



**VALIDATION DE METHODES
D'IDENTIFICATION D'ENTEROBACTERIES**

THESE

**POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLOME D'ETAT)**

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

Le 31 Juillet 2009

PAR

Mlle. Traudel Josiane Nadia SARR

Née le 26 Décembre 1983 à Mbour (SENEGAL)

MEMBRES DU JURY

Président :	M. Issa	LO	Professeur
Membres :	M. Cheikh S. B.	BOYE	Professeur
	M. Bara	N'DIAYE	Maitre de Conférences agrégé
	M. Djibril	FALL	Maitre de Conférences agrégé
Directeur de Thèse :	M. Cheikh S.B.	BOYE	Professeur
Co-Directeur de Thèse :	Mme Edwige	H. FRANCISCO	Pharmacien biologiste

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH :	Arginine dihydrolase
ADN :	Acide desoxyribonucléique
ADO :	Adonitol
ADP :	Adénosine diphosphate
API :	Appareil et procédé d'identification
ARN :	Acide ribonucléique
ATCC :	American Type culture collection
ATP :	Adénosine triphosphate
BTS :	Bouillon trypticase-soja
CC :	Citrate de christensen
CS :	Citrate de Simmons
DUL :	Dulcitol
EMB :	Eosine bleu de méthylène
ESC :	ESC
GEL :	Gélatine
GLU :	Glucose
H₂S :	Sulfure d'hydrogène
IND :	Indole
LAC :	Lactose
LDC :	Lysine décarboxylase
MAL :	Malonate
MAN :	Mannitol
MEVAG :	Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides
MH :	Müller Hinton
ML :	Mililitre
NA	Not Available
NIT :	Nitrate
ODC :	Ornithine décarboxylase
ONPG :	Orthonitrophényl
PDA :	Phénylalanine désaminase
PHB :	Polyhydroxybutyrate
RHA :	Rhamnose
SAC :	Saccharose
SOR :	Sorbitol
SP :	Espèce
t	Temps
TSA :	Tryptocaséine soja
UFC :	Unité formant colonies

VP :	Voges Proskauer
XYL :	Xyloses
μl :	Microlitre
%	Pourcentage
+	Positif
-	Négatif

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les 7 phases de la cinétique de croissance d'une population bactérienne d'après Buchanan (1919)	20
Figure 2 : Matériels et milieux nécessaires au dénombrement sur boîtes de Pétri.....	31
Figure 3 : Technique de dénombrement sur boîte de Pétri.....	41

LISTE DES TABLEAU

Tableau I :	Classification des espèces d'entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine.....	07
Tableau II :	Plan de contrôle de stérilité des microplaques CSB Entérobactéries.....	33
Tableau III :	Contrôle d'efficacité des substrats des microplaques CSB entérobactéries.....	34
Tableau IV :	Tableau de lecture des entérobactéries.....	43
Tableau V :	Dénombrement De <i>Escherichia coli</i>	47
Tableau VI :	Profil biochimique de <i>E. coli</i> en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques.....	48
Tableau VII :	Dénombrement de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
Tableau VIII :	Profil biochimique de <i>K. pneumoniae</i> en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques.....	51
Tableau IX :	Dénombrement de <i>Salmonella paratyphi A</i>	53
Tableau X :	Profil biochimique de <i>Salmonella paratyphi A</i> en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation.....	54
Tableau XI :	Résultats des tests de répétabilité avec un inoculum de 10^7	62
Tableau XII :	Résultats des tests de répétabilité avec un inoculum de 10^8	63
Tableau XIII :	Résultats des tests de reproductibilité avec un inoculum de 10^7	64
Tableau XIV :	Résultats des tests de reproductibilité avec un inoculum de 10^8	65

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	01
PREMIERE PARTIE : GENERALITES.....	04
I. ENTEROBACTERIES.....	05
1.1. Définition	05
1.2. Taxonomie.....	05
1.2.1. Historique	05
1.2.2. Habitat	06
1.2.3. Classification.....	06
1.3 caractères bactériologiques.....	08
1.3.1 caractères morphologiques	08
1.3.2. caractères culturels.....	08
1.3.3. caractères biochimiques.....	08
1.3.3.1. Production d'hydrogène sulfuré (SH ₂).....	08
1.3.3.2. Recherche de l'uréase.....	09
1.3.3.3. Production d'indole.....	09
1.3.3.4. Recherche des décarboxylases.....	09
1.3.3.5. Recherche des désaminases oxydatives.....	10
1.3.3.6. Utilisation du Citrate de Simmons (CS).....	10
1.3.3.7. Utilisation du malonate.....	10
1.3.3.8. Action de la Phényl Alanine Désaminase (PDA).....	10
1.3.3.9. Milieu au Citrate de Christensen (CC).....	10
1.3.3.10. Recherche de l'acétoïne ou Réaction de Voges-Proskauer (VP).....	11
1.3.3.11. Test à l'ONPG (Ortho nitrophényl β-D-Galactopyranoside).....	11

1.4. Etude des genres Escherichia, Klebsiella, et Salmonella.....	11
1.4.1. Escherichia.....	11
1.4.2. Klebsiella.....	13
1.4.3. Salmonella.....	14
II. QUELQUES NOTIONS SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE	15
2.1. Conditions nutritionnelles et environnementales.....	15
2.1.1. Besoins nutritifs de la cellule bactérienne.....	15
2.1.1.1. nutriments de base permettant de générer la biomasse..	15
2.1.1.2. aliments énergétiques.....	17
2.1.2. Autres facteurs intervenant dans la croissance des bactéries.	17
2.1.2.1. pH.....	17
2.1.2.2. pression osmotique du milieu.....	18
2.1.2.3. température.....	18
2.1.2.4. L'oxygène moléculaire.....	18
2.2. Croissance bactérienne.....	19
2.2.1. Définition	19
2.2.2. courbe et phases de la croissance	19
2.2.3. Techniques de mesure de la croissance bactérienne	21
2.2.4. Conditions de croissance des entérobactéries étudiées.....	23
III. QUELQUES PARAMETRES ET PROCEDURES DE VALIDATION	24
3.1. validation	24
3.2. Procédures et paramètres de validation	25
3.2.1. Procédures	25
3.2.2. Paramètres	26
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL.....	27

I.	CADRE D'ETUDE.....	28
II.	MATERIELS ET METHODES.....	28
	2.1. Matériels et réactifs.....	28
	2.1.1. Matériels.....	28
	2.1.1.1. Souches bactériennes.....	28
	2.1.1.2. Matériel pour l'identification.....	28
	2.1.1.3. Matériel pour la conservation des souches.....	29
	2.1.1.4. Matériel pour l'enrichissement et l'isolement	29
	2.1.2. Réactifs.....	30
	2.1.2.1. Réactifs pour l'enrichissement et l'isolement	30
	2.1.2.2. Réactifs pour l'identification.....	30
	2.1.2.3. Réactifs de révélation.....	31
	2.2. Contrôle de qualité des tests effectués.....	32
	2.2.1. Contrôle de stérilité des milieux d'enrichissement et d'isolement.....	32
	2.2.2. Contrôle de qualité des galeries d'identification déshydratées.....	32
	2.2.2.1. Contrôle de stérilité.....	32
	2.2.2.2. Contrôle d'efficacité	33
	2.2.2.3. Contrôle des appareils.....	35
	2.2.2.4. Contrôle des paramètres dynamiques.....	35
	2.3. Méthodes.....	36

2.3.1. Identification des souches de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , et <i>Salmonella paratyphi A</i>	36
2.3.2. Recherche de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification des entérobactéries par les galeries Micro-CSB.....	39
2.3.2.1. Préparation de l'inoculum de départ.....	39
2.3.2.2. Incubation et prélèvements.....	40
2.3.2.3. Dénombrement bactérien sur boîte de pétri.....	40
2.3.2.4. Ensemencement des galeries Micro-CSB.....	42
2.3.3. Exploitation des résultats	44
2.3.4. Validation des résultats.....	44
2.3.4.1. Test de reproductibilité.....	44
2.3.4.2. Test de répétabilité.....	45
III. EXPLOITATION DES RESULTATS.....	46
3.1. Résultats des galeries d'identification en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation.....	46
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	46
3.1.1.1. Résultats du dénombrement.....	46
3.1.1.2. Résultats des galeries Micro-CSB	46
3.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
3.1.2.1. Résultats du dénombrement	49
3.1.2.2. Résultats des plaques Micro-CSB.....	50
3.1.3. <i>Salmonella paratyphi A</i>	52
3.1.3.1. Résultats du dénombrement.....	52
3.1.3.2. Résultats des plaques Micro-CSB.....	53
3.2. Détermination du temps d'incubation et de l'inoculum	

correspondant.....	55
3.2.1 Analyse intraspécifique.....	55
3.2.2. Analyse interspécifique	59
3.2.2.1. Première méthode	59
3.2.2.2. Deuxième méthode.....	59
3.3. Validation des résultats de l'analyse interspécifique.....	60
3.3.1. Résultats des tests de répétabilité et reproductibilité.....	61
3.3.1.1. Répétabilité	61
3.3.1.2. Reproductibilité.....	63
3.3.2. Probabilités d'identification	67
3.3.2.1. Avec un inoculum de 10^7 UFC/ml	67
3.3.2.2. Avec un inoculum de 10^8 UFC/ml	71
IV. COMMENTAIRES.....	75
4.1. souches bactériennes.....	75
4.2. dénombrement sur boîte de pétri.....	75
4.3. Identification	76
4.3.1. choix de la méthode : Micro-CSB (Entérobactéries).....	76
4.3.2. Méthode d'étude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification.....	76
4.3.3. Exploitation des résultats	77
CONCLUSION.....	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83

RESUME

Dans un souci d'amélioration de l'utilisation des galeries Micro-CSB, des études sont menées depuis ces trois dernières années, et visent ainsi la possibilité d'identification en moins de 24h.

Notre travail s'inscrit dans ce cadre, et avait pour objectifs spécifiques :

- D'étudier la possibilité d'une bonne identification de *E. coli*, *K. pneumoniae*, et *S paratyphi A*, par les Micro-CSB Entérobactéries, en un temps d'incubation inférieur à 24h,
- De rechercher l'inoculum bactérien permettant cette identification,
- De valider expérimentalement les résultats obtenus.

Cette étude a eu lieu au laboratoire de Bactériologie et Virologie Fondamentale et Appliquées de l'UCAD II entre Janvier et Juin 2009, avec l'aide de partenaires mathématiciens.

Elle a porté sur trois souches déjà identifiées et conservées à -20°C :

- *Escherichia coli* ATCC 25922, souche de référence,
- 2 souches de contrôle : *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Paratyphi A*.

Les profils biochimiques obtenus pour chaque espèce en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation de la galerie, ont ensuite été analysés par deux méthodes : une analyse mathématique grâce au programme **R**, et une analyse directe des différents profils.

La validation des résultats de l'analyse par des tests de répétabilité, reproductibilité et le calcul des probabilités d'appartenance des espèces, nous a permis d'aboutir à la conclusion suivante : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Salmonella paratyphi A* peuvent être identifiés par les galeries Micro-CSB Entérobactéries, après **4h** d'incubation, avec un inoculum de 10^8 UFC/ml, en se basant sur l'ensemble des caractères biochimiques composant la galerie.

INTRODUCTION

Les Entérobactéries occupent une place très importante en pathologie infectieuse humaine. Ces bacilles à Gram négatif sont en effet responsables d'infections variées, bénignes ou graves.

Ces infections, si diverses dans leurs manifestations cliniques, sont parmi les plus fréquentes et parfois les plus sévères des infections bactériennes.

En effet, la diversité des espèces, dont certaines vivent en saprophytes au niveau de l'intestin, leur mobilité et leur rapidité de multiplication, font de cette famille bactérienne, l'une des plus aptes à coloniser divers organes et muqueuses.

