

#### 4 – Analyses microbiologiques

##### TP 23 : Recherche et dénombrement des germes revivifia blés

La recherche et le dénombrement des germes revivifiables se réalise à deux températures différentes afin de cibler à la fois les micro-organismes à tendance psychrophiles soit à 20° et ceux franchement mésophiles soit 37°C.

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement 2 fois 1ml dans deux boites de Pétri vides préparées à cet usage et numérotées comme l'indique le schéma n°1.

Compléter ensuite chacune des boites avec environ 20 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à 45±1°C.

Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose.

Laisser solidifier sur paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose ou de gélose blanche. Cette double couche a un rôle protecteur contre les contaminations diverses.

##### Incubation :

- La première boite sera incubée, couvercle en bas à 20°C,
- La seconde sera incubée couvercle en bas à 37°C,

Pendant 72 heures avec :

- première lecture à 24 heures,
- deuxième lecture à 48 heures, et
- troisième lecture à 72 heures.

##### Lecture :

Les germes revivifiables se présentent dans les deux cas sous forme de colonies lenticulaires poussant en masse.

##### Dénombrement :

Il s'agit de dénombrer toutes les colonies, en tenant compte deux remarques suivantes :

1. Ne dénombrer que les boites contenant entre 15 et 300 colonies,
2. Le résultat sera exprimé par millilitre d'eau à analyser à 22° et à 37°C.

Eau à Analyser

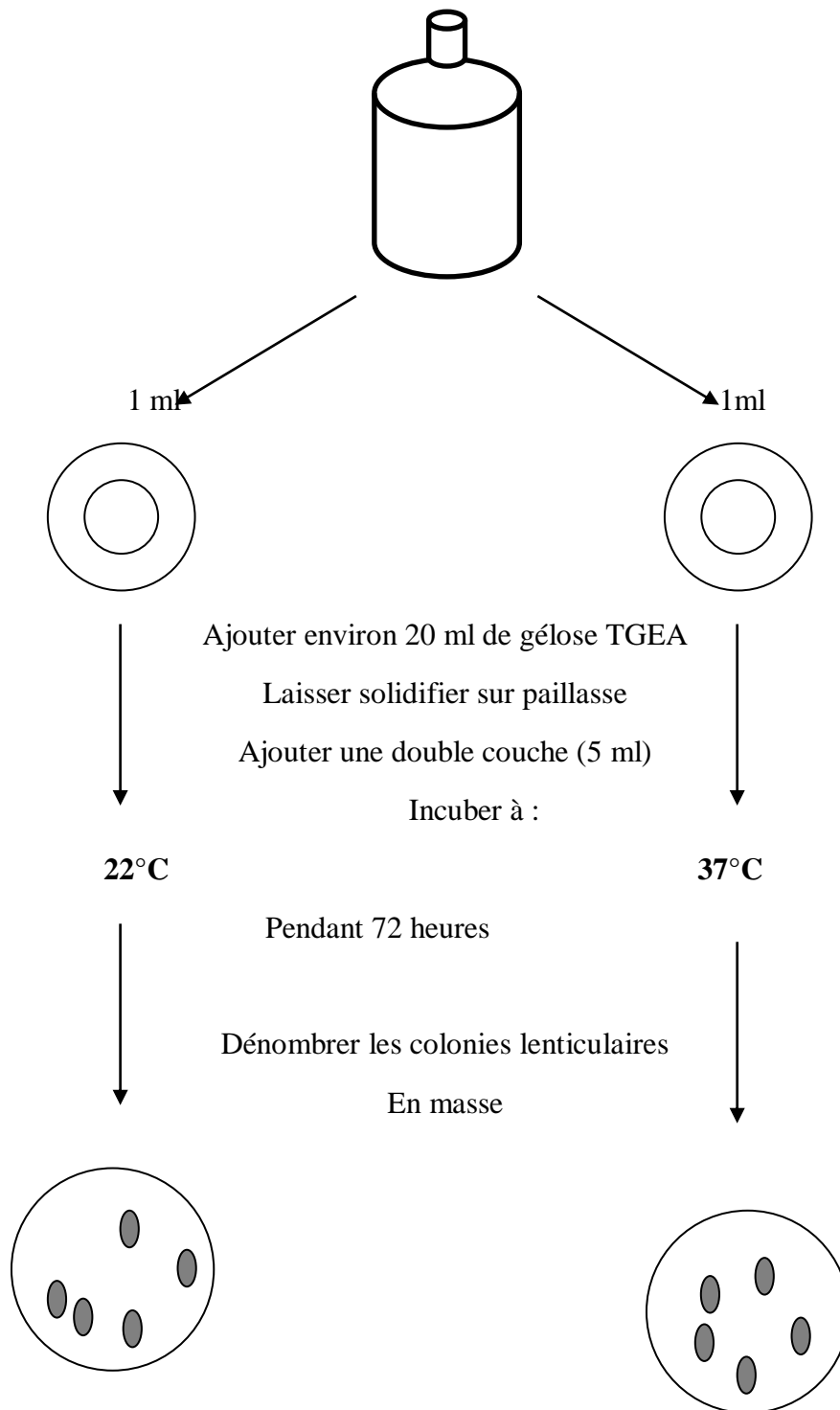


Schéma n°1

**TP 24. Colimétrie. Recherche et dénombrement des Coliformes en milieux liquides.**

Les coliformes se présentent sous forme de Bacilles Gram négatifs (BGN), non sporogènes, oxydase négative, aéro-anaérobies facultatifs, capables de croître en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz, en 24 à 48 heures à 37°C.

Les coliformes sont considérés comme indices de contamination fécale.

La recherche et le dénombrement des coliformes peuvent se faire selon deux méthodes de choix :

- Soit en milieu liquide sur BCPL par la technique du NPP (Nombre le Plus Probable).
- Soit par filtration sur membrane à 0,45 $\mu$  en milieu solide en supposant la disponibilité d'une rampe de filtration.

✓ **Technique en milieu liquide sur BCPL.**

La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- le test de présomption : réservé à la recherche des Coliformes totaux.
- le test de confirmation : encore appelé test de Mac Kenzie et réservé à la recherche des Coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

➤ **Test de présomption.**

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL S/C muni d'une cloche de Durham, comme l'indique le schéma n° 2.

Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélangé le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche),
- un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP qui figure en annexe.

Illustration :

Inoculum	Test de présomption	Nbre Caractéristique
1 X 50 ml	+	<b>1</b>
5 X 10 ml	+	<b>3</b>
	+	
	+	
	-	
	-	
5 X 1 ml	+	<b>2</b>
	+	
	-	
	-	
	-	

Le nombre caractéristique est donc « **132** » ; ce qui correspond sur la table de Mac Grady au nombre 14.

On considère alors qu'il y a 14 Coliformes par 100 ml d'eau à analyser.

➤ **Test de confirmation ou test de Mac Kenzie.**

Le test de confirmation ou test de Mac Kenzie est basé sur la recherche de Coliformes thermotolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'*Escherichia coli*.

Les coliformes thermotolérants ont les mêmes propriétés de fermentation que les coliformes mais à 44°C.

*Escherichia coli* est un coliforme thermo tolérant qui entre autre :

- produit de l'indole à partir du tryptophane à 44°C,
- donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyl,
- ne produit pas de l'acétyl méthyl carbinol,
- n'utilise pas le citrate comme source unique de carbone.

Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham, comme l'indique le schéma n°3.

Chasser le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant ***à la fois*** :

- un dégagement gazeux, et
- un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par Escherichia Coli après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP en tenant compte du fait qu'Escherichia Coli est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C.

**Illustration**

En reprenant l'exemple précédent relatif au dénombrement des Coliformes totaux, cela suppose que nous avons 6 tubes à repiquer à savoir :

- le flacon de BCPL D/C,
- 3 tubes sur 5 de BCPL D/C, et
- 2 tubes sur 5 de BCPL S/C.

Tableau Récapitulatif

Inoculum	Test de présomption	Nbre Caractéristique	Test de confirmation		Nbre Caractéristique
			Gaz	Indole	
1 X 50 ml	+	<b>1</b>	+	+	<b>1</b>
5 X 10 ml	+	<b>3</b>	+	-	<b>1</b>
	+		+	+	
	+		-	+	
	-				
	-				
5 X 1 ml	+	<b>2</b>	-	+	<b>1</b>
	+		+	+	
	-				
	-				
	-				

Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Coliformes fécaux est donc « **111** », ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre 5.

Le résultat final sera donc de :

14 Coliformes totaux dans 100 ml d'eau à analyser

5 Coliformes fécaux dans 100 ml d'eau à analyser

Remarque :

Etant donné que les Coliformes fécaux font partie des Coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.

