

## **TP n°14 Staphylococcus Micrococcus**

### **Travail sur la soucheensemencée sur GNI :**

- 1 - Observation microscopique au Gram et test enzymatique.
- 2 - Contrôler les caractères de famille :
  - Recherche du type respiratoire (VF)
  - Étude de la voie d'attaque du glucose (CTA)
  - Recherche de l'ADH
  - Recherche de la résistance a de forte concentration en NaCl (Chapman)
- 3 - Identification en ensemencant une galerie ApiStaph + GO

### **Travail sur le bouillon cœur-cervelle:**

- 1 - Recherche de la coagulase libre sur plasma de lapin
- 2 - Recherche de la thermonucléase sur gélose à l'ADN et au bleu de toluidine
- 3 - Étude de la sensibilité à la novobiocine sur Mueller Hinton
- 4 - Recherche de la croissance sur Baird Parker (réduction du tellurite + lécithinase et protéinase)
- 5 - Ensemencement d'une GO

# ApiStaph

Système d'identification des staphylocoques et microcoques

Pour *diagnostic in vitro*

## UTILISATION

API SIAPH est un système d'identification des genres *Staphylococcus* Kocurra et *Micrococcus* comportant des tests biochimiques standardisés et miniaturisés et une base de données spécifique. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

## PRINCIPE

Les différents tests de la galerie se présentent sous forme déshydratée. Leur reconstitution se fait lors de l'addition à chaque tube, d'API STAPH Médium ensemencé avec la souche à étudier. Celle-ci doit être cultivée au préalable sur un milieu approprié.

L'incubation se fait à 35-37°C durant 18-24 heures. La lecture et l'interprétation sont réalisées à partir des informations contenues dans la présente notice. Cette interprétation peut être facilitée par l'utilisation du Catalogue Analytique API STAPH ou d'un logiciel d'identification.

## REACTIFS

Composition du coffret (25 tests) :

- 25 galeries API STAPH 25 boîtes d incubation
- 25 ampoules d'API SIAPH Médium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice technique

Produits complémentaires non fournis (\* Produits disponibles chez bioMérieux - consulter tarif ou bioMérieux pour leur référence)

- Huile de paraffine (\*)
- Réactifs
  - VP 1 (\*)
  - VP 2 (\*)
  - NIT 1 (\*)
  - NIT 2 (\*)
  - ZYM A (\*)
  - ZYMB (\*)**
- McFarland Standard (\*)
- Catalogue Analytique API STAPH (\*) ou logiciel d'identification (\*)
- Pipettes ou PSlpettes (\*)
- Portoir pour ampoules (\*)
- Protège-ampoules (\*)

Matériel de laboratoire nécessaire :

- Étuve à 35-37°C
- Réfrigération
- Bec Bunsen
- Crayon marqueur

## COMPOSITION DES MILIEUX ET REACTIFS

<b>API STAPH</b> <b>Médium</b> 6 mL	Extrait de levure	0,5g
	Bactopeptone	10g
	NaCl	5g
	Oligoéléments	10mL
	Eau déminéralisée	qsp 1000mL
<b>Réactif VP 1</b> 5mL	Hydroxyde de potassium	40g
	H <sub>2</sub> O	100mL
<b>CORROSIF</b>		
R3S Provoque de graves brûlures S2 Conserver hors de portée des enfants S26 En cas de contact avec les yeux laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste S27 Enlever immédiatement tout vêtement souillé ou éclaboussé S37/39 Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage		
<b>Réactif VP 2</b> 5mL	α-naphtol	6g
	Éthanol	100mL
<b>FACILEMENT INFLAMMABLE</b>		
S7 Conserver le récipient bien fermé S16 Conserver à l'écart de toute source d'ignition Ne pas fumer		
<b>Réactif NIT 1</b> 5mL	Acide sulfanilique	0,4g
	Acide acétique	30g
	H <sub>2</sub> O	70mL
<b>CORROSIF</b>		
R34 Provoque des brûlures S2 Conserver hors de portée des enfants S23 Ne pas respirer les vapeurs S26 En cas de contact avec les yeux lave immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste		
<b>Réactif NIT 2</b> 5mL	N,N-diméthyl-1 naphtylamine	0,6g
	Acide acétique	30g
	H <sub>2</sub> O	70mL
<b>CORROSIF</b>		