Parmi la gamme très variée d'entérobactéries le plus souvent incriminées lors d'infections, trois espèces s'illustrent par leur fréquence d'isolement : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Salmonella paratyphi A*.

Escherichia coli, le plus fréquent, est un commensal du tube digestif de l'Homme. Il est le plus souvent responsable d'infections intestinales (gastro-entérites infantiles, de syndrome dysentérique...), uro-génitales, et d'autres (péritonites...) [27].

Klebsiella pneumoniae, commensal de l'intestin et des voies respiratoires de l'homme et des animaux, est l'agent de certaines pneumopathies aiguës, angines, otites, cystites et affections rénales [19].

Salmonella paratyphi A est présente dans l'eau et dans divers aliments ; c'est l'agent de la fièvre typhoïde et de certaines gastro-entérites [14].

Une bonne prise en charge de ces infections du fait des résistances aux antibiotiques s'avère nécessaire, et implique l'isolement et l'identification au laboratoire de la bactérie incriminée.

De nombreuses galeries d'identification sont actuellement disponibles :

- Les galeries classiques avec un nombre de caractères limités, et nécessitant parfois le recours à d'autres tests biochimiques complémentaires.
- Les galeries API, très répandues, très performantes mais de coût élevé.
- Au Sénégal, les galeries Micro-CSB, peu onéreuses, mises au point à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de Bactériologie et Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec.

Ces dernières, faciles d'utilisation, accessibles aux structures publiques de santé à moyens limités, ont fait la preuve de leur efficacité, notamment dans l'identification après 24h d'incubation.

Dans un souci d'amélioration de l'utilisation de ces galeries, notamment la possibilité de répondre aux cas d'urgences, des études sont menées depuis ces trois dernières années, et visent ainsi la possibilité d'identification en moins de 24h.

Notre travail s'inscrit dans ce cadre, et avait pour objectifs spécifiques :

- D'étudier la possibilité d'une bonne identification de *E. coli*, *K. pneumoniae*, et *S paratyphi A*, par les Micro-CSB Entérobactéries, en un temps d'incubation inférieur à 24h,
- De rechercher l'inoculum bactérien permettant cette identification,
- De valider expérimentalement les résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES

IV. LES ENTEROBACTERIES

1.1. Définition [11, 14,16, 29]

La famille des entérobactéries comprend plusieurs genres bactériens. Ce sont des bacilles à Gram négatif, immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire. Ils sont dépourvus d'oxydase et ont la faculté de fermenter le glucose, mais aussi de réduire les nitrates en nitrites.

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation de différents sucres, la production ou non de sulfure, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases).

1.2. Taxonomie

1.2.1. Historique [1, 14, 15, 28]

La période de naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe entre 1937 lorsque OTTO RAHN proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels on trouvait déjà des noms tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* ou *Shigella*.

Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67.

Avec les travaux de DON BRENNER et de PATRICK A.D. GRIMONT, cette famille a connu un essor et beaucoup de nouveaux genres et espèces furent découvertes.

En 1972, EDWARD et EWING intégraient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*.

En 1973, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés.x

En 1985, FARMER et COLL décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

1.2.2. Habitat [2, 13]

Les *Entérobactéries* sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont retrouvés soit à l'état pathogène, soit à l'état commensal. Mais cette localisation digestive n'est pas exclusive.

On les retrouve également dans l'environnement (sol, eau) où ils participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, à une dégénérescence ou à un ramollissement.

1.2.3. Classification

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. Cette classification est résumée dans le tableau I :

Tableau I : Classification des espèces d'entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine [29]

Groupes	Familles	Genre	Espèces
GROUPE I	<i>Edwardsielleae</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i>
			<i>S. paratyphi</i>
			<i>S. enteritidis</i>
GROUPE II	<i>Escherichieae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteria</i>
			<i>Shigella flexneri</i>
			<i>Shigella boydii</i>
			<i>Shigella sonnei</i>
	<i>Levineae</i>	<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
			<i>Klebsiella oxymore</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
			<i>Enterobacter cloaceae</i>
			<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Erwinia</i>		
GROUPE IV	<i>Proteae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
			<i>Proteus vulgaris</i>
			<i>Proteus rettgerii</i>
			<i>Providencia</i>
GROUPE V	<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
			<i>Y. pseudotuberculosis</i>

1.3 Les caractères bactériologiques

1.3.1 Les caractères morphologiques [4, 6, 25, 27]

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à gram négatif de 2 à 3 μ de long sur 0,6 μ de large généralement polymorphes. Les espèces les plus représentées sont mobiles grâce à une ciliature péritriche. Les autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*...). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez *Klebsiella*. La plupart des espèces pathogènes chez l'homme possèdent des pili (ou fimbriae) qui constituent des facteurs d'adhésion.

1.3.2. Les caractères culturaux [4, 13, 17,30]

Les entérobactéries aérobie-anaérobies facultatives se développent facilement sur milieux nutritifs simples.

Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives vers des colonies à surface sèche et rugueuse (type « rough » ou R).

Les colonies de bactéries capsulées telles que *Klebsiella* sont mucoïdes, plus grandes que les colonies S, avec une tendance à la confluence.

1.3.3. Les caractères biochimiques [24]

Le diagnostic de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude.

1.3.3.1. Production d'hydrogène sulfuré (SH₂)

La production de SH₂ par les microorganismes est mise en évidence par incorporation du fer ou du plomb dans le milieu destiné à cette étude. Il se forme un précipité noir de sulfure de fer ou de plomb. Ce soufre réduit va se combiner avec le fer ferreux Fe²⁺ qui vient du sulfate de fer.

1.3.3.2. Recherche de l'uréase

Les bactéries possédant une uréase active scinde l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniacque. Ceux-ci en se combinant donnent du carbonate d'ammonium.

Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu, ce qui se traduit par le virage de l'indicateur coloré, de l'orange au rose framboise ou dans de rares cas au rouge violacé.

1.3.3.3. Production d'indole

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une enzyme appelée tryptophanase. Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniacque.

L'indole est apolaire et réagit fortement avec le para diméthylamino-benzaldéhyde en milieu acide pour donner un anneau rouge qui remonte en surface.

1.3.3.4. Recherche des décarboxylases

Les décarboxylases (la Lysine décarboxylase, l'Ornithine décarboxylase, et l'Arginine dihydrolase) scindent les acides aminés, entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO₂.

Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH optimum : 3,5 à 5,5) et des conditions d'anaérobiose. Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré (le rouge phénol) et bien entendu un acide aminé.

Chez les bactéries à métabolisme, la fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme ; l'alcalinité due à l'amine entraîne ensuite le virage de l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement.

Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide, donc jaune.

1.3.3.5. Recherche des désaminases oxydatives

Les désaminases, enzymes induites, agissent sur les acides aminés en entraînant la formation des acides cétoniques correspondants.

Les acides cétoniques formés ont la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe^{3+} , réaction utilisée pour la lecture.

1.3.3.6. Utilisation du Citrate de Simmons (CS)

L'utilisation du citrate, comme seule source de carbone par les bactéries, se traduit par une alcalinisation du milieu (virage au bleu).

1.3.3.7. Utilisation du malonate

Le malonate inhibe le cycle de Krebs (inhibition de la succinate déshydrogénase).

Seules les bactéries qui peuvent utiliser le cycle glyoxalique sont capables de pousser sur un milieu au malonate.

L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions OH^- alcalinisant.

1.3.3.8. Action de la Phényl Alanine Désaminase (PDA)

La PDA, enzyme induite, agit sur la phényl alanine en entraînant la formation d'acide cétonique correspondant.

L'acide cétonique formé a la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe^{3+} donnant une coloration bleue.

1.3.3.9. Milieu au Citrate de Christensen (CC)

A la différence du Citrate de Simmons, ce milieu contient une faible quantité de glucose, d'extrait de levure et une source d'azote organique.

Dans ces conditions, certaines bactéries citrate négatif sur milieu de Simmons sont capables d'utiliser le citrate en milieu de Christensen.

La formation d'ions hydroxydes alcalinise le milieu (virage du jaune au rose).

1.3.3.10. Recherche de l'acétoïne ou Réaction de Voges-Proskauer (VP)

On étudie la formation de l'acétyl méthyl carbinol (A.M.C. ou acétoïne) soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit à partir du glucose.

En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétal).

1.3.3.11. Test à l'ONPG (Ortho nitrophényl β -D-Galactopyranoside)

Le terme ONPG hydrolase est plus à propos que celui de β -galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté du nitro-2-phénol et non de celui du β -galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas le lactose.

Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside ou le 2-naphtol- β -D-galactopyranoside. Ceux-ci sont utilisés comme substrats et libèrent respectivement l'ortho nitrophénol (jaune) et le β -naphtol.

1.4. Etude des genres *Escherichia*, *Klebsiella*, et *Salmonella*

1.4.1. *Escherichia* [8, 19, 30]

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce *Escherichia coli*. Les souches immobiles et agazogènes anciennement décrites comme *Alkalescens dispar* ne sont plus qu'un biovar de *Escherichia coli*.

❖ *Escherichia coli*

Hôte normal de l'intestin de l'Homme et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. La présence de colibacilles ou espèces voisines dans l'eau est un témoin de contamination fécale [5, 4].

Escherichia coli exprime les caractères généraux des entérobactéries. Il est en outre :

- Lactose +
- Indole +
- Citrate –
- Acétoïne –
- H₂S-
- gaz +
- Uréase –

Il existe différents pathotypes de *Escherichia coli* responsables d'infections intestinales :

- ETEC : Enterotoxinogen *Escherichia coli*, responsable de la « diarrhée des voyageurs » ou « turista » et des syndromes épidémiques dans les pays du Tiers-monde ;
- EIEC : Enteroinvasive *Escherichia coli*, encore appelé *Escherichia coli Shigella-like*, responsable de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale ;
- EHEC : Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, responsable des diarrhées sanglantes liées à la production de toxines ;
- EPEC : Enteropathogen *Escherichia coli*, responsable de gastro-entérites infantiles.

1.4.2. *Klebsiella* [15, 20, 24]

Au sein des entérobactéries, les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles généralement encapsulés.

On distingue cependant plusieurs espèces mais *Klebsiella pneumoniae* est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine.

❖ *Klebsiella pneumoniae*

Connue autrefois sous le nom de pneumobacille de FRIEDLANDER, *Klebsiella pneumoniae* est une bactérie commensale de l'intestin, des voies respiratoires de l'homme et des animaux.

Chez l'homme, elle est l'agent responsable des pneumopathies aiguës, d'angines, d'otites, de cystites et d'affections rénales.

Ce sont des bacilles à Gram négatif immobiles capsulés, surtout au sortir de l'organisme, très polymorphes.

Sur gélose : les colonies de type mucoïde ont un aspect caractéristique ; elles sont volumineuses (4 mm de diamètre), bombées, brillantes, opaques et souvent confluentes.

En bouillon, on note la formation d'un trouble dense avec collerette visqueuse.

Klebsiella pneumoniae est en général :

- Gaz +++
- Lactose +
- ONPG -
- Urée +
- Indole -
- VP +
- ODC -

1.4.3. *Salmonella* [7, 8, 30]

Présents dans l'eau et dans diverses denrées alimentaires, les *Salmonelles* sont pathogènes, soit exclusivement pour l'homme (*Salmonella typhi*), soit exclusivement pour l'animal (*Salmonella abortus ovis*).

Chez l'homme, elles sont responsables de la fièvre typhoïde et de gastro-entérites.

Chez l'animal, les tableaux cliniques sont variés : avortements chez différentes espèces, septicémies du jeune ou entérites.

La morphologie est celle des entérobactéries. Certaines souches habituellement mobiles peuvent à l'isolement se présenter sous forme immobile.