TP 25.1 : Colimétrie en milieu liquide : Test de présomption

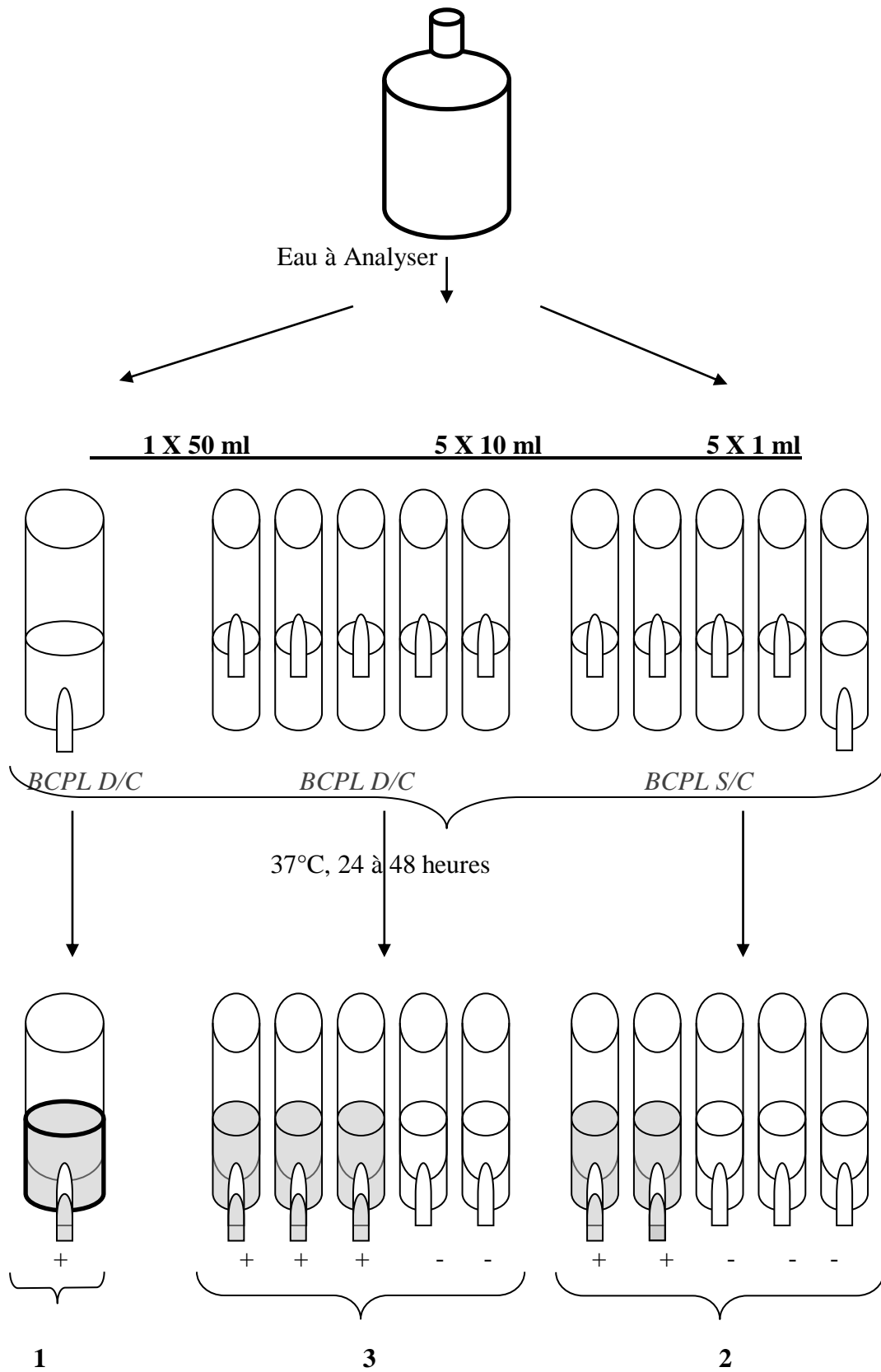
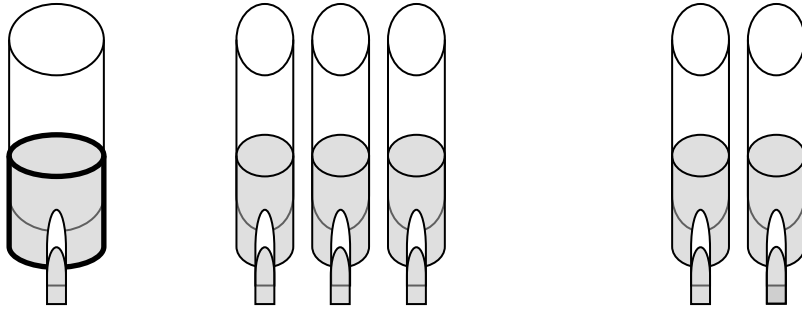
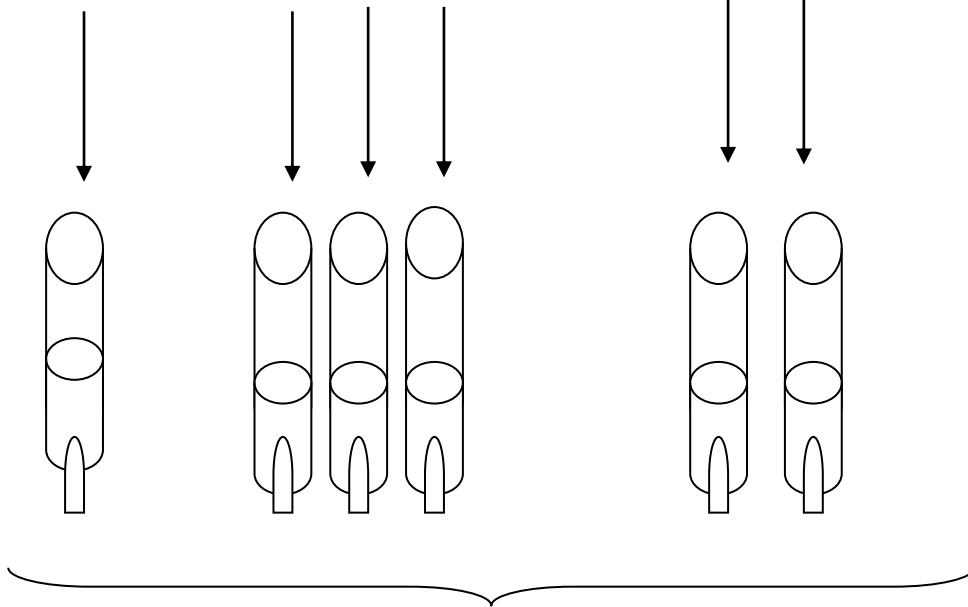


Schéma n°2

**TP : 25.2 Colimétrie en milieu liquide : Test de confirmation**

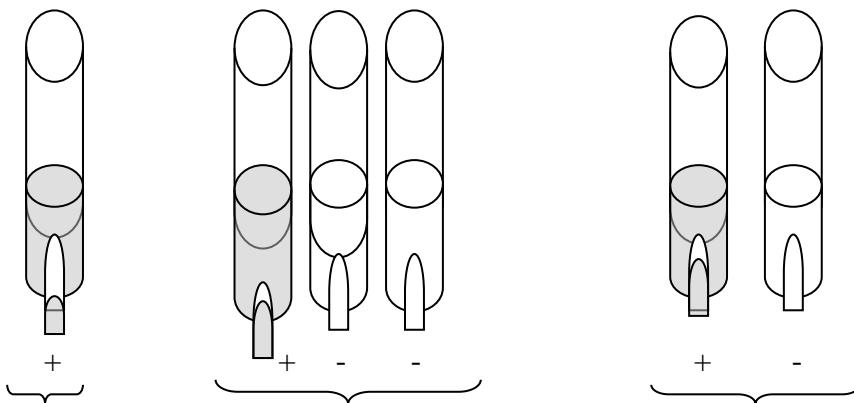


**Repiquage sur milieu Schubert + cloche**



44°C, 24 heures

Ajouter 2 à 3 gouttes de Kowacs



**1**

**1**

**1**

Schéma n°3



### TP 25.3 Colimétrie par filtration

La colimétrie par filtration est une méthode rapide, simple, normalisée mais nécessitant la disponibilité d'une rampe de filtration.

- Tout d'abord, il faudrait stériliser un entonnoir à l'aide d'un bec bunsen.
- Le refroidir soit avec l'eau à analyser ou bien avec de l'eau distillée stérile.
- Mettre en place de façon aseptique une membrane de 0,45  $\mu$  entre la membrane poreuse et l'entonnoir à l'aide d'une pince stérile.
- Fixer ce dernier avec la pince correspondante.