	R34 Provoque des brûlures S2 Conserver hors de portée des enfants S23 Ne pas respirer les vapeurs S26 En cas de contact avec les yeux lave immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste	
<b>Réactif ZYM A</b> 8mL	Tris-hydroxyméthyl-aminométhane	25 g
	Acide chlorhydrique a 37 %	11mL
	Laurylsulfate Na	10 g
	H <sub>2</sub> O	100mL
<b>IRRITANT</b>		
R36/38 Irritant pour les yeux et la peau S26 En cas de contact avec les yeux lave immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste S36 Porter un vêlement de protection approprié		
<b>Réactif ZYM B</b> 8mL	Fast Blue BB	0,35g
	2-méthoxy-éthanol	100mL
<b>TOXIQUE</b>		
R60 Peut altérer la fertilité R61 Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant R10 Inflammable R20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion S53 Éviter l'exposition (éviter les contacts avec la peau et les yeux, l'inhalation des vapeurs, toute surchauffe brutale) S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)		

## PRECAUTIONS

- Destiné au diagnostic *in vitro* seulement
- Pour usage professionnel uniquement
- Ne pas pipeter à la bouche les prélèvements et les réactifs
- Éviter le contact des réactifs avec la peau, les yeux et les vêtements
- 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
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
  - Placer l'ampoule dans le protège-ampoules
  - Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut)
  - Bien enfoncer le bouchon
  - Recouvrir la partie inclinée du bouchon avec la première phalange du pouce
  - Exercer une pression avec le pouce à la base de la partie inclinée du bouchon avec un mouvement vers l'extérieur de façon à casser l'extrémité de l'ampoule à l'intérieur du bouchon
  - Retirer l'ampoule du protège-ampoules et conserver le protège ampoules pour une utilisation ultérieure
- \* *Ampoule sans bouchon compte gouttes*
  - Enlever délicatement le bouchon
- \* *Ampoule avec bouchon compte-gouttes*
  - Renverser l'ampoule et la maintenir en position verticale
  - Appliquer une pression latérale sur le bouchon pour transférer la totalité du réactif dans le flacon compte gouttes
- Tous les produits inoculés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés de façon appropriée
- 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 "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue. Approved Guideline* - December 1997". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Micro-biological and Biomédical Laboratories. HHS Publication No (CDC) 93-8395. 3rd Edition (May 1993)" ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- A la fin du test, après lecture et interprétation tous les prélèvements souillures et produits inoculés (ampoules, pipettes, boîtes et galeries) doivent être autoclavés, incinérés ou immergés dans un désinfectant germicide avant élimination
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- 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.

## CONSERVATION DES GALERIES ET MILIEUX

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage

## CONSERVATION DES REACTIFS

Les réactifs doivent être conservés à l'obscurité à 2-8°C (sauf VP 1, NIT 1 et ZYM A qui peuvent être conservés, à 2-30°C) jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

Après ouverture des ampoules et transfert des réactifs dans les flocons compte-goutte, les réactifs peuvent être conservés 1 mois (ou jusqu'à la date limite d'utilisation si celle-ci est antérieure) noter la date d'ouverture sur l'étiquette des flacons.

Le réactif ZYM B est très sensible à la lumière : entourer le flacon d'une feuille d'aluminium et ne sortir le réactif du réfrigérateur que le temps nécessaire à son utilisation.

Veiller à ne pas le laisser longtemps sur la paillasse.

Le réactif ZYM B présente à l'état normal une teinte jaune.

Éliminer le réactif dès qu'un changement de couleur rosé (signe d'altération) est observé.

Au froid, le réactif ZYM A produit un précipité n'altérant pas ses propriétés et disparaissant en le laissant revenir à température ambiante.

## UTILISATION DES REACTIFS

- Laisser les réactifs revenir à la température ambiante (20-30°C) avant emploi
- Ouvrir les ampoules de réactifs et effectuer le transfert comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoules avec bouchon compte-gouttes)
- Délivrer une goutte de réactif
- Bien refermer le flacon après usage et le conserver comme indiqué au paragraphe "Conservation des réactifs"

## MODE OPERATOIRE

### Traitement des prélèvements

API STAPH ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autre. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

### Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5mL d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation)
- Sortir la galerie de son emballage individuel
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation

### Préparation de l'inoculum

- Réaliser une préculture sur gélose au sang (ou Agar P) 18-24 H à 35-37°C
- Vérifier l'appartenance de la souche à la famille des *Micrococcaceae* (morphologie, Gram, catalase,... ), ainsi que sa pureté
- Ouvrir une ampoule d'API STAPH Médium comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoule sans bouchon compte-gouttes)
- Préparer une suspension bactérienne homogène d'opacité égale à 0,5 de McFarland