Les colonies mesurent en général 1,5 à 3 mm après 24 heures d'incubation à 37°C et apparaissent lors de l'isolement sous forme S.

Cependant on observe des colonies naines avec des sérotypes pathogènes pour les animaux (*Salmonella abortus ovis*, *Salmonella typhi suis*) et exceptionnellement avec des sérotypes pathogènes pour l'homme.

La plupart des salmonelles sont :

- H₂S + (sauf *S. paratyphi* A)
- LDC +
- ONPG -
- Indole -
- CS variable
- Gélatine -
- Uréase et TDA -.

V. QUELQUES NOTIONS SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE [10, 20, 25, 30,34]

2.1. Conditions nutritionnelles et environnementales

La croissance bactérienne est dépendante de la composition de son environnement, qui lui fournit toutes les substances indispensables et les conditions convenables à son développement.

2.1.1. Besoins nutritifs de la cellule bactérienne

Les bactéries ont toutes des besoins communs de base, comme eau, sources d'énergie, et nutriments (sources de carbone, d'azote et autres éléments nécessaires aux biosynthèses).

2.1.1.1. Les nutriments de base permettant de générer la biomasse

La première indication des besoins est liée à la constitution de la cellule bactérienne. L'analyse de la cellule bactérienne montre que 95% de son poids sec correspond à quelques éléments majeurs. D'autres éléments sont nécessaires en quantité faible : micro-éléments ou micronutriments.

❖ L'eau

L'eau représente 80 à 90% du poids cellulaire. C'est un élément fondamental, solubilisant les nutriments, assurant leur transport et réalisant des réactions d'hydrolyse. Un paramètre, l' A_w (activité de l'eau), qualifie la disponibilité de l'eau. Il est compris entre 0 et 1. Les micro-organismes exigent un certain seuil d'humidité. Si l' A_w est trop faible, la croissance diminue. Les formes de résistance des bactéries (endospores), peuvent se maintenir dans un environnement « sans eau libre ».

❖ **Macro-éléments**

Six de ces éléments représentent environ les 95% du poids sec de la bactérie. Ce sont le carbone, l'azote, l'oxygène, l'hydrogène, le phosphate et le soufre, mais aussi les constituants des acides nucléiques, glucides, lipides et protéines.

D'autres ont une moindre importance quantitative, par exemple : potassium, magnésium, calcium et fer (certains participant à l'activation d'enzymes).

❖ **Besoins en carbone**

Deux groupes de bactéries existent quant à l'assimilation du carbone : Ceux qui utilisent comme source unique de carbone, un carbone minéral (comme le CO₂) : ce sont les C-autotrophes. La réduction du carbone à partir de l'anhydride carbonique demande beaucoup d'énergie et de nombreuses bactéries ne peuvent effectuer cette transformation. Celles qui utilisent comme source de carbone, un composé organique, préformé et réduit par d'autres organismes sont les C-hétérotrophes. Souvent les substances sont en même temps des sources d'énergie.

Certaines bactéries peuvent utiliser le carbone minéral et organique (« C-mixotrophes »). Certains substrats carbonés ne sont pas assimilés mais servent de source d'énergie.

❖ **Micro-éléments**

Pour les autres bio-éléments, la cellule en demande de très faibles quantités. Ils sont souvent apportés comme impuretés du matériel, de l'eau, des sels utilisés pour fabriquer le milieu de culture. Citons les plus importants : Mn, Co, Cu, Mo, Zn, Ni.

2.1.1.2. Les aliments énergétiques

Les micro-organismes ont besoin d'énergie pour synthétiser la biomasse, pour réaliser un travail (mobilité, transport de substrats). La source d'énergie peut être la lumière ou souvent l'oxydation d'un substrat oxydable dit « énergétique » donneur d'électrons. La récupération de l'énergie sous forme d'ATP est liée, soit à un transfert d'électrons par des chaînes de transport à partir d'un donneur vers un accepteur, soit à une phosphorylation au niveau du substrat.

2.1.2. Autres facteurs intervenant dans la croissance des bactéries

En dehors de l'eau, des nutriments et des sources énergétiques, le milieu de croissance doit présenter des paramètres physiques adaptés aux caractéristiques des bactéries présentes.

2.1.2.1. Le pH

Il intervient dans l'activité métabolique et la perméabilité membranaire. Les bactéries maintiennent un pH interne relativement constant, mais elles tolèrent de larges variations de pH. De nombreuses bactéries se multiplient préférentiellement à un pH neutre (6,5 – 7,5). Les acidophiles préfèrent des pH inférieurs à 6, les basophiles ou alcalinophiles se développent de façon optimale à pH supérieur à 8.

Par conséquent, il sera possible d'enrichir un prélèvement en un type de bactérie recherché par utilisation d'un milieu à un pH déterminé (ex : pH = 9 pour *Vibrio cholerae*).

Le développement de micro-organismes dans un milieu de culture peut modifier fortement le pH. Il est donc nécessaire d'introduire des substances tampons pour limiter ces variations.

2.1.2.2. La pression osmotique du milieu

La pression osmotique est fonction de la concentration du soluté de part et d'autre d'une membrane. Les bactéries ont des systèmes de transport qui assurent des conditions osmotiques constantes à l'intérieur de la cellule. La plupart des bactéries ont une bonne tolérance aux variations de pression osmotique, en raison de la présence d'une paroi rigide et maintiennent une pression de turgescence, à l'exception des mycoplasmes (sans paroi). Certaines bactéries ne peuvent croître que dans des milieux à forte concentration de NaCl (supérieure à 0,2M), ce sont des halophiles. Il y en a qui sont non halophiles et qui se développent à des taux de NaCl inférieurs à 0,2M.

2.1.2.3. La température

Le domaine de température de croissance d'une bactérie est défini par les températures cardinales : température optimale, minimale et maximale.

Les bactéries mésophiles peuvent se développer entre 5 et 45°C (optimum 30 à 37°C).

Les bactéries thermophiles peuvent croître entre 25 et >55°C (optimum vers 50°C).

Les bactéries psychrophiles peuvent se développer entre environ -15°C et 20°C (optimum vers 5 – 10°C).

Les bactéries psychotropes quand à elles croissent à des températures comprises entre -5°C et 35°C (optimum souvent vers 20 – 25°C).

2.1.2.4. L'oxygène moléculaire

Certaines bactéries ont besoin d'oxygène libre pour leur métabolisme. Lors de leur métabolisme énergétique, la récupération de l'énergie par des chaînes de transport d'électrons est liée à un accepteur final d'électrons qui est l'oxygène moléculaire. C'est la respiration des bactéries aérobies strictes.

D'autres bactéries ne peuvent survivre qu'en présence d'oxygène libre : elles sont anaérobies strictes. D'autres par contre peuvent survivre en présence ou en absence d'oxygène libre : ce sont les anaérobies-aérobies facultatives.

2.2. Croissance bactérienne

2.2.1. Définition [1]

La croissance bactérienne se définit comme l'accroissement ordonné et coordonné de tous les constituants du micro-organisme unicellulaire, jusqu'à une dimension limite, qui normalement conduit à la division cellulaire par scission binaire. Il en résulte une augmentation du nombre d'individus et une augmentation de la masse cellulaire. Cette multiplication bactérienne conduit à la réplication du nucléoïde bactérien, suivi de la division cellulaire, résultant de l'allongement concomitant de la membrane cytoplasmique et de la paroi, avec formation d'un septum transversal qui partage les composants cytoplasmiques et sépare les deux nucléoïdes bactériens. Deux cellules filles identiques sont issues de la cellule mère.

2.2.2. La courbe et les phases de la croissance [19, 33]

Si un milieu liquide non renouvelé estensemencé avec des cellules bactériennes prélevées d'une culture déjà saturée et le nombre de cellules viables par millilitre déterminé régulièrement, une courbe du type de celle de la figure ci-dessous, est habituellement obtenue. La courbe peut être segmentée en 7 phases :

$\text{Log } N \text{ UFC/ml}$

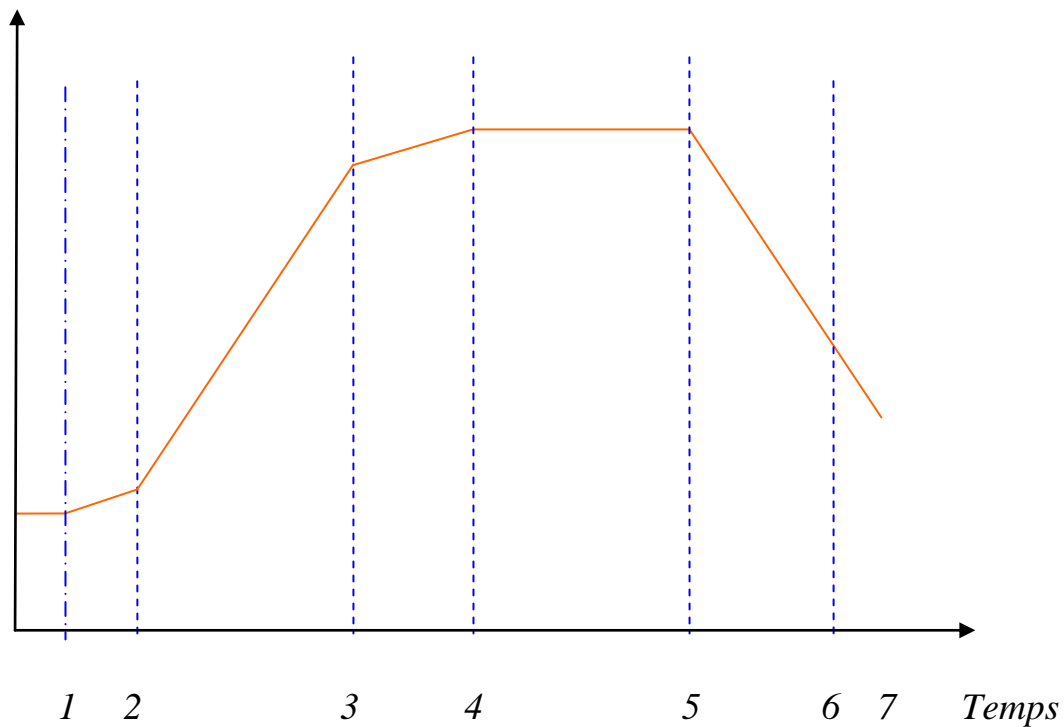


Figure 1 : Les 7 phases de la cinétique de croissance d'une population bactérienne d'après Buchanan (1919) [19].

➤ **La phase de latence (1) [33]**

Elle représente la période où les cellules ayant épuisé les métabolites et les enzymes de leur environnement initial, s'adaptent à leur nouvel environnement. Les enzymes et les intermédiaires sont formés et s'accumulent jusqu'à ce qu'ils soient présents à des concentrations permettant une reprise de la croissance.

Elle peut être supprimée en incubant le milieu avec des bactéries prélevées pendant la phase exponentielle de croissance.

➤ **La phase d'accélération (2) [33, 34]**

Au cours de laquelle, le taux de croissance s'accroît régulièrement.

➤ **La phase exponentielle (3) [21, 33, 34]**

Les cellules sont en équilibre. Le nouveau matériel de la cellule est synthétisé à un taux constant, mais ce matériel est également catalysé, et la masse augmente de façon exponentielle. Cela continue jusqu'à ce que l'un des deux phénomènes suivants se produisent : un ou plusieurs des nutriments s'épuisent dans le milieu, ou, que des produits métaboliques toxiques s'accumulent et inhibent la croissance. Le taux de croissance devient constant et atteint sa valeur maximale.

➤ **La phase de ralentissement (4) [18, 33, 34]**

Elle est liée à l'épuisement du facteur limitant. La valeur de μ diminue progressivement.