#### *Recherche de coliformes totaux*

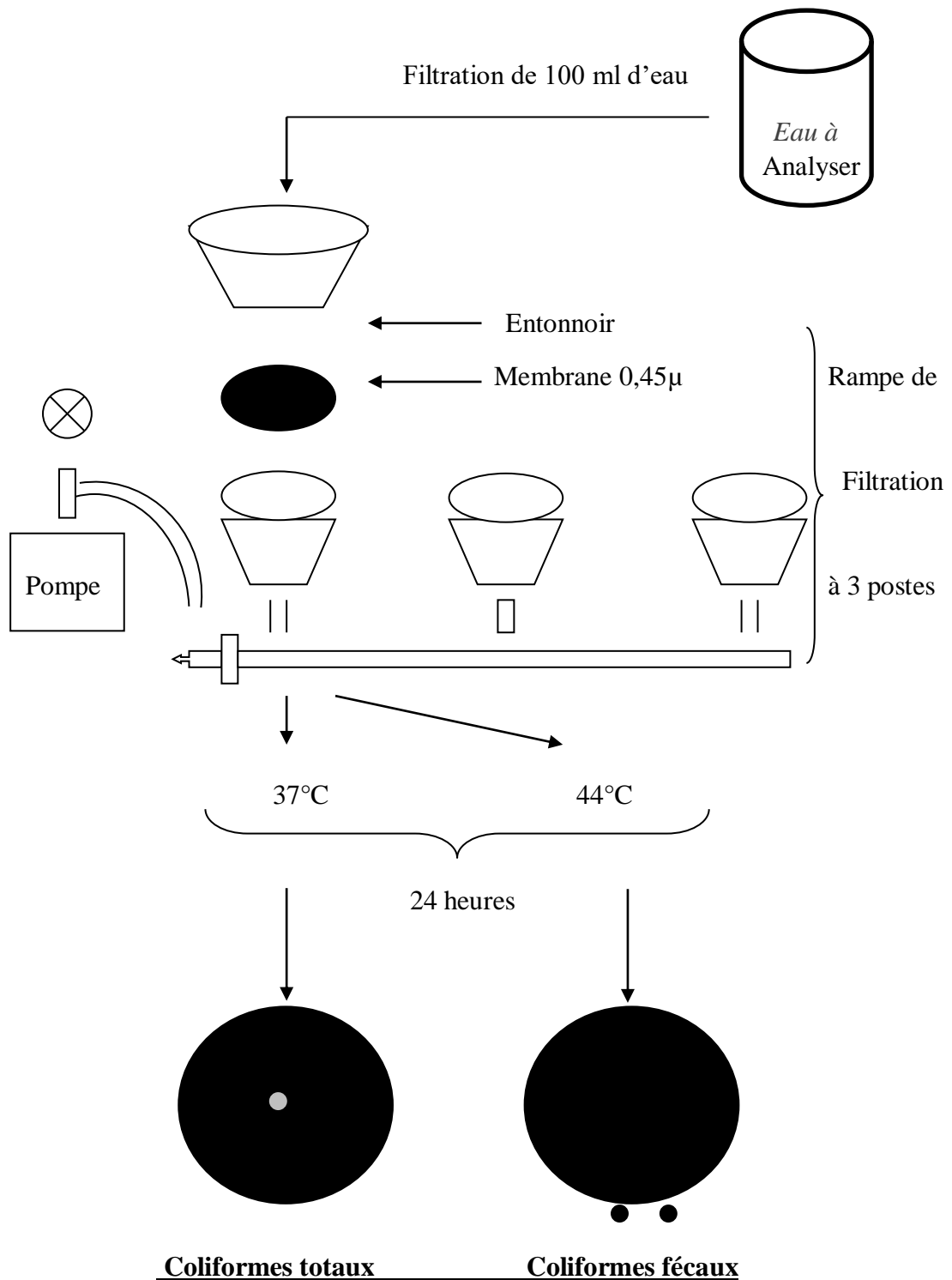
- Remplir de façon aseptique l'entonnoir avec 100 ml d'eau à analyser.
- Actionner la pompe à vide pour permettre le passage de l'eau à travers la membrane.
- Retirer ensuite la membrane à l'aide d'une pince stérile et la placer dans une boîte de Pétri de 45 mm de diamètre contenant de la gélose TTC.
- Cette membrane sera incubée à 37°C, pendant 24 heures et servira à la recherche des coliformes totaux.

#### *Recherche de coliformes fécaux*

- Remplir par la suite l'entonnoir avec 100 ml d'eau à analyser.
- Actionner de la même façon la pompe à vide pour permettre le passage de l'eau à travers la membrane.
- Retirer ensuite la membrane à l'aide d'une pince stérile et la placer dans une boîte de Pétri de 45 mm de diamètre contenant de la gélose TTC.
- Cette deuxième membrane sera incubée à 44°C, pendant 24 heures et servira à la recherche des coliformes fécaux.

#### *Lecture et interprétation*

- Après 24 heures d'incubation, les coliformes totaux et fécaux apparaissent sous forme de petites colonies jaunes ou orangées, lisses, légèrement bombées.
- Etant donné le caractère sélectif de la gélose TTC ; ne pousseront théoriquement que les coliformes.
- Ne dénombrer que les boîtes refermant entre 15 et 300 colonies.
- Le nombre de colonies trouvées sera exprimé dans 100 ml d'eau à analyser.



Après 24 heures d'incubation :

- à 37°C, en ce qui concerne la recherche des coliformes totaux,
- à 44°C, en ce qui concerne la recherche des coliformes totaux,

Procéder au dénombrement de toutes les colonies caractéristiques et rapporter ce nombre à 100 ml d'eau à analyser.

Schéma n°4

**TP 26.1 : STREPTOMETRIE****Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux en milieux liquides**

Les Streptocoques fécaux ou Streptocoques du groupe D de la classification de Lancefield, se présentent sous forme de cocci à Gram +, sphériques à ovoïdes formant des chaînettes, ne possédant pas de catalase mais possédant l'antigène du groupe D.

Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 37°C sur un milieu sélectif à l'azoture de sodium en donnant des colonies caractéristiques réduisant le TTC et qui de plus hydrolysent l'esculine en 48 heures à 44°C après repiquage d'une colonie sur une gélose biliée à l'esculine. Leur recherche et leur dénombrement peut se faire de la même manière que pour les coliformes, c'est à dire à l'aide de deux méthodes distinctes selon la disponibilité ou non d'une rampe de filtration et seuls les milieux de culture changent.

**✓ Méthode de recherche en milieu liquide**

Tout comme la méthode de recherche des coliformes en milieu liquide, celle de la recherche et le dénombrement des Streptocoques fécaux fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- le test de présomption
- le test de confirmation : réservé à la confirmation réelle des Streptocoques fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.
- **Test de présomption.**

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu ROTHE D/C,
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE D/C,
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE S/C, comme l'indique le schéma n° 5.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

**Incubation :**

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

**Lecture :**

Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien, seulement ces derniers :

- ne doivent en aucun cas faire l'objet de dénombrement
- doivent par contre, absolument faire l'objet d'un repiquage sur milieu LITSKY EVA dans le but d'être confirmés.

Illustration :

Inoculum	Test de présomption
1 X 50 ml	-
5 X 10 ml	+ + - - -
5 X 1 ml	+ + + - -

➤ **Test de confirmation .**

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des Streptocoques fécaux éventuellement présents dans le test de présomption.

Les tubes de ROTHE trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu LITSKY EVA, comme l'indique le schéma n°6.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum .

Incubation :

L'incubation se fait cette fois-ci à 37°C, pendant 24 heures .

Lecture :

Sont considérés comme positifs , les tubes présentant **à la fois** :

- un trouble microbien, et
- une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP qui figure en annexe.

**Illustration**

En reprenant l'exemple précédent relatif au test de présomption, cela suppose que nous avons 5 tubes à repiquer à savoir :

- 2 tubes sur 5 de ROTHE D/C, et
- 3 tubes sur 5 de ROTHE S/C.
-

Tableau Récapitulatif

Inoculum	Test de présomption	Test de confirmation		Nbre Caractéristique
		Trouble	Pastille violette	
1 X 50 ml	-			<b>0</b>
5 X 10 ml	+	+	+	<b>2</b>
	+	+	+	
	-			
	-			
	-			
5 X 1 ml	+	-	+	<b>1</b>
	+	+	+	
	+	+	-	
	-			
	-			

Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Streptocoques fécaux est donc « **021** » , ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre 3.

Le résultat final sera donc de : 3 Streptocoques fécaux dans 100 ml d'eau à analyser

Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux en milieu liquide :

