus*.

Ainsi, le réactif Slidex Staph-Kit est un test combinant l'hémagglutination pour la détection du facteur d'affinité pour le fibrinogène et l'agglutination de particules de latex pour la détection de la protéine A et d'antigènes protéiques spécifiques de *Staphylococcus aureus*.

RÉACTIFS

Composition du coffret (pour 50 tests) :

R1 1 x 1,7 ml Flacon à bouchon rouge	Réactif anti- <i>Staphylococcus aureus</i> Hématies sensibilisées par le fibrinogène humain* et latex sensibilisés par l'anticorps monoclonal anti- <i>Staphylococcus aureus</i> (azoteur de sodium 1 g/l, méthicholate de sodium 0,13 g/l)
R2 1 x 1,7 ml Flacon à bouchon blanc	Réactif contrôle Hématies contrôle et latex contrôle (azoteur de sodium 1 g/l, méthicholate de sodium 0,13 g/l)

* Les souches d'origine Hbs, d'anticorps anti-VH1, VH2 et d'anticorps anti-VHc à être vérifiées. Cependant, aucun test ne pouvant apprécier une garantie absolue, ce produit doit être manipulé avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Cartes jetables (réf. 73 114) ou Lames de verre porte-objets parfaitement propres
- Bac desinfectant
- Pipettes Pasteur ou cosses plastiques stériles
- Minuteur (30 secondes)

CONSERVATION

- Après réception conserver les réactifs à 2-8°C.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.
- Amener les réactifs à température ambiante (20-30°C) avant utilisation.
- Une décoloration des réactifs doit être suspectée si :
 - le réactif anti-*Staphylococcus aureus* n'agglutine pas une souche de *Staphylococcus aureus* connue et servant de référence positive ;
 - le réactif anti-*Staphylococcus aureus* agglutine une souche de *Staphylococcus epidermidis* connue et servant de référence négative ;
 - les réactifs sont autoagglutinés dans les facons ;
 - les réactifs sont contaminés, évaporés ou hémolysés.
- Si les réactifs ont été congelés accidentellement, ils ne doivent pas être utilisés.

Slidex Staph-Kit

06125 H - FR - 03/2001

MISE EN GARDE ET PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- Ce coffret contient des composants d'origine humaine. Aucune des méthodes d'analyse actuellement connues ne peut garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible. Il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux.
- Destinés au diagnostic *in vitro* seulement.
- Un personnel de laboratoire qualifié doit utiliser les techniques aseptiques et les précautions habituelles contre les agents infectieux.
- Ne pas piquer à la bouche les prélèvements et les réactifs.
- Ne pas employer les réactifs après la date d'expiration.
- Après la sortie du réfrigérateur, laisser les réactifs revenir à la température ambiante (20-30°C) avant emploi.
- Ne pas interrompre les réactifs de différents lots.
- Les réactifs contiennent de l'azoteur de sodium. L'azoteur de sodium pouvant réagir avec les tuyaux en plomb ou en cuivre et former des dérivés métalliques explosifs, rincer abondamment à l'eau après élimination.
- Tous les produits inoculés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés de façon appropriée.
- A la fin du test, après lecture et interprétation, tous les prélèvements, souillures et produits inoculés doivent être autoclavés, incinérés ou immergés dans un désinfectant germicide avant élimination.
- Ne pas réutiliser les lames/cartons jetables après usage.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite par un microbiologiste compétent qui prendra en considération le contexte clinique, l'origine du prélèvement, les aspects macro et microscopiques et éventuellement les résultats d'autres tests, en particulier l'antibiogramme.

MODE OPÉRATOIRE

- Les prélèvements et cultures bactériennes doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée par un personnel compétent et averti.
- Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation (se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Safety, US Department of Health and Human Services, 1988" ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation).
- Prélèvement et préparation des échantillons
 - Ensemencer le prélèvement sur un milieu d'isolement sélectif (milieu de Chapman, milieu de Baird Parker, milieu tellurite glycine agar) ou non sélectif (gélose Columbia au sang de mouton (5 %), gélose Tryptose soja avec ou sans sang de mouton (5 %), gélose Mueller Hinton avec ou sans sang de mouton, gélose CLED, gélose CPS ID) : les performances peuvent varier en fonction du type de milieu utilisé. Une étude interne réalisée sur des souches de *S. aureus* (MRSA et MSSA) et non *S. aureus* montre des différences de spécificité et de sensibilité en fonction du milieu utilisé (voir Tableau 1).

TABLEAU 1

MILIEU	SENSIBILITE	SPECIFICITE
Gélose Columbia au sang		
Columbia AHC + sang	94,2 %	89,5 %
TSA		
TSA + sang		
CPS		
Baird Parker		
Mueller Hinton		
Mueller Hinton + sang	94,2 %	88,4 %
Tellurite Glycine Agar		
Chapman	94,2 %	88,1 %

- Après incubation 18-24 heures à 37°C, préférer les colonies suspectes. S'assurer dans un premier temps qu'il peut s'agir d'un staphylocoque par les réactions classiques (morphologie, Gram, Catalase).
- Slidex Staph-Kit ne doit pas être utilisé pour les hémocultures (en raison d'une interférence possible avec le fibrinogène et les IgG apportées par le sang).

Méthodologie

- Bien remettre en suspension les réactifs. Chasser les gouttes retenues dans le compte-gouttes et bien mélanger.
- Sur une carte jetable ou lame de verre porte-objet parfaitement propre, dans 2 cercles, déposer :
 - 1 goutte de réactif anti-*Staphylococcus aureus* (R1) ;
 - 1 goutte de réactif contrôle (R2).
- Dans chaque des gouttes, disperser très soigneusement et complètement pendant 10 secondes, 1 à 2 colonies suspectes de taille moyenne issues d'un milieu nutritif ou 3 à 6 colonies très petites issues d'un milieu sélectif (ex. : milieu de Chapman) à l'aide de l'extrémité d'une pipette Pasteur ou à l'aide d'une crosse.
- Donner à la lame un léger mouvement de rotation pendant 20 secondes et lire sous éclairage normal sans utiliser de loupe.

Lecture

- Un résultat positif est indiqué par l'apparition dans le réactif R1 d'une agglutination dans les 30 secondes (temps de mélange + temps de rotation de la lame) soit des hématies sensibilisées (coloration rouge), soit des particules de latex (coloration blanche), ou des deux simultanément (coloration rouge orangé).
- Un résultat négatif est indiqué par une suspension homogène (R1 et R2).
- La réaction est interprétable si le réactif contrôle (R2) présente une agglutination.
- Certaines souches peuvent être difficiles à énumérer et donner des grumeaux ou des filaments dans le réactif. Ces images ne doivent pas être confondues avec une agglutination. Néanmoins, une agglutination peut être visible entre les grumeaux.

FICHE N°15 : DÉMARCHE DICHOTOMIQUE D'IDENTIFICATION DES COQUES GRAM +, CATALASE -

Orientation et démarche



Coque Gram⁺ catalase⁻

Streptococcus

Inhibés ou esculine⁻ sur milieu BEA et inhibés sur bouillon hypersalé sauf streptocoques du groupe D qui poussent sur BEA (esculine⁺).

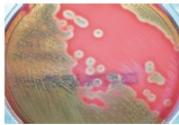
Enterococcus

poussent sur BEA (esculine⁺) et sur bouillon hypersalé.

Prélèvement
observation de coques
ovoïdes par deux (pneumocoque) ou en chaînettes

Isolement sur gélose au sang + ANC
incubation 24h en atmosphère enrichie en CO₂

Béta-hémolytique
(hémolyse totale)



Alpha-hémolytique
(hémolyse partielle)



Non-hémolytique
ou gamma hémolyse



Présomption de
Streptococcus A, B, C, D,
G, F... ou *Enterococcus*

Groupage antigénique

A : *Streptococcus pyogenes*
ou
B : *Streptococcus agalactiae*
antibiogramme ATP STREPTO ou
Mueller-Hinton + sang + disques
à 37°C en atmosphère enrichie
en CO₂
Rqe : chez la femme enceinte et
enfant : sérotypage du
Streptococcus agalactiae (B).

C : plusieurs espèces
D : *Streptococcus D*
ou *Enterococcus*
G : plusieurs espèces
F : plusieurs espèces
ou
Groupage négatif.

Présomption de
Streptococcus pneumoniae

Recherche de l'antigène de capsule
exemple : Slidex Pneumo-Kit
Rqe : possibilité recherche sensibilité
à l'optochine
sur gélose au sang + disque

Résultat latex positif ou optochine sensible
identification *Streptococcus pneumoniae*
Rqe : possibilité de confirmer par le test à
l'optochine.

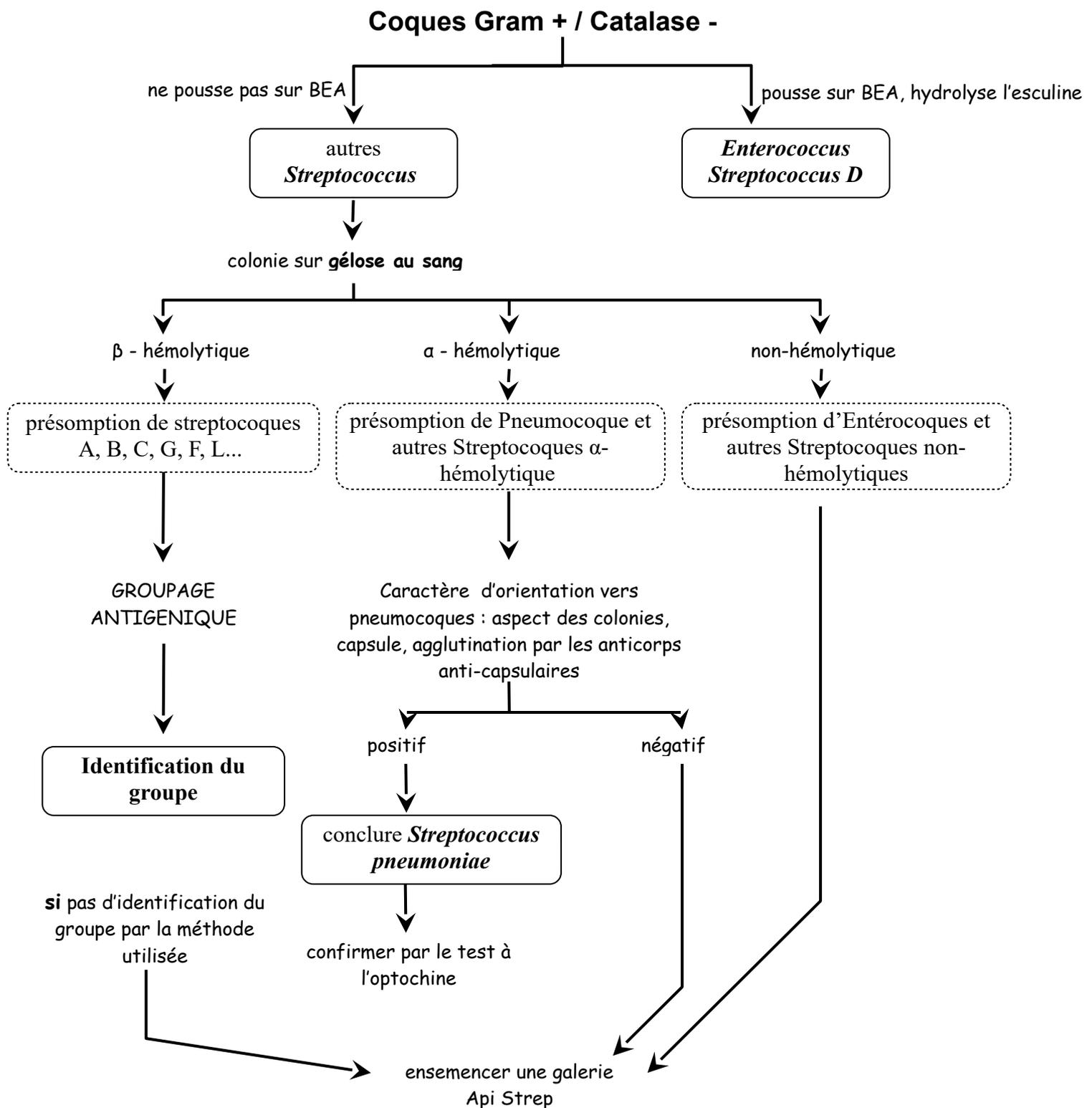
Réalisation antibiogramme :
ATB PNEUMO
ou Mueller-Hinton + sang + disques
à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂

Résultat latex négatif ou résistant à l'optochine
identification *Streptococcus* alpha-hémolytique

Faire une identification en fonction du contexte :
api STREP + antibiogramme ATP STREPTO ou
Mueller-Hinton + sang + disques
à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂

Présomption de
Streptococcus non
hémolytique
ou *Enterococcus*

En fonction du contexte :
Identification sur api STREP +
ATB STREPTO ou Mueller-Hinton
+ sang + disques à 37°C en
atmosphère enrichie en CO₂



Test de pré-identification : (pour les streptocoques groupables et *Streptococcus pneumoniae*)

- Recherche de la sensibilité à :
 - bacitracine
 - optochine
 - SXT
- Camp test