μ : taux de croissance

➤ **La phase stationnaire (5) [18, 33]**

Elle est liée à l'épuisement de l'aliment, à l'accumulation de produits toxiques ou à la constitution d'un équilibre ionique défavorable.

➤ **La phase de décroissance (6) [33, 34]**

Au cours de laquelle la masse bactérienne décroît et le taux de croissance prend des valeurs négatives. Cette phase de décroissance correspond à une mort et à une lyse progressive des bactéries en présence des déchets du métabolisme accumulés pendant la croissance.

➤ **La phase de mortalité logarithmique(7) [33]**

Durant cette phase le taux de mortalité par organisme reste constant.

2.2.3. Techniques de mesure de la croissance bactérienne [21, 34]

La croissance bactérienne peut être appréciée en estimant, en fonction du temps, les variations de la masse bactérienne ou, plus souvent, du nombre de cellules.

Des concentrations microbiennes peuvent être mesurées en termes de concentration en cellules (le nombre de cellules viables par unité de volume de culture). Ces deux paramètres ne sont pas toujours équivalents, parce que le poids sec moyen de la cellule change à différentes étapes de l'évolution d'une culture. Ils ne sont pas non plus d'importance égale.

Deux groupes de méthodes sont utilisés pour mesurer la croissance bactérienne :

- Les méthodes de numération ;
- Les méthodes quantitatives.

➤ **Méthode de numération [18, 21, 23, 34]**

Deux méthodes principales peuvent être utilisées :

- ✓ Numération totale : elle consiste à dénombrer au microscope ou avec des compteurs spéciaux les individus viables ou non.
Les cellules mortes ne peuvent pas être distinguées de celles en vie. Seules les suspensions denses peuvent être comprises (> 10 cellules par ml), mais des échantillons peuvent être concentrés par centrifugation ou filtration pour augmenter la sensibilité ;
- ✓ Numération des cellules viables : on compte les colonies bactériennes, inoculé par une aliquote d'une suspension bactérienne homogène et suffisamment diluée.

Sur un milieu approprié, chaque unité viable croit et forme une colonie. Chaque colonie pouvant être comptée s'appelle une unité formant colonies (UFC), et le nombre d'UFC est lié au nombre de bactéries viables dans le milieu. Cette méthode est plus facile et de très grande sensibilité, mais elle nécessite beaucoup de dilutions et de boîtes.

➤ **Méthodes quantitatives [18, 21, 23, 34]**

Plusieurs méthodes sont envisageables, parmi lesquelles :

- ✓ La mesure directe de la masse bactérienne : en principe, la biomasse peut être mesurée directement en déterminant le poids sec d'une culture microbienne. Les bactéries sont lavées, séchées et pesées. C'est une méthode longue qui nécessite une grande quantité de cellules pour que les pesées soient assez précises. Mais c'est la méthode de référence (1 mg de poids sec correspond à quelques milliards de corps bactériens).
- ✓ La mesure de l'activité enzymatique : mesure du pH, mesure de la consommation de l'oxygène, ces méthodes sont peu précises.
- ✓ Le dosage de l'azote bactérien : cette méthode a les mêmes applications que la méthode gravimétrique.
- ✓ La mesure de la densité optique : ici on admet que l'absorption lumineuse est proportionnelle à la masse des microbes. Elle est rapide et précise, mais sa sensibilité est modérée, car il faut une teneur d'au moins 10 bactéries/ml pour obtenir une densité optique mesurable. Elle est fortement entachée d'erreurs en cas de suspensions bactériennes non homogènes.

2.2.4. Conditions de croissance des entérobactéries étudiées [19, 31]

Elles se développent entre 20 et 40°C avec un optimum à 37°C.

Ces germes mésophiles et neutrophiles (pH optimum voisin de 5,5-8) sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs avec un métabolisme fermentatif.

VI. QUELQUES PARAMETRES ET PROCEDURES DE VALIDATION [19,27]

3.1. La validation

D'après la norme ISO 9000, la validation est la confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévues ont été satisfaites.

Le travail de validation doit remplir les exigences de l'accréditation pour une démarche de diagnostic microbiologique. Plus les conséquences d'un résultat sont importantes, plus l'effort pour en assurer la qualité doit être important.

La validation consiste donc à vérifier la performance de la méthode et sa conformité à des normes. Elle doit suivre un plan qui inclut la portée même de la démarche, ses caractéristiques et les limites de la validité.

La validation de méthode microbiologique revêt une importance toute particulière en microbiologie. En effet, elle s'impose d'autant plus qu'elle porte sur des méthodes dont la variabilité est très grande. Cette variabilité peut être attribuée principalement aux deux aspects suivants :

- La nature intrinsèque du microorganisme vivant qui possède une grande capacité de variation génétique et de mutation,
- Les principes de détection et de dénombrement de microorganismes par des techniques conventionnelles qui impliquent l'utilisation de substances biologiques variables en elles-mêmes, tels que les milieux de culture ou les réactifs biochimiques.

Dans le cadre des Microméthodes CSB Entérobactéries, la validation doit se faire à chaque étape, c'est-à-dire les appareils utilisés pour la collecte, la préparation et l'entreposage des échantillons.

3.2. Procédures et paramètres de validation

3.2.1. Procédures

Le procédé pour une méthode de validation doit démontrer qu'elle est prête à l'usage. Elle doit suivre un plan qui inclut de la méthode, ses caractéristiques et performances, et ses limites d'acceptation. Elle doit être générée par des conditions expérimentales et complétée par des données statistiques.

La validation de l'identification des souches passe par le calcul des probabilités. Des tables diagnostiques contiennent pour chaque espèce, la probabilité de positivité (f) aux différents tests. Si la réponse de la souche pour un test est positive, on retient la valeur f ; si elle est négative, on retient la valeur $1-f$ (probabilité de négativité).

Ainsi, on définit :

- La probabilité absolue qui est le produit des valeurs donnant la fréquence théorique de la souche.
- La probabilité relative ou la probabilité d'appartenance à l'espèce qui est le rapport de fréquence théorique sur la somme des fréquences théoriques pour chacune des souches soumises à la comparaison.

Probabilité absolue = $f \times (1 - f) \times \dots$
= produit des valeurs obtenues pour chaque espèce.

Probabilité relative =
$$\frac{\text{Probabilité absolue}}{\text{Somme des probabilités absolues}} \times 100$$

3.2.2. Paramètres

Les paramètres des méthodes de validation ont été définis dans différents groupes de travail des comités nationaux et internationaux, et sont décrits dans la littérature. Ceux qui se rattachent à la validation des algorithmes de diagnostic sont les suivants :

➤ **La répétabilité**

C'est la mesure de résultats au sein d'un même laboratoire lorsque la méthode est répétée par le même opérateur dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec le même matériel, les mêmes réactifs, et dans un court intervalle de temps.

➤ **La reproductibilité**

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes, généralement dans les laboratoires différents, à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser contrairement à la répétabilité.

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAIL PERSONNEL

III. CADRE D'ETUDE

Ce travail a été effectué à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec, et au Laboratoire de Bactériologie-Virologie Fondamentale et Appliquée de l'UCAD II, entre Octobre 2008 et Juin 2009.

IV. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels et réactifs

2.1.1. Matériels

2.1.1.1. Souches bactériennes

Nous avons utilisé des souches de référence et de contrôle déjà identifiées et conservées à -20°C :

- la souche de référence de *Escherichia coli* : *E. coli* ATCC 25922
- des souches de contrôle dont :
 - Une souche de *Klebsiella pneumoniae*
 - Une souche de *Salmonella paratyphi* A.

2.1.1.2. Matériel pour l'identification

- Autoclave
- Balance de précision
- Bain marie
- Epprouvettes
- Erlenmeyer
- Filtres millipores
- Flacon en verre avec bouchon rodé
- Tubes à essai stériles
- Bec bunsen
- Etuve
- Four à micro-ondes

- Agitateur magnétique
- Dessiccateur sous vide à air renouvelé
- Microscope optique
- Micropipettes
- Embouts stériles
- Plateau (inoxydable de préférence)
- Anse de platine
- Bêcher rempli d'eau de javel
- Emballage en plastique
- Lames porte-objet
- Lamelles
- Papier buvard
- Microplaques.

2.1.1.3. Matériel pour la conservation des souches

- Tubes nunc
- Tubes stériles à vis
- Cryotubes avec billes
- Portoirs
- Anse de platine.

2.1.1.4. Matériel pour l'enrichissement et l'isolement

- Bec bunsen
- Autoclave
- Anse de platine
- Boite de pétri
- Etuve.

2.1.2. Réactifs

2.1.2.1. Réactifs pour l'enrichissement et l'isolement

- Bouillon au thioglycolate (BT)
- Bouillon trypticase soja (BTS)
- Gélose Müller Hinton (MH)
- Gélose Mac conkey.

2.1.2.2. Réactifs pour l'identification

- Acétate de plomb
- Alcool 95°C
- Bleu de bromothymol
- Bromocresol
- Citrate de fer ammoniacal
- Citrate trisodique
- Disque ONPG
- Extrait de levure
- Extrait de viande
- Glucides : glucose, lactose, mannitol, sorbitol, saccharose, inositol, rhamnose
- Gélatine
- Bouillon nutritif
- L-tryptophane, L-arginine, L-phenyl alanine, L-lysine, ornithine
- NaCl
- NaOH
- Peptone triptyque.

2.1.2.3. Réactifs de révélation

- Acide sulfanilique à 8g/l
- Acide alpha naphthylamine à 5g/l
- Alpha naphthol
- FeCl₃
- KOH
- Lugol
- Fuschine phéniquée
- Alcool 95°C
- Eau distillée



Figure 2 : Matériels et milieux nécessaires au dénombrement sur boîtes de Pétri.

2.2. Contrôle de qualité des tests effectués

Chaque lot de milieu préparé est soumis à un contrôle de stérilité et un contrôle d'efficacité sur le plan bactériologique.

2.2.1. Contrôle de stérilité des milieux d'enrichissement et d'isolement

➤ Milieux liquides

Un millilitre de chaque milieu préparé est mis dans un tube à hémolyse stérile qui est incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les milieux sont considérés stériles en l'absence de trouble et de virage de l'indicateur coloré.

➤ Milieux solides

Chaque boîte contenant de la gélose préparée est placée à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les milieux sont considérés stériles en l'absence d'apparition de colonies ou de virage de l'indicateur coloré.

2.2.2. Contrôle de qualité des galeries d'identification déshydratées

100 µl de milieu sont distribués dans chaque puits. La déshydratation se fait en présence d'un dessiccateur ou dans un four à micro-ondes.

2.2.2.1. Contrôle de stérilité

La stérilité a été mise en évidence par l'absence de souillures des milieux préalablement déshydratés.

Pour les entérobactéries, les cupules renfermant des milieux allant de ADH à URE ont été inoculés avec de l'eau physiologique stérile et ceux de GLU à XYL avec le MEVAG Entérobactéries.

Pour les bacilles à Gram négatif non fermentaires, les cupules renfermant les substrats de ADH à URE ont été inoculés avec de l'eau physiologique et ceux allant de GLU à XYL avec le MEVAG Entérobactéries. Après 24 à 48 heures d'incubation et après révélation de certains tests, le lot est considéré stérile en l'absence de virage de l'indicateur et de réaction positive pour les tests révélés.

Tableau II : Plan de contrôle de stérilité des microplaques CSB Entérobactéries

ADH	ONPG	CC	CS
Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique	Eau
Stérile	Stérile	Stérile	physiologique Stérile
VP	GEL	H2S / IND	MAL / PDA
Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique	Eau
Stérile	Stérile	Stérile	physiologique Stérile
LDC	ODC	URE	GLU
Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique	MEVAG
Stérile	Stérile	Stérile	
LAC	MAN	SOR	XYL
MEVAG	MEVAG	MEVAG	MEVAG

2.2.2.2. Contrôle d'efficacité

Ce contrôle a été réalisé avec des souches de référence et de contrôle dont le profil biochimique présente une stabilité bien connue.