### Inoculation de la galerie

- A l'aide d'une pipette ou d'une PSlpette, remplir les tubes de la galerie avec AP STAPH Mediumensemencé. Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau du tube. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe
- Renfermer la boîte d'incubation
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24 heures

### Lecture de la galerie

- Lire les réactions conformément au Tableau de Lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants
  - Test VP VP 1 et VP 2

Attendre 10 minutes. Une couleur **rosé franche ou violette** indique une réaction **positive**. Une couleur **rosé pâle ou rosé claire** obtenue après 10 minutes doit être considérée **négative**.

- Test NIT NIT 1 et NIT 2

Attendre 10 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive**.

- Test PAL ZYM A et ZYM B

Attendre 10 minutes. Une coloration **violette** indique une réaction **positive**.

- Noter les résultats sur la fiche de résultats

### Identification

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**

- Détermination du profil numérique

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique la résistance à la lysostaphine (200µg/mL) caractéristique des Micrococques, qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

- Identification

Elle est réalisée

- à l'aide du Catalogue Analytique : Rechercher le profil numérique dans la liste des profils
- à l'aide du logiciel d'identification : Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres

### CONTROLE DE QUALITE

Les milieux galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable au laboratoire avec les souches suivantes.

	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V	-	+	+	-	+	-	+
3	-	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-
4	-	+	+	+	-	-	-	V	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

Profils obtenus après culture des souches sur gélose au sang de mouton

1. Micrococcus spp ATCC 700405
2. Staphylococcus xylosus ATCC 700404
3. Staphylococcus lentus ATCC 700403
4. Staphylococcus capitis ATCC 35661

ATCC : American Type Culture Collection. 10801 University Boulevard Manassas VA 20110 2209. USA

### LIMITATIONS

- Le système API STAPH est destiné à l'identification des espèces mentionnées dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice) et à elles seules. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

### VALEURS ATTENDUES

Se référer au Tableau d'Identification en fin de cette notice pour les valeurs attendues des différentes réactions biochimiques

### PERFORMANCES

- 2275 souches cliniques et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
- 92,13% des souches ont été correctement identifiées (tests complémentaires nécessaires pour 54,55 % des souches)
  - 4,66 % des souches n'ont pas été identifiées
  - 3,21 % des souches ont été mal identifiées

**TABLEAU DE LECTURE**

TESTS	SUBSTRATS	QTE (mg)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun	-	Témoin négatif	rouge	-
GLU	D-Glucose	1,56	(Témoin positif)  Acidification à partir du carbohydate	rouge	jaune
FRU	D-Fructose	1,4			
MNE	D-Mannose	1,4			
MAL	Maltose	1,4			
LAC	Lactose	1,4			
TRE	D-Trehalose	1,32			
MAN	D-Mannitol	1,36			
XLT	Xylitol	1,40			
MEL	D-Melibiose	1,32			
NIT	Nitrate de potassium	0,08			
				Incolore – rose pâle	rouge
PAL	$\beta$ -naphtyl ac phosphate	0,024	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min	
				jaune	violet
VP	Pyruvate de sodium	1,9	Production d'acétyl méthyl-carbinol	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				Incolore – rose pâle	Violet - rose
RAF	Raffinose	1,56	Acidification à partir du carbohydate	rouge	jaune
XYL	Xylose	1,4			
SAC	Saccharose	1,32			
MDG	$\alpha$ -méthyl-D-glucoside	1,28			
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28			
ADH	Arginine	1,9	Arginine dihydrolase	jaune	orange-rouge
URE	Urée	0,76	Uréase	jaune	rouge-violet

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

- Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.

**TABLEAU D'IDENTIFICATION**  
% de réactions positives après 24 h à 35-37°C

API STAPH	V4.0	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	L.STR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0	
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0	
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0	
<i>Staphylococcus camosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0	
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0	
<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0	
<i>Staph cohnii ssp urealyticum</i>	0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0	
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0	
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0	
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0	
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0	
<i>Staphylococcus schleifen</i>	0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0	
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0	
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0	
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0	
<i>Kocuna kristinae</i>	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97	
<i>Kocuna vanans/rosea</i>	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95	
<i>Micrococcus spp.</i>	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91	