Test de Présomption

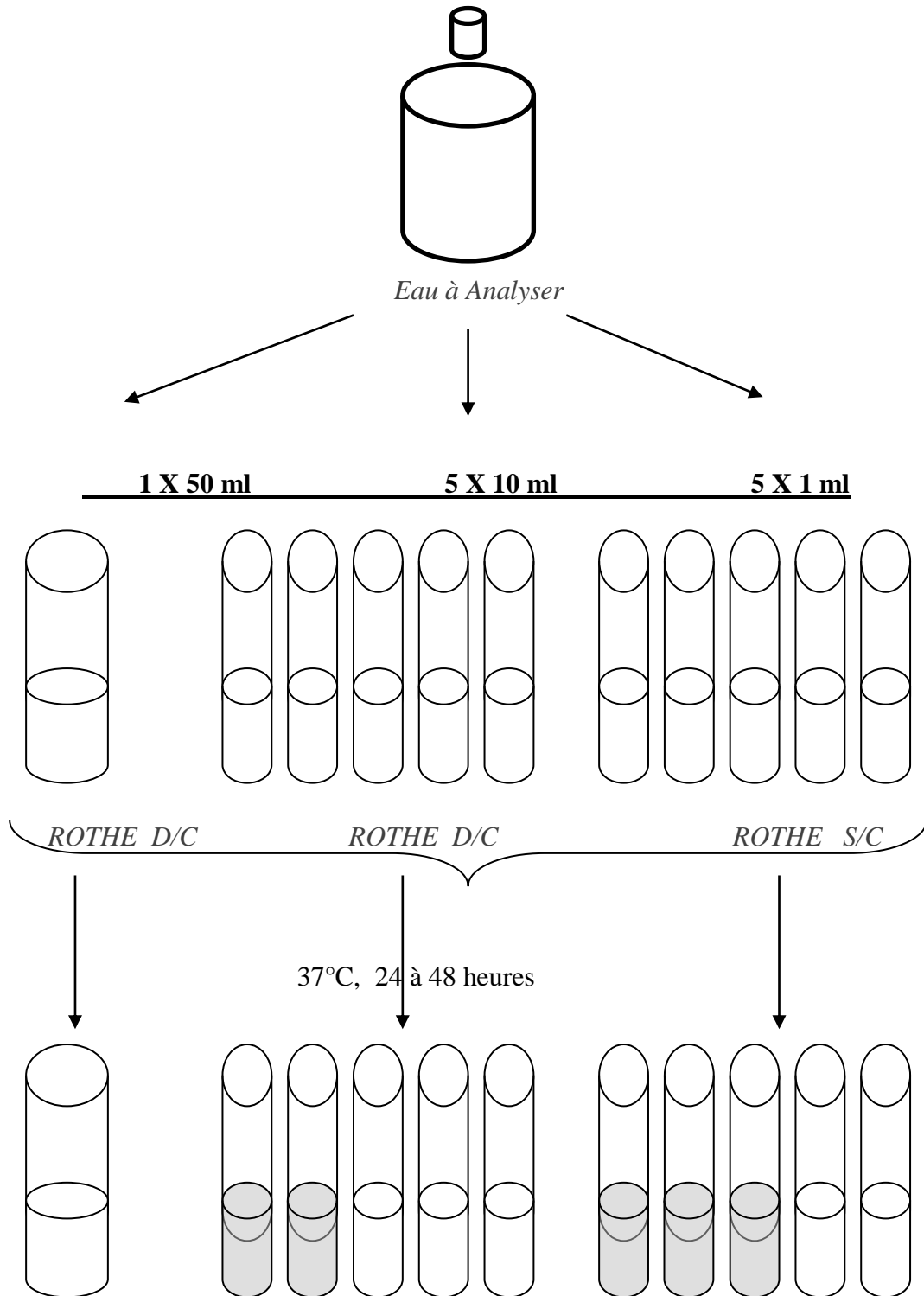


Schéma n°5

Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux en milieu liquide :

Test de Confirmation

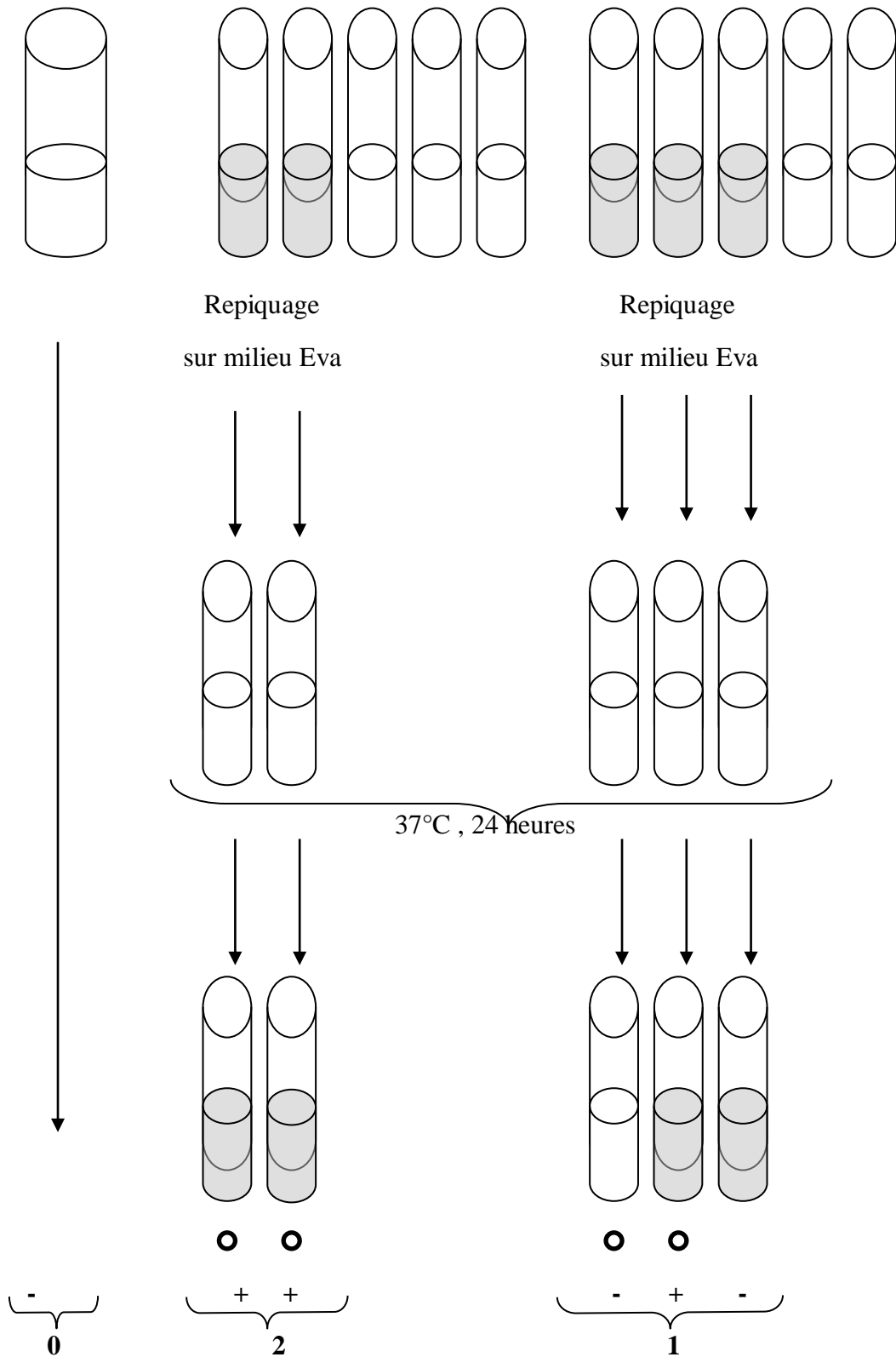


Schéma n°6

**TP 26.2 : Streptométrie par filtration**

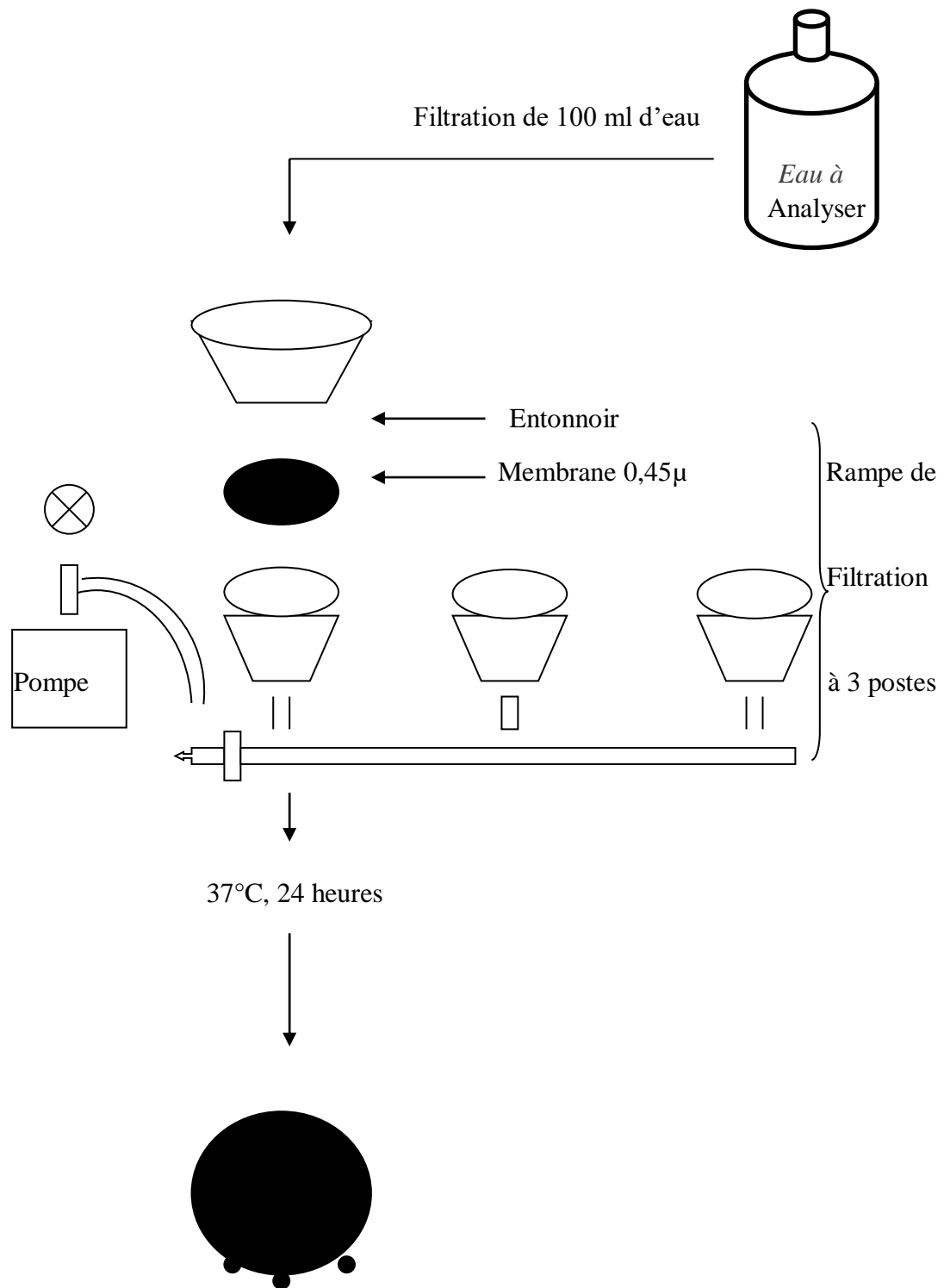
La streptométrie par filtration est tout comme la colimétrie par filtration une méthode rapide, simple, normalisée mais nécessitant la disponibilité d'une rampe de filtration.