Ainsi le milieu considéré stérile a pu faire l'objet d'une étude en ce qui concerne sa capacité à donner un résultat positif avec une souche dont le caractère correspondant est positif et à donner un résultat négatif si ce caractère est négatif pour une autre souche donnée.

➤ **Technique**

Deux plaques sont prévues pour chaque galerie (contrôles positifs et négatifs).

Une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture de 24 heures sur milieu solide.

Tableau III : Contrôle d'efficacité des substrats des microplaques CSB entérobactéries.

Substrats	Témoins positifs	Témoins négatifs
LDC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i>
ODC	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella</i>
ADH	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>
UREE	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
VP	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
GEL	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
CS	<i>Klebsiella</i>	<i>Escherichia coli</i>
CC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
H2S	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>
IND	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MAL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
PDA	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>
ONPG	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
LAC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
GLU	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
MAN	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SOR	<i>Escherichia coli</i>	<i>shigella flexneri</i>
XYL	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

2.2.2.3. Contrôle des appareils

➤ **L'étuve**

La température était toujours à 37°C.

➤ **Le densitomètre**

Avant toute mesure, l'appareil était étalonné avec de l'eau distillée.

2.2.2.4. Contrôle des paramètres dynamiques

La température, paramètre très sélectif, a été maintenue à 37°C. Celle-ci a été favorable à la croissance des bactéries utilisées lors de notre étude.

Le pH toléré par les bactéries se situe entre 6 et 9, donc avant chaque manipulation nous avons effectué un ajustement du pH de tous les milieux liquides utilisés. Nous avons pu avoir une bonne identification de nos bactéries en utilisant les galeries Micro-CSB.

Les bactéries ont une certaine tolérance vis-à-vis des variations ioniques, en effet notre étude n'a pas été influencée par leur présence.

2.3. Méthodes

Comme nous avons travaillé sur des souches déjà identifiées et conservées, nous avons procédé à l'isolement et à une identification sommaire des bactéries.

2.3.1. Identification des souches de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Salmonella paratyphi A*.

En vue d'obtenir des colonies isolées, nous avons régénéré les souches dans un bouillon d'enrichissement, puis ensemencé une gélose CLED.

L'incubation a été faite à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

❖ Examen macroscopique

Les souches de *E. coli* ont donné de grosses colonies sèches, lactose positif et à contours irréguliers.

Les souches de *K. pneumoniae* ont donné de grosses colonies muqueuses, lactose positif, ayant un aspect de goutte de miel avec une tendance à la confluence.

Les souches de *Salmonella paratyphi A* ont donné des colonies lisses à bords réguliers.

❖ Examen microscopique

A partir d'une colonie, nous avons confectionné un frottis que nous avons ensuite coloré au Gram.

L'examen microscopique à l'objectif à immersion (X100) montrait des bacilles ou diplobacilles à Gram négatif colorés en rose.

❖ La réaction à l'oxydase

✓ Principe

Cette réaction a été recherchée sur des cultures en milieux gélosés exempts de sucres ou de sang. Les bactéries possédant des oxydases donnent en présence de sucre, des métabolites qui avec le réactif utilisé peut donner une coloration

variable selon la bactérie.

✓ **Technique**

Le test a été réalisé à l'aide d'un disque de commerce prêt à l'emploi, imprégné d'eau distillée sur lequel a été déposée une colonie.

✓ **Lecture**

Oxydase positive : apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée.

Oxydase négative : l'aspect reste inchangé.

✓ **Résultat**

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, et *Salmonella paratyphi A* sont oxydase négative.

❖ **Mini galerie d'identification**

➤ **Milieu mannitol-mobilité**

C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des germes.

La bactérie est ensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une anse de platine.

✓ **Résultat**

La fermentation du mannitol est matérialisée par un virage du milieu du rouge au jaune ; les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble du milieu.

E. coli, *K. pneumoniae* et *S. paratyphi A* fermentent le mannitol.

E. coli et *S. paratyphi A* sont mobiles ; alors que *K. pneumoniae* est immobile.

➤ **Milieu Kliger Hajna**

C'est un milieu solide en deux parties : une pente et un culot, contenant du thiosulfate, des ions ferreux, de la lysine, du glucose, du lactose et également des éléments nutritifs permettant la multiplication et la croissance des bactéries.

Sur ce milieu on recherche les caractères suivants :

- La fermentation du lactose par un virage de la pente du rouge au jaune,
- La fermentation du glucose : virage du culot du rouge au jaune,
- La production de gaz (présence de bulles dans le milieu),
- La production d'hydrogène sulfuré (coloration noire du milieu),

✓ **Résultat**

- *E. coli* est glucose +, lactose +, gaz +, H₂S - .
- *K. pneumoniae* glucose +, lactose -, gaz +, H₂S +.
- *S. paratyphi A* glucose +, lactose +, gaz -, H₂S -.

➤ **Milieu du citrate de Simmons**

Ce milieu est coulé en pente et permet d'étudier l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes.

Il contient un indicateur de pH : le bleu de bromothymol, ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide.

Les germes qui utilisent le citrate comme seule source de carbone entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.

✓ **Résultat**

E. coli et *S. paratyphi A* sont Citrate négatif ; *K. pneumoniae* est Citrate positif.

➤ **Le milieu Urée-Indole**

C'est un milieu liquide dans lequel on recherche trois caractères :

- la production d'uréase qui se matérialise par le changement de la coloration jaune en rose, du fait de l'alcalinisation du milieu ;
- la présence d'indole qui se matérialise par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs ;
- la présence de TDA qui se matérialise par un changement de la coloration du jaune au rouge, après addition de perchlorure de fer (FeCl_3).

2.3.2. Recherche de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification des entérobactéries par les galeries Micro-CSB

Nous avons testé différents inocula des espèces étudiées (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. paratyphi A*) sur les galeries micro-CSB Entérobactéries, et déterminé la concentration bactérienne qui donne le maximum de caractères concordants en un temps aussi court que possible (< 24h). Pour ce faire :

- Les différents inocula de chaque espèce ont été obtenus après incubation d'un inoculum de départ, et dénombrement bactérien sur boîte de Pétri pour en déterminer la concentration (en UFC/mL) à différents intervalles de temps.
- Pour chaque inoculum, les galeriesensemencées ont été lues après 4h, 8h, 12h et 24h d'incubation.

2.3.2.1. Préparation de l'inoculum de départ

Après identification des bactéries, nous avons prélevé une colonie isolée sur le milieu CLED, et l'avonsensemencé dans 10ml de bouillon thioglycolate.

Après homogénéisation, la suspension obtenue a été considérée comme un échantillon de volume $V_0=10\text{ml}$ et de concentration C_0 à l'instant T_0 .

Le bouillon de culture est immédiatement mis à l'étuve.

2.3.2.2. Incubation et prélèvements

A partir de ce moment, 6 prélèvements successifs de l'inoculum de départ ont été effectués à différents intervalles de temps (de T1 à T6) :

- Pour E. coli, nous avons effectué le premier prélèvement à T1 = 30 min, et les 5 autres à des intervalles de 20min (suivant le temps de génération du germe).
- Pour les deux autres espèces, tous les prélèvements du bouillon ont été effectués toutes les 30 min.
- Les deux premiers prélèvements (à T1 et T2) n'ont servi qu'au dénombrement bactérien, car nous avons estimé qu'à ces intervalles de temps, l'inoculum est beaucoup trop faible pour donner des réactions positives sur la galerie. Aussi, n'avons-nous prélevé qu'un faible volume : 100 μ L de bouillon.
- Pour les 4 intervalles de temps restants, nous avons prélevé 1,5ml, dont 100 μ L ont été utilisés pour le dénombrement bactérien, et le reste pour l'ensemencement des galeries.

2.3.2.3. Dénombrement bactérien sur boîte de pétri

C'est une technique de mesure de la croissance bactérienne que nous avons utilisée pour obtenir des concentrations bactériennes croissantes (inocula), sans poursuivre jusqu'au tracé des courbes de croissance.

➤ Principe

Le dénombrement bactérien sur boîtes de pétri consiste à ensemer à des intervalles de temps réguliers des boites de pétri par des dilutions appropriées d'un échantillon de la suspension bactérienne : la dilution est calculée pour obtenir entre 30 et 300 colonies sur chaque boîte, ces deux bornes étant considérées comme donnant le moins d'erreurs sur le dénombrement final.

Cette étape est suivie d'une culture de 20 à 48h à 37°C au terme de laquelle les

colonies sont dénombrées.

Il utilise l'UFC pour unité formant colonie qui considère que chaque colonie identifiée correspond à une bactérie.

➤ **Technique**

- Les 100 μL de suspension prélevés à chaque intervalle de temps ont été dilués au $1/10^{\text{ème}}$ avec 900 μL d'eau physiologique.
- 100 microlitres de la dilution ont été déposés sur une gélose MH, puis dispersés grâce à un étaleur stérile. Pour minimiser les erreurs de dénombrement, nous avons ensemencé à chaque fois deux boîtes de MH.
- Les boîtes ont été ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h.
- Après incubation nous avons dénombré les colonies viables obtenues au niveau des deux boîtes.
- Le nombre de colonies est obtenu en faisant la moyenne du dénombrement des deux boîtes de pétri multipliée par 10 (facteur de dilution).

➤ **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en UFC/ml, et correspondent aux différents inocula.

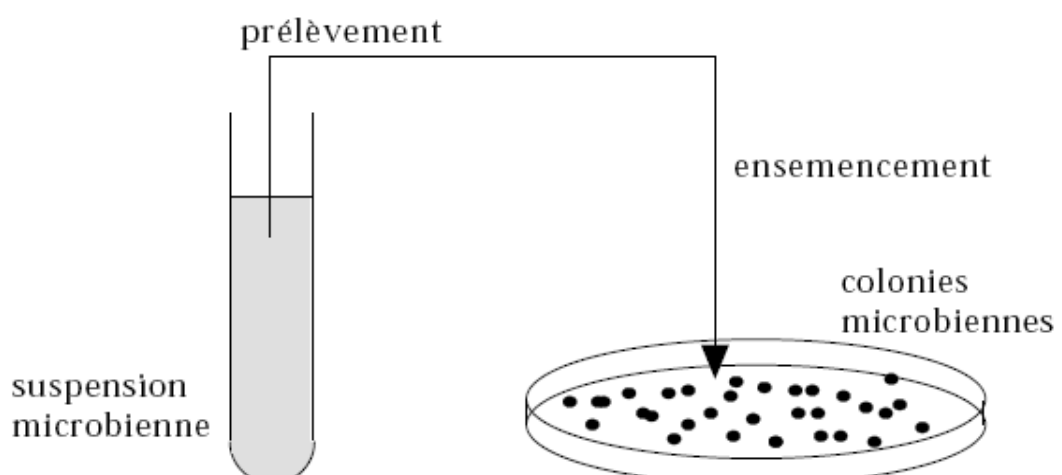


Figure 3 : Technique de dénombrement sur boîte de Pétri.

2.3.2.4. Ensemencement des galeries Micro-CSB

➤ **Principe**

Il s'agit d'une méthode miniaturisée permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation des sucres et de la croissance en milieu hostile. Les galeries Micro- CSB Entérobactéries permettent de réaliser respectivement 16 tests biochimiques et de faire le diagnostic d'espèce de la plupart des entérobactéries ainsi que des bacilles à Gram négatifs non fermentaires.

➤ **Technique**

Les inocula qui ont été obtenus aux différents intervalles de temps ont ensuite été distribués dans les galeries selon le protocole des galeries Micro-CSB entérobactéries.

➤ **Ensemencement**

distribuer 100µl d'inoculum bactérien par micro cupule d'ADH à URE,

- mélanger 100µl de la suspension bactérienne à 1 ml de MEVAG Entérobactéries,
- ensemercer les cupules de GLU à XYL avec 100µ de MEVAG ainsi inoculé,
- recouvrir les puits destinés à la recherche des décarboxylases, d'ADH, d'uréase et des sucres avec 2 gouttes de paraffine afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire à ces réactions,
- incuber les galeries à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau,
- *faire la lecture toutes les 4 heures pendant 12 heures, puis à 24h,*
- noter toutes les modifications observées lors de ces lectures.

➤ **Lecture et expression des résultats**

La lecture a reposé sur le changement de la coloration initiale des différents milieux. Pour la plupart des milieux, la lecture a été faite directement, alors pour d'autres elle a nécessité l'addition de réactifs de révélation.

La lecture des caractères été faite sur une fiche de lecture (cf. tableaux V et VI).

Tableau IV : Tableau de lecture des entérobactéries

Tests	Substrats	Réactions / Enzymes	Réactifs de révélation	Résultats positifs	Résultats négatifs
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase		Rouge	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rouge	Jaune
ADH	Arginine	Arginine décarboxylase		Rouge	Jaune
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orange
VP	Glucose pyruvate	Production d'acétoïne	VP1+ VP3	Rose rouge	Incolore
GEL	Gélatine	Gélatine		Diffusion du charbon	Inchangé
CS	Citrate de simmons	Utilisation du citrate		Bleu	Vert
CC	Citrate de chistensen	Utilisation du citrate		Rose	Jaune claire
H ₂ S	Sulfate Sodium	Production d'H ₂ S		Noir	Incolore
IND	Tryptophane	Tryptophane	1 goutte de kovacs	Anneau rouge	Anneau incolore
MAL	Malonate Sodium	Utilisation du malonate		Bleu	Jaune vert
PDA	Phénylalanine	Phénylamine désaminase	1 goutte de perchlorure	Vert	Jaune
ONPG	ONPG	β-galactosidase		Jaune	Incolore
GLU	Glucose	Fermentation		Jaune	Bleu
ARA	Arabinose				

2.3.3. Exploitation des résultats

Cette partie de notre travail a nécessité l'intervention de partenaires mathématiciens de l'Université de Saint-Louis ; ces derniers ont procédé à l'exploitation des résultats du dénombrement et des galeries grâce au programme **R**, afin de déterminer mathématiquement non seulement le temps d'incubation minimum et l'inoculum qui permet l'identification avec ce temps d'incubation, mais également les caractères discriminatoires des différentes espèces.

2.3.4. Validation des résultats

Cette validation a consisté en une vérification expérimentale des résultats mathématiques obtenus (avec le programme **R**).

Elle est basée sur les tests de reproductibilité et de répétabilité, et sur le calcul des probabilités d'appartenance des espèces étudiées.

2.3.4.1. Test de reproductibilité

➤ Principe

Il consiste à effectuer le test d'identification Micro CSB des souches étudiées, en vérifiant que les caractères de discrimination retenus permettent effectivement de *bien identifier* les différentes espèces pour *chaque lot de milieux préparés*.

➤ Technique

Nous avons préparé trois lots de galeries d'identification Micro-CSB entérobactéries

Nous avons préparé un inoculum pour chaque souche.

Nous avons effectué le test d'identification pour chaque souche avec les trois lots de galeries Micro-CSB.

➤ **Résultats**

- Ces souches doivent présenter le même profil biochimique lors de l'identification Micro-CSB pour les trois lots de milieux.
- Les principaux caractères de discrimination retenus doivent être suffisamment distincts pour une bonne identification de chaque espèce.

2.3.4.2. Test de répétabilité

➤ **Principe**

Il consiste à effectuer le test d'identification des mêmes souches, sur un même lot de galeries, **3** fois de suite, dans les mêmes conditions.

➤ **Technique**

Pour chaque souche, nous avons préparé l'inoculum à partir des colonies prélevées sur MH.

Nous avons effectué le test d'identification Micro-CSB avec 3 galeries du même lot.

➤ **Interprétation et résultats**

Chaque souche doit présenter le même profil biochimique autant de fois que le test est effectué, et être bien distincte des autres espèces à partir des caractères discriminatoires.

Si la faisabilité de la microméthode d'identification est possible dans les mêmes conditions, il est donc répétable.

III. EXPLOITATION DES RESULTATS

3.1. Résultats des galeries d'identification en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation

3.1.1. Escherichia coli

3.1.1.1. Résultats du dénombrement

Tableau V : Dénombrement de *Escherichia coli*

Temps (min)	T ₀ = 0	T ₁ = 30	T ₂ = 50	T ₃ = 70	T ₄ = 90	T ₅ = 110	T ₆ = 130
Inoculum (UFC/ml)	6,3 10 ⁵	7,5 10 ⁵	5,5 10 ⁶	6,85 10 ⁶	7,65 10 ⁶	1,75 10 ⁷	1,4 10 ⁸

Les concentrations croissantes observées témoignent d'une bonne croissance (quoique lente au début : temps de latence) de la bactérie pendant toute la durée de la manipulation (2h 10min). Ceci nous a permis d'obtenir des concentrations bactériennes significatives.

3.1.1.2. Résultats des galeries Micro-CSB

Les deux premiers inocula correspondant respectivement aux temps T₀ = 0min et à T₁ = 30min n'ont pas été utilisés pour l'ensemencement des plaques du fait de leur faible concentration. Les résultats obtenus ont été inscrits dans les tableaux suivants :

Tableau VI : Profil biochimique de *E. coli* en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques.

Inocula (UFC/ml)	5,5 10 ⁶				6,85 10 ⁶				7,65 10 ⁶				Caractères d'identification de <i>E.coli</i> [4,14, 23]
	4	8	12	24	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures													
Tests biochimiques													
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ONPG	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	+	i	i	i	+	i	i	i	+	+
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ODC	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
MAN	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
SOR	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	d
XYL	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d

Tableau VI (suite)

Inocula (UFC/ml)	1,75 10 ⁷				1,4 10 ⁸				Caractères d'identification de <i>E. coli</i> [4,14, 23]
	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures									
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ONPG	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	i	i	i	-	i	i	i	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	+	i	i	i	+	+
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ODC	-	+	+	+	-	+	+	+	d
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	-	+	+	+	-	+	+	+	+
SOR	-	-	+	+	-	-	+	+	d
XYL	-	+	+	+	-	+	+	+	d

Légende : (+) = caractère positif,
 (-) = caractère négatif,
 (d) = caractère variable
 (i) = caractère indéterminé.

3.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

3.1.2.1. Résultats du dénombrement

Le tableau ci-dessous montre les résultats du dénombrement de *Klebsiella pneumoniae*.

Tableau VII : Dénombrement de *Klebsiella pneumoniae*

Temps (min)	T ₀ = 0	T ₁ = 30	T ₂ = 60	T ₃ = 90	T ₄ = 120	T ₅ = 150	T ₆ = 180
Inoculum (UFC/ml)	2,32 10 ⁶	7,45 10 ⁶	2 10 ⁷	1,35 10 ⁸	1,5 10 ⁸	3,45 10 ⁸	1,75 10 ⁹

Le bouillon de culture a été incubé pendant 3h de temps, et les prélèvements effectués à des intervalles de 30 minutes. Cette souche a présenté une croissance assez significative, ce qui nous a donné des inocula consistants.

Tableau VIII (suite)

Inocula (UFC/ml)	3,45 10 ⁸				1,75 10 ⁹				Caractères d'identification de <i>K. pneumoniae</i> [4,14, 23]
Temps d'incubation en heures	4	8	12	24	4	8	12	24	
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	+	-	-	-	+	-
ONPG	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CC	-	+	+	+	-	+	+	+	+
CS	-	-	+	+	-	-	+	+	+
VP	i	i	i	+	i	i	i	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	-	i	i	i	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ODC	-	-	+	+	-	-	+	+	-
URE	-	-	+	+	-	-	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	-	+	-	-	-	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	d
XYL	+	+	+	+	+	+	+	+	d

Légende : idem *E. coli*.

3.1.3. *Salmonella paratyphi A*

3.1.3.1. Résultats du dénombrement

Le tableau ci-dessous montre les résultats du dénombrement de *Salmonella paratyphi A*.

Tableau IX : Dénombrement de *Salmonella paratyphi A*

Temps (min)	T ₀ = 0	T ₁ = 30	T ₂ = 60	T ₃ = 90	T ₄ = 120	T ₅ = 150	T ₆ = 180
Inoculum (UFC/ml)	3,5 10 ⁵	4 10 ⁵	4 10 ⁵	1,2 10 ⁶	1,42 10 ⁶	3,5 10 ⁶	1,2 10 ⁷

Contrairement aux espèces précédentes, la croissance de la souche de salmonelle a été assez lente. La concentration la plus élevée est < 10⁸ UFC/ml.

3.1.3.2. Résultats des plaques Micro-CSB

Tableau X : Profil biochimique de *Salmonella paratyphi A* en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation.

Inocula (UFC/ml)	4 10 ⁵				1,2 10 ⁶				1,42 10 ⁶				Caractères d'identification de <i>S. paratyphi</i> A [4,14, 23]
	4	8	12	24	4	8	12	24	4	8	12	24	
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
IND	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
LAC	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	d
XYL	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	d

Tableau X (suite)

Inocula (UFC/ml)	3,5 10 ⁶				1,2 10 ⁷				Caractères d'identification de <i>S. paratyphi</i> A [22, 11, 17]
	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures									
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	i	i	i	-	i	i	i	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	d
IND	i	i	i	-	i	i	i	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ODC	-	+	+	+	-	+	+	+	d
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	-	+	+	+	-	+	+	d
XYL	+	-	+	+	+	-	+	+	d

Légende : idem *E. coli*.

3.2. Détermination du temps d'incubation et de l'inoculum correspondant

Elle repose sur l'analyse des profils biochimiques obtenus pour les différentes espèces étudiées.

Nous avons deux niveaux d'analyse :

- Une analyse intraspécifique, avec l'étude du profil de chaque espèce, afin de déduire les caractères d'identification qui varient significativement en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation.
- Une analyse interspécifique, consistant à étudier ces mêmes profils biochimiques, mais pour les différentes espèces, et ce, dans le but de déterminer les caractères d'identification qui varient de façon précoce, ainsi que l'inoculum qui induit cette variation.

3.2.1 Analyse intraspécifique

❖ Cas de *Escherichia coli* (voir tableau VI)

On considère le profil biochimique obtenu pour chaque inoculum en fonction des 4 temps d'incubation : $t_1 = 4$ h, $t_2 = 8$ h, $t_3 = 12$ h, et $t_4 = 24$ h.

➤ Les enzymes et les produits du métabolisme

- Les tests pour la production d'hydrogène sulfuré(*SH₂*), la recherche d'uréase(*UREE*), des décarboxylases (*ADH*, *LDC*,) et l'utilisation du citrate (*CS et CC*), du malonate (*MAL*) de même que l'hydrolyse de la gélatine (*GEL*) sont *tous négatifs* quels que soient le temps d'incubation et l'inoculum considéré.
- Pour tous les inocula, le test à l'*ONPG* hydrolase *n'est positif qu'à $t = 24$ h*.

- La production d'acétoïne (**VP**), les désaminases oxydatives (**PDA**) et la production d'indole (**IND**) ne sont déterminées qu'à $t = 24h$ (nécessitent des réactifs de révélation). *VP et PDA sont négatifs, et IND positif.*

➤ **La fermentation des sucres**

- Quelque soit l'inoculum considéré, la fermentation du mannitol (**MAN**) est *négative* à $t = 4h$ et est *positive* à $t = 8h, 12h, et 24h$.
- La fermentation du glucose (**GLU**) est *positive*, sauf à $t = 4h$ pour les 2 premiers inocula.
- La fermentation du lactose (**LAC**) : elle est *négative* à $t = 4h$ pour tous les inocula sauf le dernier ($1.4 \cdot 10^8$ UFC/ml), et *positive* pour les autres temps d'incubation quelque soit l'inoculum.
- La fermentation du xylose (**XYL**) : pour le premier inoculum ($5.5 \cdot 10^6$ UFC/ml : le moins concentré), elle est *négative* à $t = 4h, et t = 8h$, alors que pour les autres inocula (plus concentrés), elle n'est *négative qu'à $t = 4h$* .
- La fermentation du sorbitol (**SOR**) : elle est *positive uniquement* à $t = 24h$ pour les 2 premiers inocula (ce sont les suspensions bactériennes les moins concentrées), et à *partir de $t = 12h$ pour les autres inocula* (à partir de l'inoculum $7.65 \cdot 10^6$ UFC/ml).

Conclusion : il semble que les variations intéressantes sont observées au niveau des caractères ONPG, VP, IND, ODC et PDA, et des sucres : GLU, LAC, SOR, MAN et XYL.

❖ **Cas de *Klebsiella pneumoniae* (voir tableau VIII)**

➤ **Les enzymes et les produits du métabolisme**

- La production d'acétoïne (*VP*), les désaminases oxydatives (*PDA*) et la production d'indole (*IND*) ne sont déterminées qu'à $t = 24h$ (nécessitent des réactifs de révélation). *IND* et *PDA* sont *négatifs*, et *VP* *positif*.
- Les tests à l'*ADH* et à l'*ONPG* hydrolase ne sont positifs qu'à $t = 24h$.
- Les tests pour la production d'hydrogène sulfuré(*SH₂*), l'utilisation du malonate (*MAL*) de même que l'hydrolyse de la gélatine (*GEL*) sont *tous négatifs* quels que soient le temps d'incubation et l'inoculum considéré.
- L'utilisation du Citrate de Christeen (*CC*) est *positif à partir de $t = 12h$* pour les deux premiers inocula, et *à partir de $t = 8h$* pour les 3 inocula les plus élevés.
- L'utilisation du Citrate de Simmons (*CS*) *n'est positif qu'à partir de 12h* pour tous les inocula sauf pour l'inoculum $1.5 \cdot 10^8 \text{ UFC/ml}$ qui est positive à partir de $t = 8h$.
- Les tests à l'*ODC* et à l'*UREE* : sont *positifs uniquement à $t = 24h$ pour les 3 premiers inocula* (ce sont les suspensions bactériennes les moins concentrées), et *à partir de $t = 12h$ pour les 2 autres inocula*.

➤ **La fermentation des sucres**

- La fermentation du glucose(*GLU*), du mannitol (*MAN*), du sorbitol(*SOR*), et du xylose est *positive* quelque soit le *temps d'incubation et l'inoculum considéré*.
- La fermentation du lactose n'est positive qu'à $t = 24h$ pour tous les inocula à l'exception de l'inoculum $1.5 \cdot 10^8 \text{ UFC/ml}$ qui est positive à *partir de $t = 12h$* .

Conclusion : Les variations les plus intéressantes sont observées avec l'*ODC*, l'*UREE*, le *CC*, le *CS*, et *les* sucres.

❖ **Cas *Salmonella paratyphi* A (voir tableau X)**

➤ **Les enzymes et les produits du métabolisme**

- Les tests pour la production d'hydrogène sulfuré(*SH₂*), la recherche d'uréase(*UREE*), des décarboxylases (*ADH*, *LDC*,) et l'utilisation du citrate (*CS et CC*), du malonate (*MAL*) de même que l'hydrolyse de la gélatine (*GEL*), le test à l'*ONPG* hydrolase sont *tous négatifs* quels que soient le temps d'incubation et l'inoculum considéré.
- Pour tous les inocula, le test à l'*ONPG* hydrolase *n'est positif qu'à t = 24h*.
- La production d'acétoïne (*VP*), les désaminases oxydatives (*PDA*) et (*IND*) ne sont déterminés qu'à t = 24h (nécessitent des réactifs de révélation), pour les 3 premiers inocula et sont négatif. Pour les 2 autres inocula (les plus concentrés) *VP*, *IND* et *PDA* sont *négatifs* quelque soit le temps d'incubation.
- Le test à l'*ODC* *négatif* à t = 4h et positif pour les autres temps d'incubation quelque soit l'inoculum considéré.

➤ **La fermentation des sucres**

- La fermentation du mannitol est positive quelque soit le temps d'incubation et l'inoculum considéré.
- La fermentation du sorbitol est négative à t = 8h quelque soit l'inoculum et le temps d'incubation.
- La fermentation du xylose est négative à t = 8h quelque soit l'inoculum et le temps d'incubation de même qu'à t = 4h pour l'inoculum $1.2 \cdot 10^6$ UFC/ml.
- Pour la fermentation du lactose : elle est négative à t = 24h pour les deux premiers inocula, négative à partir de 12h pour l'inoculum $1.42 \cdot 10^6$, et positive à t = 4h (pour les derniers inocula les plus concentrés).

- La fermentation du glucose n'est positive qu'à partir de 12h pour les trois premiers inocula, et positive pour les deux derniers quelque soit le temps sauf à $t = 4h$ pour l'inoculum 3.510^6 .

Conclusion : Les variations les plus intéressantes ne sont observées qu'avec les sucres.

3.2.2. Analyse interspécifique

On recherche les caractères qui permettent une bonne discrimination entre *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. paratyphi A.*, en moins de 24h.

Deux méthodes d'analyse ont été utilisées :

- la première, purement mathématique, a été réalisée par nos partenaires de l'Université de Saint-Louis. Il s'agit de l'analyse des profils biochimiques de chaque espèce par le programme **R**.
- la deuxième, est une confirmation des conclusions fournies par le programme **R**, et consiste en une analyse directe des différents profils (méthode d'analyse comparable à l'analyse intraspécifique).

3.2.2.1. Première méthode [32]

L'analyse des données par le programme **R** montre qu'on peut bien identifier les 3 espèces d'entérobactéries,

- dès le temps d'incubation $t = 4h$,
- à l'aide des **5 sucres** que comporte la galerie Micro-CSB Entérobactéries,
- avec des inocula de taille 10^7 , et ceci de façon répétable et reproductible.

3.2.2.2. Deuxième méthode

On observe la variabilité des caractères en fonction des inocula et des temps d'incubation, et on procède par élimination. Ainsi,

- Si on élimine les résultats au temps $t = 24h$, les 8 caractères ADH, ONPG, VP, GEL, H₂S, IND, MAL, PDA ne varient pas pour les 3 espèces.

- Si on élimine ensuite les résultats au temps $t = 12\text{h}$, les 2 caractères UREE et LDC sont invariables pour les 3 espèces.
- Si l'on supprime enfin les données du temps $t = 8\text{h}$, les 3 caractères CC, CS, ODC sont équivalents pour les 3 espèces.
- A $t = 4\text{h}$, il reste les 5 sucres GLU, LAC, SOR, MAN, XYL qui, de part leurs variabilité entre espèces, discriminent de façon exacte les 3 entérobactéries.

On aboutit ainsi au même résultat qu'avec le programme R.

3.3. Validation des résultats de l'analyse interspécifique

Il s'agissait de valider les conclusions de notre analyse interspécifique : Inoculum 10^7 , temps d'incubation de la galerie : **4h**, et caractères discriminatoires précoces : les **sucres**.

Mais l'inoculum étant un facteur aléatoire pour toute méthode d'identification, nous avons effectué la validation pour 2 inocula : 10^7 UFC/ml et l'inoculum immédiatement supérieur : 10^8 UFC/ml, bien que ce dernier n'ait pas été atteint pour *S. paratyphi A* lors du dénombrement.

3.3.1. Résultats des tests de répétabilité et reproductibilité

3.3.1.1. Répétabilité

Tableau XI : Résultats des tests de répétabilité avec un inoculum de 10^7

Espèces	<i>E.coli</i>			<i>K.pneumoniaes</i>			<i>S.paratyphi A</i>		
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
Substrats									
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	+	+	+	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	-	+	-	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+	+	+	-	+
MAN	+	+	+	-	-	-	+	+	+
SOR	+	-	+	-	-	+	+	+	+
XYL	+	+	+	+	+	+	+	-	+

+ = positif ; - = négatif

3.3.1.2. Reproductibilité

Tableau XIII : Résultats des tests de reproductibilité avec un inoculum de 10^7

Espèces	<i>E.coli</i>			<i>K.pneumoniae</i>			<i>S.paratyphi A</i>		
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	+	+	+	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	-	-	-	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+	+	+	-	+
MAN	+	-	+	-	+	-	+	+	+
SOR	+	+	+	-	-	+	+	+	+
XYL	+	+	+	+	+	+	+	-	+

+ = positif ; - = négatif

Tableau XIV : Résultats des tests de reproductibilité avec un inoculum de 10⁸

Espèces	<i>E.coli</i>			<i>K.pneumoniae</i>			<i>S.paratyphi A</i>		
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
Substrats									
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	+	+	+	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SOR	+	+	+	+	-	+	+	+	+
XYL	+	-	+	+	+	+	+	+	+

- Les variations des profils pour chacune des trois espèces sont minimales. Après une incubation de 4h de temps, les résultats d’une identification par Micro-CSB Entérobactéries sont répétables et reproductibles. Ceci ne fait que confirmer les nombreux travaux sur la validité de cette méthode.

- Selon ces résultats, à première vue, aucun des deux inocula testés ne permet une bonne discrimination des trois espèces, sur la seule base des sucres, et après une incubation de 4h. En effet, avec 10^7 , la séparation entre *E. coli* et *S.paratyphi A* n'est pas possible, car les 2 espèces ont fermenté les 5 sucres (GLU, MAN, SOR, LAC, et XYL) ; à 10^8 , aucune discrimination n'est possible : tous les sucres sont fermentés par les 3 bactéries.
- Il semble évident que d'autres caractères doivent intervenir dans cette identification.

Nous avons donc eu recours au calcul des probabilités d'appartenance des 3 espèces.

Ce calcul porte sur l'identification de souches supposées inconnues dans les mêmes conditions.

Elle est basée sur la mesure de similitude entre leur profil et ceux des espèces identifiables à l'aide de données recueillies (tables diagnostiques). Nous avons utilisé les résultats de la galerie API 20E comme références [5].

Dans les tables diagnostiques (ou matrices de données), est contenue, pour chaque taxon, la probabilité de positivité (*f*) aux différents tests.

Le produit des valeurs (probabilité cumulée) donne la fréquence théorique de la souche dans l'espèce ou *probabilité absolue*.

Cette fréquence est ensuite divisée par la somme des fréquences théoriques pour chaque taxon soumis à la comparaison.

Le résultat (x par 100) donne la probabilité d'appartenance à l'espèce ou *probabilité relative*.

- Si la réponse de la souche pour un test est positive, on retient f
- Si la réponse de la souche pour un test est négative, on retient $1 - f$.

Probabilité absolue = $f \times (1 - f) \times \dots$

$$\text{Probabilité relative} = \frac{\text{probabilité absolue}}{\sum \text{probabilité absolue}} \times 100$$

On considère généralement les seuils suivants :

- > 99,9 % : excellente identification
- > 99 % : très bonne identification
- > 90 % : bonne identification
- > 80 % : identification acceptable
- < 80 % : identification inacceptable

C'est ainsi que nous allons exploiter les résultats de quelques souches pour essayer de valider en terme de probabilité, la possibilité d'identification des entérobactéries par les Micro-CSB Entérobactéries, dans nos conditions d'étude (4h d'incubation, inoculum 10^7 ou 10^8).

3.3.2. Probabilités d'identification

3.3.2.1. Avec un inoculum de 10^7 UFC/ml

➤ *Escherichia coli*

L'étude que nous avons effectuée sur l'identification de *Escherichia coli* a donnée les résultats suivants :

Espèces	<i>E. coli1</i>	<i>E. coli2</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. vulneris</i>	Espèce X (<i>E. coli</i> probable)
Caractères					
MH	100	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	0	-
LDC	74	45	99	50	-
ODC	70	20	100	0	-
ADH	1	1	1	30	-
CS	0	0	0	0	-
UREE	3	1	0	0	-
H ₂ S	1	1	0	0	-
GLU	99	99	100	100	+
MAN	98	90	99	100	+
SOR	91	42	0	1	+
MOB	95	5	93	100	+

+ = (f) ; - = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *E. coli1* = $6.2 \cdot 10^{-2}$
- X appartienne à *E. fergusonii* = 0
- X appartienne à *E. vulneris* = $3.5 \cdot 10^{-3}$
- X appartienne à *E.coli2* = $7.9 \cdot 10^{-3}$

La probabilité relative pour que :

- X appartient à *E. coli1* = 84.9 %
- X appartient à *E. vulneris* = 4.79 %
- X appartient à *E.coli2* = 10.8 %

Ainsi, avec un temps d'incubation de 4h et un inoculum de 10^7 UFC/ml, *Escherichia coli* a pu être identifié avec une probabilité d'appartenance de **84.9 %**, malgré l'existence de différents variants.

➤ *Klebsiella Pneumoniae*

Les résultats pour *Klebsiella pneumoniae* sont les suivants :

Espèces	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae ssp ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae ssp rhinoscleromatis</i>	Espèce X (<i>K. pneumoniae probable</i>)
MH	100	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	0	-
ADH	0	18	0	5	-
LDC	80	25	73	0	+
ODC	0	1	0	0	-
CS	89	18	86	0	+
UREE	78	1	75	0	-
H2S	0	0	0	0	-
IND	99	0	0	0	-
GLU	100	99	100	99	-
MAN	100	96	99	100	-
SOR	100	66	99	90	-
MOB	0	0	0	0	-

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Klebsiella oxytoca* = 0
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae* = $4.8 \cdot 10^{-6}$
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* = 0
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis* = 0

Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae, ne peut pas être identifié avec un inoculum de 10^7 UFC/ml et un temps d'incubation de 4h.

➤ *Salmonella paratyphi A*

Caractères	Espèces <i>S. paratyphi A</i>	<i>S. pullorum</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. gallinarum</i>	Espèce X (<i>S. paratyphi A</i> probable)
MH	100	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	0	-
ADH	5	1	1	1	-
LDC	0	75	99	100	-
CS	0	0	0	0	-
CC	0	0	0	0	-
H ₂ S	1	85	8	25	-
UREE	0	0	0	0	-
GLU	100	100	100	100	+
MAN	99	100	99	100	+
SOR	99	0	99	0	+
MOB	95	0	97	0	+

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartient à *S.paratyphi A* = 0.87
- X appartient à *S.pullorum* = 0
- X appartient à *S.typhi* = $8.6 \cdot 10^{-3}$
- X appartient à *S.gallinarum* = 0

La probabilité relative pour que :

- X appartient à *S.paratyphi A* = 99 %
- X appartient à *S.typhi* = 1%.

La probabilité relative pour que la souche X appartienne à l'espèce *S.paratyphi A* est de 99 % > 90 %, donc l'inoculum 10^7 UFC/ml a permis de faire une bonne identification de la souche de *S.paratyphi A*.

Remarque : Pour un temps d'incubation de 4h et un inoculum de 10^7 UFC/ml, *E. coli* et *S.paratyphi* peuvent être identifiés avec respectivement une identification acceptable et une bonne identification alors que *K. pneumoniae* ne peut pas être identifié avec cet inoculum et ce temps d'incubation.

3.3.2.2. Avec un inoculum de 10^8 UFC/ml

➤ *Escherichia coli*

Espèces	<i>E. coli1</i>	<i>E. coli2</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. vulneris</i>	Espèce X (<i>E. coli</i> probable)
Caractères					
MH	100	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	0	-
LDC	74	45	99	50	+
ODC	70	20	100	0	-
ADH	1	1	1	30	-
CS	0	0	0	0	-
UREE	3	1	0	0	-
H ₂ S	1	1	0	0	-
GLU	99	99	100	100	+
MAN	98	90	99	100	+
SOR	91	42	0	1	+
MOB	95	5	93	100	+

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartient à *E. coli1* = 0,17
- X appartient à *E. fergusonii* = 0
- X appartient à *E. vulneris* = $3.5 \cdot 10^{-3}$
- X appartient à *E.coli2* = $6.5 \cdot 10^{-3}$

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *E. coli1* = 94.4 %
- X appartienne à *E. vulneris* = 1.94%
- X appartienne à *E.coli2* = 3.6%.

Ainsi, avec un temps d'incubation de 4h et un inoculum de 10^8 UFC/ml, *Escherichia coli* a pu être identifié avec une probabilité d'appartenance de **94.4%**, malgré l'existence de différents variants.

➤ *Klebsiella pneumoniae*

Espèces	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae ssp ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae ssp rhinoscleromatis</i>	Espèce X (<i>K. pneumoniae probable</i>)
MH	100	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	0	-
ADH	0	18	0	5	-
LDC	80	25	73	0	+
ODC	0	1	0	0	-
CS	89	18	86	0	+
UREE	78	1	75	0	-
H2S	0	0	0	0	-
IND	99	0	0	0	-
GLU	100	99	100	99	+
MAN	100	96	99	100	+
SOR	100	66	99	90	+
MOB	0	0	0	0	-

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Klebsiella oxytoca* = $1,5 \cdot 10^{-3}$
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae* = $2,2 \cdot 10^{-2}$
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* = 0,15
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis* = 0

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Klebsiella oxytoca* = 0,88 %
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae* = 12.9 %
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* = 88.2 %

La probabilité relative pour que la souche X étudiée appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* est de **88.2 %** > 80 % traduisant une identification acceptable de l'espèce.

➤ *Salmonella paratyphi* A

Espèces	<i>S. paratyphi</i> A	<i>S. pullorum</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. gallinarum</i>	Espèce X (<i>S. para typhi</i> A probable)
MH	100	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	0	-
ADH	5	1	1	1	-
LDC	0	75	99	100	-
CS	0	0	0	0	-
CC	0	0	0	0	-
H2S	1	85	8	25	-
UREE	0	0	0	0	-
GLU	100	100	100	100	+
MAN	99	100	99	100	+
SOR	99	0	99	0	+
MOB	95	0	97	0	+

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartient à *S.paratyphi A* = 0.87
- X appartient à *S.pullorum* = 0
- X appartient à *S.typhi* = $8.6 \cdot 10^{-3}$
- X appartient à *S.gallinarum* = 0.

La probabilité relative pour que :

- X appartient à *S.paratyphi A* = 99 %
- X appartient à *S.typhi* = 1%.

La probabilité relative pour que la souche X appartienne à l'espèce *S.paratyphi A* est de **99 %** > 90 %, donc l'inoculum 10^8 UFC/ml a permis de faire une bonne identification de la souche de *S.paratyphi A*.

Conclusion : Une bonne identification des 3 espèces par les galeries Micro-CSB Entérobactéries est possible en **4h**, avec un inoculum de **10^8** UFC/ml, à condition de tenir compte de **l'ensemble des caractères** d'identification de chaque bactérie.

IV. COMMENTAIRES

4.1. Les souches bactériennes

Nous n'avons pu travailler que sur trois souches d'entérobactéries (une souche de chaque espèce), ce que nous trouvons vraiment insuffisant vue l'importance des résultats de notre étude sur l'amélioration de l'utilisation des galeries Micro-CSB Entérobactéries. Un plus grand nombre de souches et d'espèces aurait peut être pu donner des résultats définitifs. Mais signalons qu'au départ, notre travail devait porter sur un nombre significatif de souches, mais nous avons passé énormément de temps sur les dilutions des inocula, ainsi que le dénombrement bactérien qui se sont avérés fastidieux comme manipulations.

Il s'agissait de souches déjà identifiées et conservées à -20°C ; nous avons jugé qu'une identification sommaire était suffisante pour s'assurer de l'authenticité des espèces, comme cela avait déjà été suggéré et fait dans des travaux antérieurs [9, 19, 30].

Ces souches ont été isolées sur de la gélose CLED (cysteine lactose electrolyte deficient). Celle-ci avec son composant lactosé permettait une meilleure caractérisation de l'ONPG. En effet, les souches qui fermentent le lactose donnent sur ce milieu de culture des colonies jaunes, alors que celles qui ne le fermentent pas donnent des colonies transparentes ou bleues.

4.2. Le dénombrement sur boîte de pétri

Cette technique s'est avérée très fastidieuse. La difficulté majeure était pour chaque souche, de trouver la dilution convenable du bouillon avant son étalement sur les boîtes de pétri. Des séries de dilutions ont été nécessaires à chaque point de prélèvement. L'utilisation d'un spectrophotomètre et d'un densitomètre nous a été d'un grand secours, lors de la détermination de la turbidité de l'inoculum à chaque instant.

La manipulation exigeait également des conditions rigoureuses d'aseptie et de stérilité. Eviter les souillures était en effet une assurance de la qualité des résultats du dénombrement.

4.3. Identification

4.3.1. Le choix de la méthode : Micro-CSB (Entérobactéries)

Les galeries Micro-CSB mises au point dans l'une des institutions hospitalières de notre pays, comme toute œuvre africaine, mérite d'être soutenue et améliorée. Moins onéreuses et donc à la portée de nos centres de santé à moyens limités, ces micro méthodes d'identification ont fait la preuve de leur efficacité depuis plusieurs années. Elles font l'objet de mises à jour fréquentes [3, 12, 16, 22], par l'élaboration d'algorithmes d'identification, et de travaux de validation [26, 27].

Ces méthodes d'identification sont, pour les laboratoires de nos pays en développement, une excellente alternative face au coût de revient élevé des galeries d'exportation. Ces études initiées pour en assurer la compétitivité même en situation d'urgence semblent donc pertinentes.

4.3.2. Méthode d'étude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification

On note une évolution graduelle de cette étude depuis deux ans.

En effet, l'étude de l'effet inoculum par une modélisation et une prédiction de la croissance bactérienne semble assez abstraite et aléatoire [19]. De plus, les conditions d'une réduction du temps d'incubation de la galerie n'étaient pas réunies.

En 2008, cette étude a fait intervenir les deux variables : temps d'incubation et inoculum. Mais l'analyse a été basée sur les taux de concordances des caractères par rapport aux caractères d'identification à 24h de chaque espèce [9].

La particularité de notre travail par rapport à ces travaux antérieurs semblables, est non seulement, l'étude, caractère par caractère, des profils biochimiques obtenus pour chaque inoculum testé, et selon le temps d'incubation, mais aussi et surtout la validation expérimentale des résultats obtenus.

4.3.3. Exploitation des résultats

➤ Approche analytique

- A l'étude des taux de concordances [9], nous avons préféré une analyse caractère par caractère des différents profils de chaque espèce pour chaque inoculum et chaque temps d'incubation. Chaque caractère était alors considéré comme une variable. C'est ce qui a inspiré l'approche mathématique par le programme **R**.
- Les résultats de cette analyse mathématique n'ont pas été décevants ; au contraire, ils nous ont confortés dans la nouvelle approche analytique que nous avons choisie, bien que l'inoculum (10^7 UFC/ml) et les caractères discriminatoires (sucres) n'aient pas été confirmés par la validation.
- