Annexe I

Les milieux de culture

1-**Hektoen** (en grammes par litre d'eau distillée)

Composition	Quantité
Peptone	**12g**
Extrait de levure	**3g**
NaCl	**5g**
Sels biliaires	**9g**
Thiosulfate de sodium	**5g**
Citrate de fer ammoniacal	**1,5g**
Lactose	**12g**
Salicine	**2g**
Saccharose	**12g**
BBT	**0,002g**
Fuchsine acide	**0 ,1g**
Agar	**14g**
PH final = 7,5 .Ne pas auto-claver	

2-Gélose nutritif (GN)

Composition	Quantité
Peptone	**5g /l**
extrait de viande	**1g /l**
extrait de levure	**5g /l**
chlorure de sodium	**5g /l**
Agar	**15g /l**
Auto-clavé à 121C° pendant 20 min.	

3-Sabauraud + chloramphénicol

Composition	Quantité
Peptone	**10g**
Glucose masse	**20g**
Agar-agar	**15g**
Eau distillée	**1000 ml**
vitamines et facteurs de croissance	
pH=6	

4- Chapman

Composition	Quantité
Peptone	**10g**
Extrait de viande de boeuf	**1g**
Chlorure de sodium	**75g**
Mannitol	**10g**
Rouge de phénol	**0,025g**
Agar-agar	**15g**
Eau distillée	**1L**
pH=7,5	
Auto-clave à 121C° pendant 20 min.	

5- Mueller-Hinton (MH)

Composition	Quantité
infusion de viande de boeuf	**300ml**
peptone de caseine	**17,5g**
amidon de mais	**1,5 g**
Agar	**17 g**
pH=7,4	
Auto-clavé à 121C° pendant 20 min.	

6.Préparation de la galerie AP 20 E :

Technique

Réunir fond et couvercle d'une boite d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillé stérile dans les alvéoles pour créé une atmosphère humide;

Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boite;

Sortir la galerie de son emballage;

Placer la galerie dans la boite d'incubation;

- **Préparation de l'inoculum**

A l'aide d'une pipette pasteur, prélever à partir une culture pur jeun sur milieu gélosé (Hekteon);

Réaliser une suspension bactérienne dense dans 10ml d'eau physiologique stérile en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu;

- **Inoculation de la galerie**

Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette pasteur (pour éviter la formation des bulles au fond de tube, poser les points de la pipette sur la coté de la cupule, en inclinant légèrement la boit d'incubation vers l'avant, et incubé pendant 24h à 37°C.

Annexe II

Tableau 1. Les résultats de l'examen direct après coloration au bleu de méthylène et de Gram

Et la mise en culture sur les différents milieux (Chapman, Hektoene, GN, sabouraud)

	Milieu Chapman	Milieu Hektoene	Milieu Sabouraud	Coloration de gram		Coloration Bleu de Méthylène
P1	+	_	_	Coques	_	_
P2	+ NEF	+	+	coque	Bacilles	_
P3	+	+	+	Coques	Bacilles	_
P4	_	_	_	_	_	Polynucléaire neutrophile
P5	+NEF	+	+	Coques	Bacilles	-
P6	+NEF	+	+	Coques	Bacilles	_
P7	+NEF	+	+	Coques	Bacilles	_
P8	+	+	_-	Coques	Bacilles	-
P9	+	+	+	Coques	Bacilles	-
P10	+	+	-	Coques	Bacilles	-
P11	+	+	+	Coques	Bacilles	-
P12	+	+	+	Coques	Bacilles	-
P13	-	-	-	-	-	-
P14	+NEF	+	+	Coques	Bacilles	-
P15	-	-	-	-	-	-
P16	+NEF	+	-	Coques	Bacilles	-
P17	+	-	-	Coques	-	-
P18	-	-	-	-	-	-
P19	+	+	+	Coques	Bacilles	-
20	+	+	+	Coques	Bacilles	-
21	+NEF	_	-	Coques	_	Polynucléaire neutrophile
22	+NEF	-	-	Coques	-	-
23	-	+NEF	-	-	Bacilles	-
24	-	+	-	-	Bacilles	-
25	+	+	+	Coques	Bacilles	_
26	_	_	-	_	_	_
27	+	+	+	Coques	Bacilles	_

NEF : antibiogramme non effectuer

Annexe III

1. La technique de coloration de Gram

1. On réalise un frottis sur une lame de microscope à partir du prélèvement a l'aide de l'écouvillon
2. Le passage rapide du la lame à la flamme du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.
3. Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1mm.
4. Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée jusqu'à élimination des colorants en excès
5. Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn.
6. Laver à nouveau à l'eau.
7. Décoloration par l'alcool jusqu'à disparition de la couleur violette
8. Laver à l'eau.
9. Contre-colorer en déposant la solution de **fuchsine** (rose) pendant 1 minute.
10. Laver à l'eau.
11. Les lames doivent être parfaitement sèches.
12. Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

2.La technique de coloration de bleu de méthylène

1. Réaliser un frottis à partir du prélèvement et le fixer
2. Le recouvrir de bleu de méthylène n et laisser agir 3 min
3. Rincer à l'eau distillée
4. Les lames doivent être parfaitement sèches

Annex IV :

Patient	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
P2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P5	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
P6	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P7	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P9	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P10	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P11	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
P12	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P16	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
P19	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
P20	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
P24	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P25	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

P2	**Pasteurella pneumotropica/haemolytica**
P3	**Flavimonas horyzihabitans**
P5	**Serratia marcescens**
P6	**Enterobacter cloacae**
P7	**Proteus mirabilis**
P8	**Klebsiella ornithinolytica**
P9	**Proteus mirabilis**
P10	**Serratia liquefaciens**
P11	**Serratia liquefaciens**
P12	**Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae**
P16	**Serratia marcescens**
P19	**Serratia marcescens**
P20	**Enterobacter aerogenes**
P24	**Serratia liquefaciens**
P25	**Morganella morganii**

Matériel :

Appareillages :

- Autoclave 120°C ;
- Balance électrique de précision ;
- Etuve à 37°C ;
- Microscope optique ;
- Plaque chauffante ;
- Réfrigérateur (-20°C à 5°C**) .**

c.Verrerie :

- Béchers (1000 ml, 500 ml) ;
- Flacons stériles 250 ml ;
- Lames ;
- Tubes à essai.

d. Outil :

- Spatules ;
- Anse de platine ;
- Bec Bunsen ;
- Boites de Pétri ;
- Ecouvillons ;
- Pince .