- Tout d'abord, il faudrait stériliser un entonnoir à l'aide d'un bec bunsen.
- Le refroidir soit avec l'eau à analyser ou bien avec de l'eau distillée stérile.
- Mettre en place de façon aseptique une membrane de 0,45  $\mu$  entre la membrane poreuse et l'entonnoir à l'aide d'une pince stérile.
- Fixer ce dernier avec la pince correspondante.
- Remplir de façon aseptique l'entonnoir avec 100 ml d'eau à analyser.
- Actionner la pompe à vide pour permettre le passage de l'eau à travers la membrane.
- Retirer ensuite la membrane à l'aide d'une pince stérile et la placer dans une boîte de Pétri de 45 mm de diamètre contenant de la gélose **SLANETZ et BARTLEY**.
- Cette membrane sera incubée à 37°C, pendant 24 heures.

***Lecture et interprétation***

- Après 24 heures d'incubation, les streptocoques fécaux apparaissent sous forme de petites colonies rouges, marron ou roses, lisses, légèrement bombées.
- Etant donné le caractère sélectif de la gélose **SLANETZ** ; ne pousseront théoriquement que les streptocoques fécaux.
- Ne dénombrer que les boîtes refermant entre 15 et 300 colonies.
- Le nombre de colonies trouvées sera exprimé dans 100 ml d'eau à analyser.





**Streptocoques fécaux**

Après 24 heures d'incubation, à 37°C, procéder au dénombrement de toutes les colonies caractéristiques et rapporter ce nombre à 100 ml d'eau à analyser.

Schéma n°7

### TP 27 : Recherche et dénombrement des Spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs

Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) se présentent sous forme de bactéries Gram +, se développant en 24 à 48 heures sur une gélose Viande Foie en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  donne  $\text{FeS}$  (sulfure de fer) de couleur noire.

Les spores des ASR constituent généralement des indices de contamination ancienne.

#### A partir de l'eau à analyser :

- Prendre environ 25 ml dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de  $80^\circ\text{C}$  pendant 8 à 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes.
- Après chauffage, refroidir immédiatement le tube en question, sous l'eau de robinet.
- Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube.
- Ajouter environ 18 à 20 ml de gélose Viande Foie, fondue puis refroidie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , additionnée d'une ampoule d'Alun de fer et d'une ampoule de Sulfite de sodium.
- Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant les bulles d'air et en évitant l'introduction d'oxygène.
- Laisser solidifier sur paille pendant 30 minutes environ, puis incuber à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 24 à 48 heures.
- La première lecture doit absolument être faite à 16 heures car très souvent les colonies des ASR sont envahissantes auquel cas on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant ainsi l'interprétation difficile voire impossible et l'analyse sera à refaire en utilisant des dilutions décimales de  $10^{-1}$  voire  $10^{-2}$ , la deuxième lecture se fera à 24 heures et la troisième et dernière à 48 heures.
- Dénombrer toute colonie noire de 0,5 mm de diamètre, poussant en masse.

#### Interprétation des résultats .

Il est donc impératif de repérer et de dénombrer toutes les colonies noires poussant en masse et de rapporter le total des colonies à 20 ml d'eau à analyser.

#### Identification biochimique .

Certains auteurs préconisent l'identification biochimique de toute colonie suspecte car très souvent il y a développement de colonies de Staphylocoques et de Bacillus à côté, qu'on prendrait à tort pour des colonies de Clostridium Sulfito-réducteur.

Pour cela il s'agit de casser le tube à l'aide d'une lime métallique à 1 cm au dessus de la colonie suspecte et de prendre exactement le centre de la dite colonie.

Le centre de la colonie noire suspecte (qui est en réalité blanche mais entourée d'une auréole noire) sera alors déposé soigneusement dans un tube contenant du bouillon T G Y ou T Y préalablement régénéré à  $80^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes.

Placer ensuite ce tube dans un agitateur (Vortex) pour bien mélanger la colonie dans le milieu puis l'incuber à 37°C en anaérobiose pendant 24 à 48 heures.

Après la période d'incubation, constater le trouble du milieu, puis réaliser les étapes suivantes

- Etat frais pour constater s'il y a mobilité ou non ...
- Coloration de Gram pour constater les types de colonies et leur coloration
- S'il s'agit de bacilles Gram positifs , faire un isolement sur deux boites de gélose au sang de mouton frais :

\* l'une sera incubée à 37°C en aérobiose ,

\* l'autre sera incubée à 37°C en anaérobiose .

Après 24 à 48 heures d'incubation :

\* sélectionner les boites ayant poussé strictement en anaérobiose ,

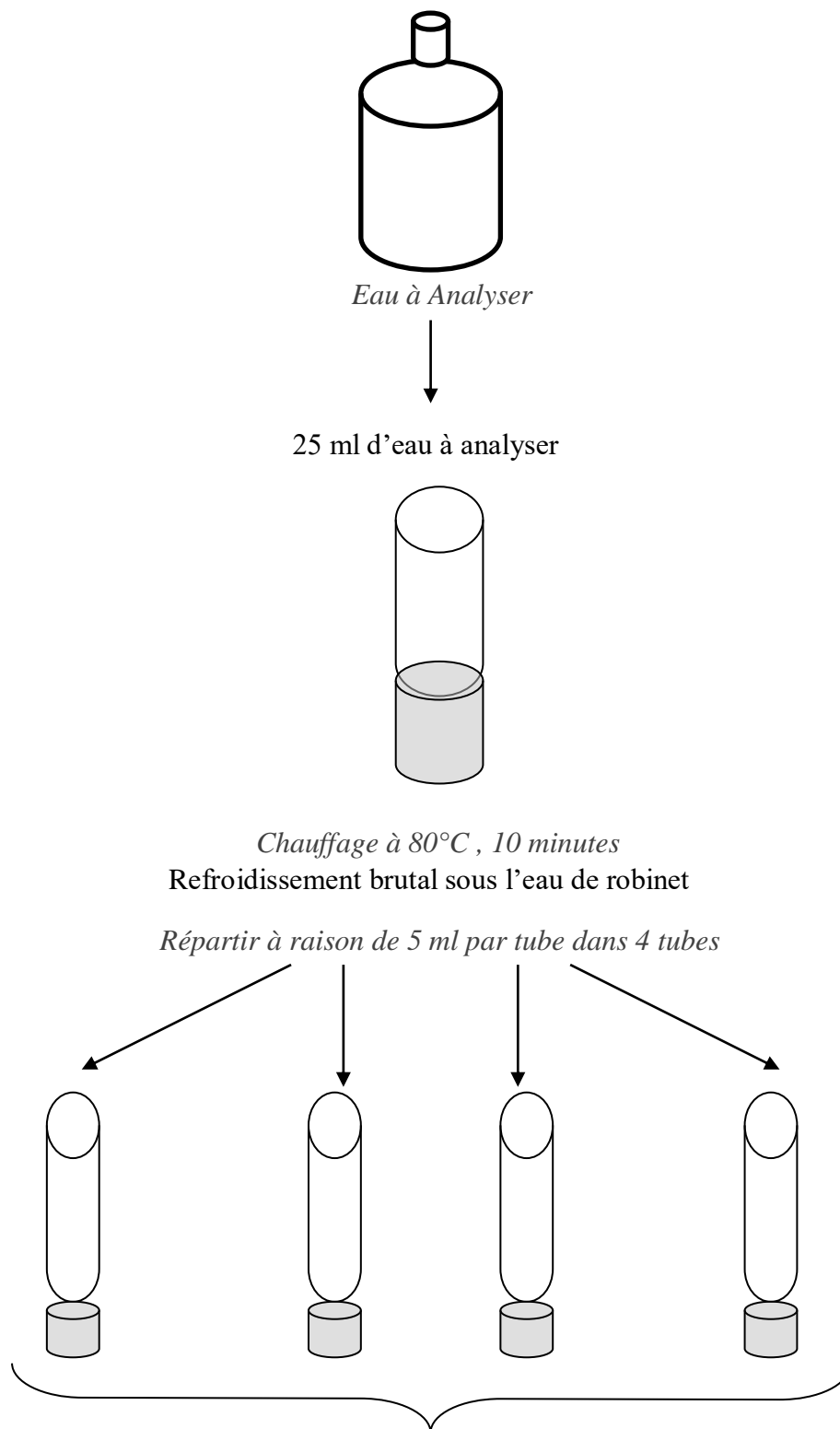
\* noter le type d'hémolyse ,

\* faire une coloration de Gram puis une réaction catalase ,

\* s'assurer qu'il s'agit bien d'une souche pure , sinon purifier ,

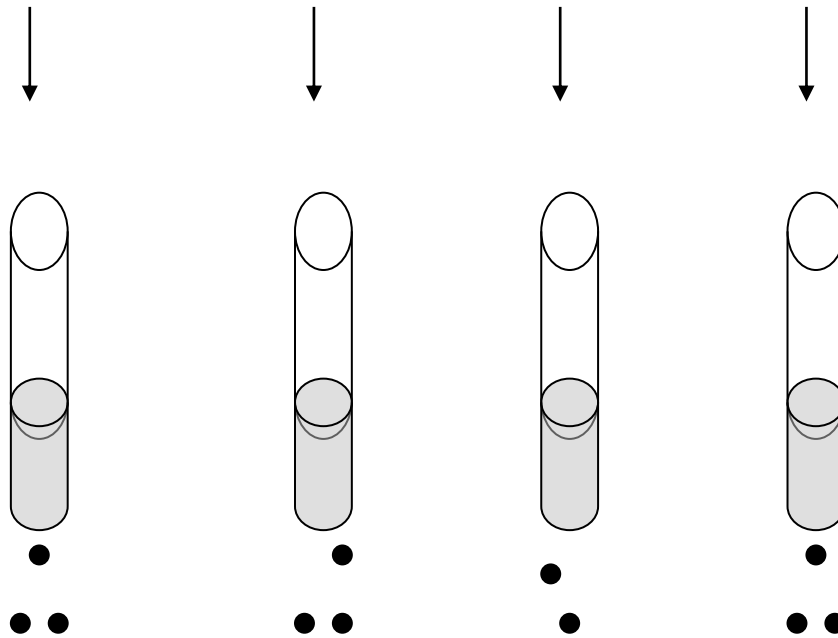
\* puis ensemer une Galerie biochimique Api 20 A à incuber

toujours à 37°C et toujours en anaérobiose .

*Recherche et dénombrement des Spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs*

*Ajouter environ 15 ml de gélose VF fondue puis refroidie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$*

*Laisser solidifier puis incuber à  $37^\circ\text{C}$ , 16 – 24 puis 48 heures*



**Schéma n°8**

**TP 28.1 : Recherche de Salmonella**

Les Salmonella sont des entérobactéries qui se présentent sous forme de Bacilles Gram Négatifs (BGN), ne fermentant pas le lactose, mais fermentant le glucose avec production de gaz et de H<sub>2</sub>S ; elles se divisent en deux grands groupes : les mineures et les majeures (hautement pathogènes ).

Jour 1 . Premier Enrichissement.

Le premier enrichissement s'effectue sur le milieu de Sélénite - Cystéiné D/C réparti à raison de 100 ml par flacon.

Ce dernier sera doncensemencé à l'aide de 100 ml d'eau à analyser, puis incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures, comme l'indique le schéma n°9.

Jour 2 . Deuxième enrichissement et Isolement.

Ce flacon fera l'objet :

- d'une part, d'un deuxième enrichissement sur milieu Sélénite en tubes à raison de 0,1 ml
- d'autre part, d'un isolement sur gélose Hektoen.

L'incubation se fait donc à 37°C pendant 24 h.

Jour 3 . Lecture des boîtes et Identification.

- D'une part, le tube de Sélénite fera l'objet d'un isolement,
- D'autre part, la boîte de gélose Hektoen subira une lecture en tenant compte du fait que les Salmonella se présentent le plus souvent sous forme de colonies de couleur gris bleu à centre noir.

Identification morphologique et biochimique.

Cinq colonies caractéristiques et distinctes feront l'objet d'une identification morphologique et biochimique qui se déroulent comme suit :

- Etat frais ( bacilles , mobilité ) ,
- Coloration de Gram ( bacilles Gram négatifs ) ,
- Ensemencement d'un tube de Kligler ( TSI ) qui sera incubé à 37°C , 24 h ( Lactose, Saccharose, Glucose, Gaz et H<sub>2</sub>S ) ,
- Ensemencement d'un tube de gélose nutritive inclinée qui sera incubé à 37°C, 24 h qui servira à l'agglutination sur lame,
- Ensemencement :
  - \* soit d'une galerie biochimique classique (ONPG, Oxydase, LDC, ODC, ADH, Témoin, Urée, Insole, TDA, VP, RM ... ) ,
  - \* ou d'une galerie biochimique API 20E.

Identification Antigénique . Cette dernière repose sur l'agglutination sur lame de verre, à partir des mêmes colonies isolées la veille sur GN inclinée en tubes, à l'aide des sérums de groupes d'abord OMA, OMB puis les autres après.

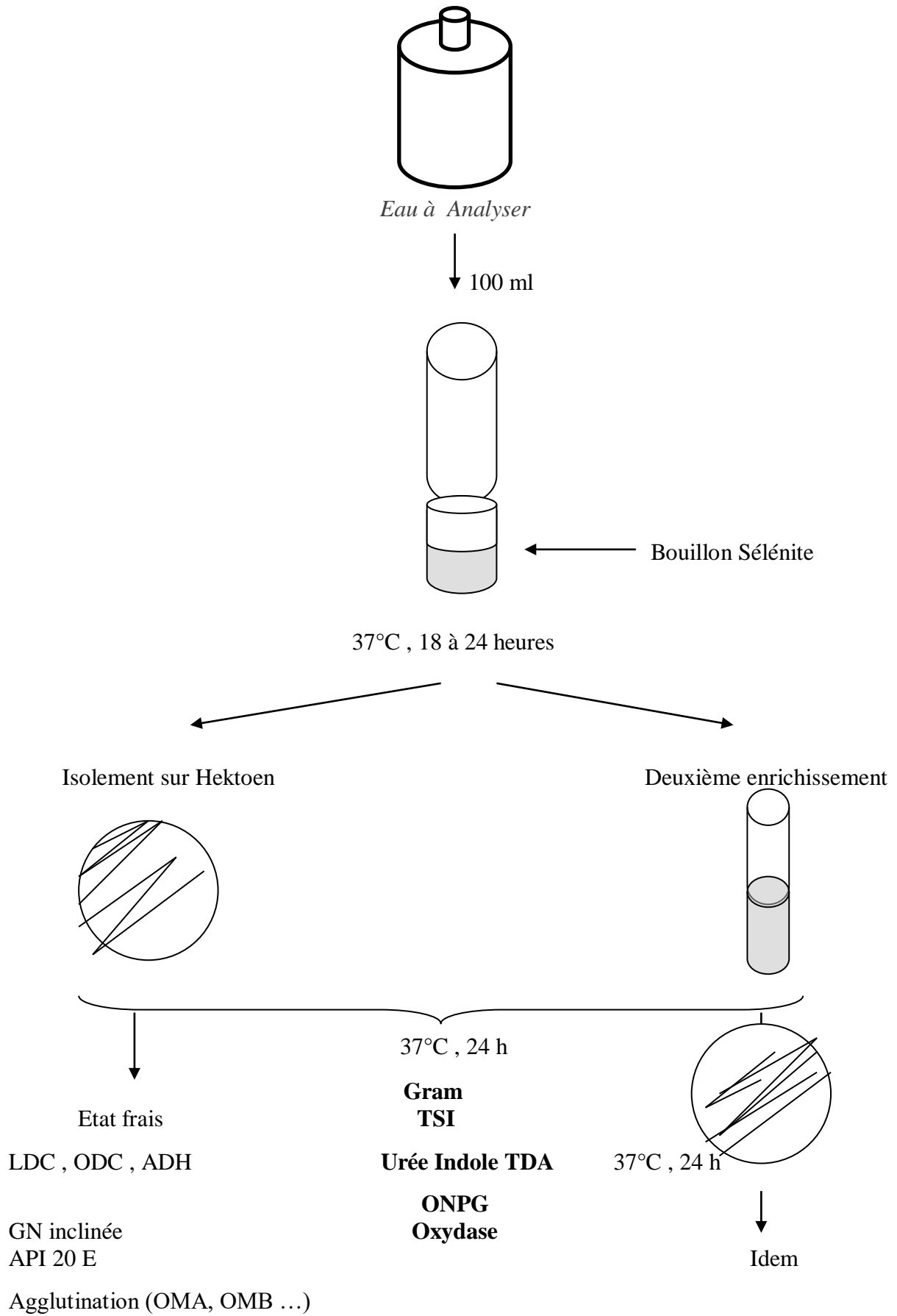


Schéma n°9

**TP 28.2 Recherche de Salmonella par filtration**

La recherche de Salmonella par filtration est une méthode rapide, simple, normalisée mais nécessitant la disponibilité d'une rampe de filtration.

- Tout d'abord, il faudrait stériliser un entonnoir à l'aide d'un bec bunsen.
- Le refroidir soit avec l'eau à analyser ou bien avec de l'eau distillée stérile.
- Mettre en place de façon aseptique une membrane de 0,45  $\mu$  entre la membrane poreuse et l'entonnoir à l'aide d'une pince stérile.
- Fixer ce dernier avec la pince correspondante.

Remplir de façon aseptique l'entonnoir avec 100 ml d'eau à analyser, comme le montre le schéma n°10.

- Actionner la pompe à vide pour permettre le passage de l'eau à travers la membrane.
- Continuer à remplir l'entonnoir jusqu'à 5 litres d'eau à analyser selon les dernières recommandations de l'OMS s'il n'y a pas de colmatage des pores de la membrane.
- Retirer ensuite la membrane à l'aide d'une pince stérile et la placer dans un flacon contenant du bouillon Sélénite D/C, qu'on incube à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Le lendemain, procéder à un isolement sur gélose Hektoen qui sera incubée à 37°C pendant 24 heures.
- Le lendemain repérer les colonies caractéristiques puis procéder à une identification biochimique classique puis à une identification antigénique.



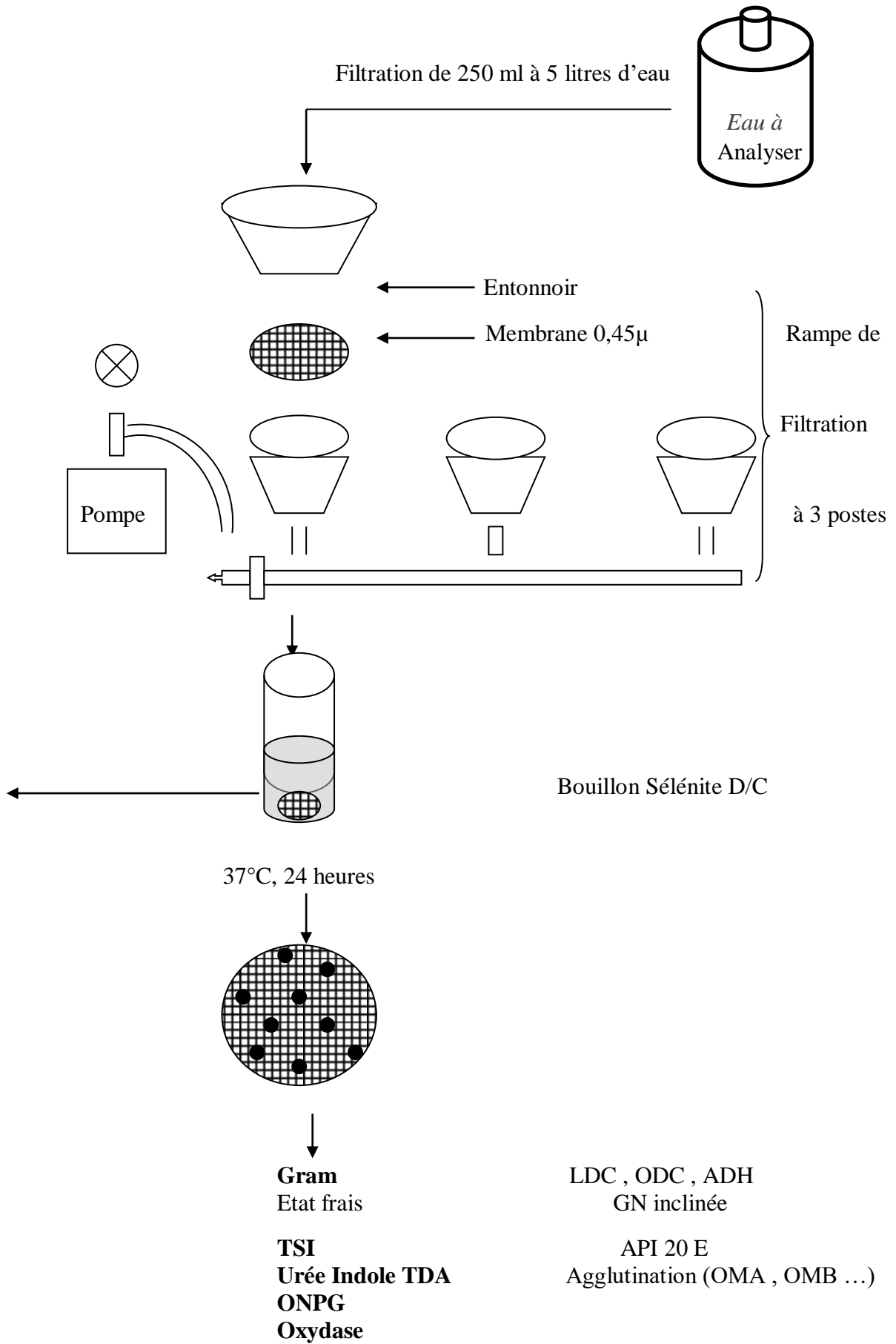


Schéma n°10

**TP 29 : Recherche de Vibrion cholérique**

Les Vibrionaceae se présentent sous forme de Bacilles Gram Négatifs droits ou incurvés (BGN), très mobiles, possédant une oxydase, aéro-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose sans production de gaz ni d'H<sub>2</sub>S. (Hautement pathogènes).

Jour 1. Premier Enrichissement.

Le premier enrichissement s'effectue sur le milieu Eau Peptonée Alcaline 10 fois concentré réparti à raison de 50 ml par flacon auquel on ajoute aseptiquement 450 ml d'eau à analyser au moment du prélèvement.

Ce dernier sera par la suite incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures, comme l'indique le schéma n°11.

Jour 2. Deuxième enrichissement et Isolement.

Ce flacon fera l'objet :

- d'une part, d'un deuxième enrichissement sur milieu EPA en tubes à raison de 1 ml
- d'autre part, d'un isolement sur gélose GNAB 1.

L'incubation se fait donc à 37°C pendant 24 h.

Jour 3. Lecture des boîtes et Identification.

- D'une part, le tube d'EPA fera l'objet d'un isolement sur GNAB 2,
- D'autre part, la boîte de gélose GNAB 1 subira une lecture en tenant compte du fait que les Vibrions se présentent le plus souvent sous forme de grosses colonies lisses et transparentes caractéristiques.

Identification morphologique et biochimique.

Cinq colonies caractéristiques et distinctes feront l'objet d'une identification morphologique et biochimique qui se déroule comme suit :

- Etat frais (bacilles, mobilité),
- Coloration de Gram (bacilles Gram négatifs),
- Oxydase (+),
- Ensemencement d'un tube de KIA qui sera incubé à 37°C, 24 h (Saccharose, Glucose, Gaz et H<sub>2</sub>S),
- Ensemencement d'un tube de gélose nutritive inclinée qui sera incubé à 37°C, 24 h qui servira à l'agglutination sur lame,
  - Si l'agglutination avec l'eau physiologique et au sérum polyvalent O1 est négative, faire une mini galerie basée sur l'étude des acides aminés en vue de différencier entre les Vibrions, les Pleisiomonas et les Aéromonas selon le tableau suivant :

	LDC	ODC	ADH
Vibrions	+	+	-
Aéromonas	-	-	+
Pleisiomonas	+	+	+

S'il s'agit du genre *Vibrio*, répondre : *Vibrio* NON Agglutinable (NAG).

- Si l'agglutination avec l'eau physiologique et au sérum polyvalent O1 est positive, il s'agit d'un *vibrio* rough (auto-agglutinable).
- Si l'agglutination avec l'eau physiologique est négative et positive au sérum polyvalent O1, répondre : *Vibrio* cholérique.

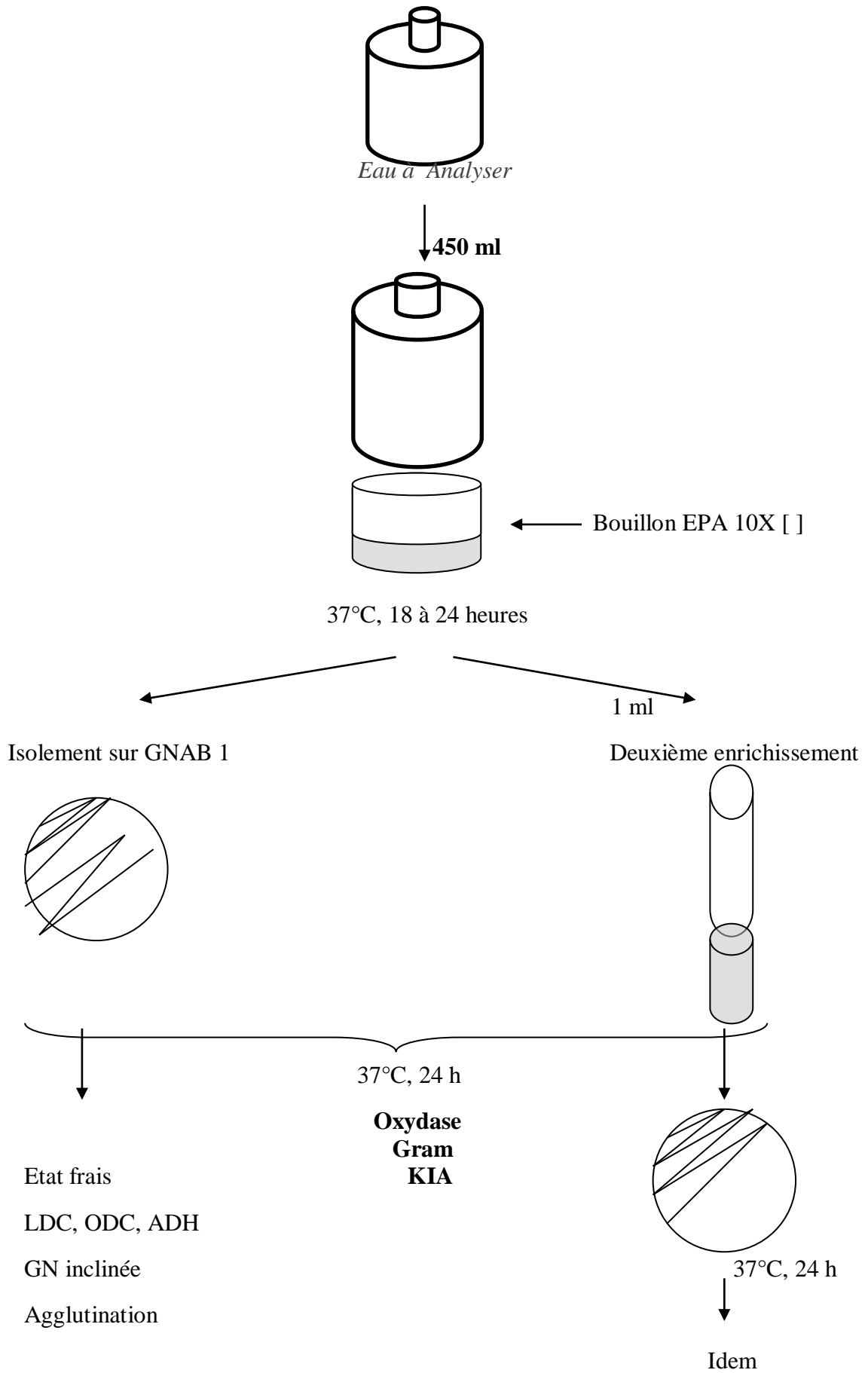


Schéma n°11

**TP 30 : Recherche de Staphylococcus aureus par la méthode de GC**

Staphylococcus aureus se présente sous forme de Cocci, en grappe de raisin, Gram +, possédant une catalase et une coagulase.

Selon la disponibilité des milieux de culture, trois techniques différentes sont recommandées pour la recherche de Staphylococcus aureus à savoir :

- méthode de Baird Parker
- méthode d'enrichissement sur milieu de Giolitti Cantonii
- méthode d'enrichissement sur milieu de Chapman.

Dans le cas des poissons, la recherche de Staphylococcus aureus par la méthode d'enrichissement sur milieu de Giolitti Cantonii est recommandée.

***Méthode d'enrichissement au milieu de Giolitti Cantonii.***Préparation du milieu d'enrichissement.

Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu de Giolitti Cantonii pour y ajouter 15 ml d'une solution de Tétrurite de Potassium.

Mélanger soigneusement. Le milieu est alors prêt à l'emploi.

Insemencement.

A partir des dilutions décimales retenues ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ), porter aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube à vis stérile.

Ajouter par la suite environ 15 ml du milieu d'enrichissement comme l'indique le schéma n° 12. Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture.

Seront présumés positifs, les tubes ayant virés au noir.

Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de Staphylococcus aureus, ces tubes feront l'objet d'une confirmation par isolement sur gélose Chapman préalablement fondue, coulée en boîtes de pétri et bien séchées.

Les boîtes de Chapman ainsiensemencées seront incubées à leur tour à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après ce délai, repérer les colonies suspectes à savoir les colonies de taille moyenne, lisses, brillantes, pigmentées en jaune et pourvues d'une catalase et d'une coagulase.

Expression des résultats.

- Si à la dilution  $10^{-3}$ , le tube a noirci au bout de 24 heures d'incubation, et à l'isolement sur Chapman, il n'y a pas de colonies caractéristiques ; ce tube est considéré comme positif et le dénombrement correspond à l'inverse de la dilution en question à savoir 1000 Staphylococcus aureus par gramme de produit.
- Si par contre, il y a noircissement uniquement à la dilution  $10^{-1}$  et apparition de colonies caractéristiques sur milieu de Chapman correspondant, il faut tenir compte de la dilution en question et le nombre réel de Staphylococcus aureus correspond à l'inverse de la dilution soit 10 par gramme de produit.

Pour s'assurer qu'il s'agit bien de colonies de Staphylococcus aureus, effectuer sur 2 à 3 colonies de chaque boîte des tests biochimiques rapides à savoir :

- une épreuve à la catalase (à l'aide de l'eau oxygénée),
- une épreuve à la coagulase (à l'aide de plasma de lapin).

Quelques caractères biochimiques de différentes espèces de staphylocoques sont résumés dans le tableau ci - après.

Staphylocoque	Auréus	Intermédius	Saprophyticus	Epidermitis
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Mannitol en anaérobie	+	-	-	-
Résistance à la Novobiocine (5 Micro-gr)	S	S	R	S

A partir des dilutions décimales :

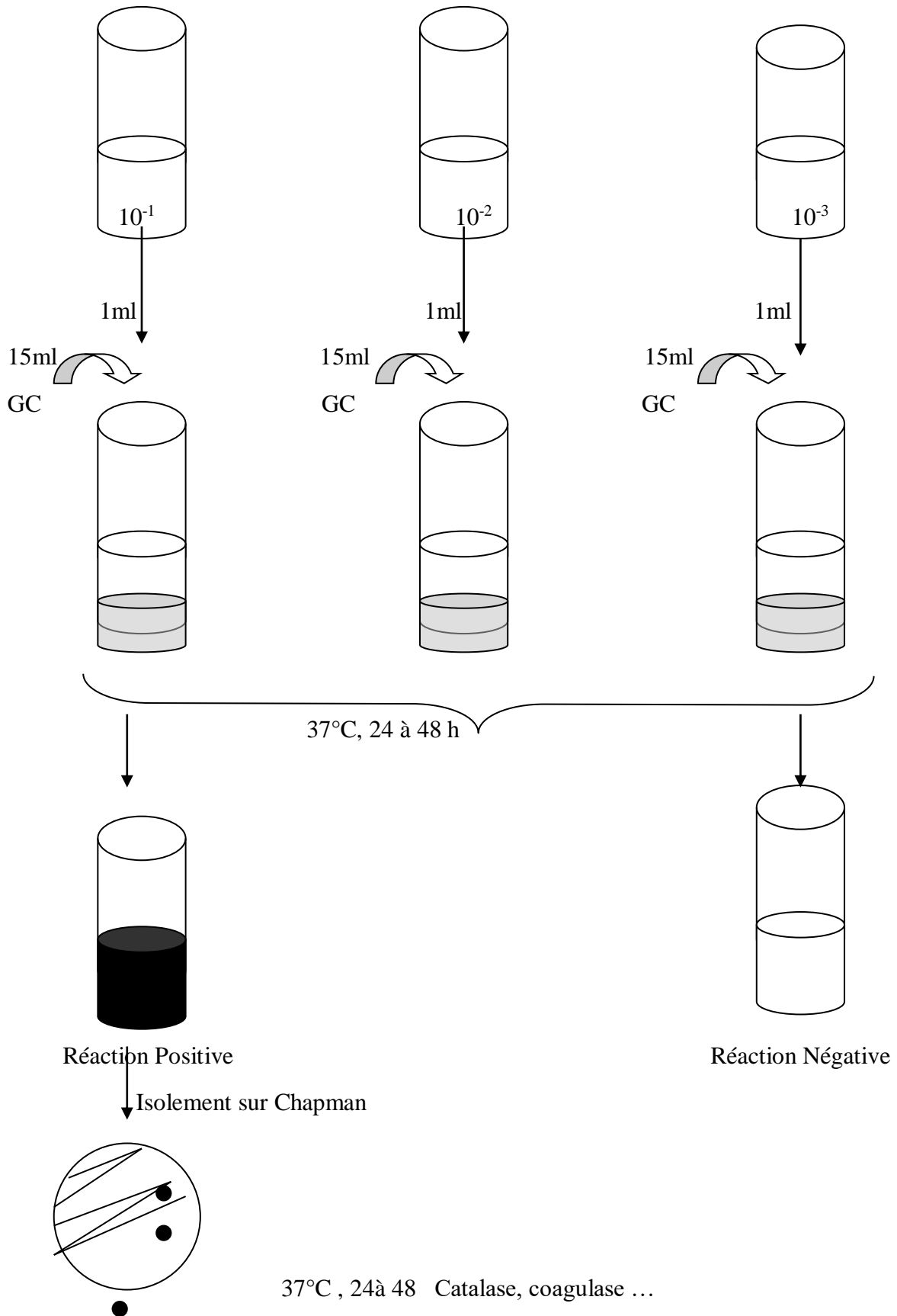


Schéma n°12

**Table NPP**

1 X 50 ml	5 X 10 ml	5 X 1 ml	Nombre caractéristique	Limites de confiance	
				Inférieure	Supérieure
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0,5	4
0	0	2	2	<0,5	6
0	1	0	1	<0,5	4
0	1	1	2	<0,5	6
0	1	2	3	<0,5	8
0	2	0	2	<0,5	6
0	2	1	3	<0,5	8
0	2	2	4	<0,5	11
0	3	0	3	<0,5	8
0	3	1	5	<0,5	13
0	4	0	5	<0,5	13
1	0	0	1	<0,5	4
1	0	1	3	<0,5	8
1	0	2	4	<0,5	11
1	0	3	6	<0,5	15
1	1	0	3	<0,5	8
1	1	1	5	<0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	<0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34



1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	59
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	100
1	4	5	43	15	120
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	100
1	5	2	54	18	140
1	5	3	92	27	220
1	5	4	160	39	450
1	5	5	>240		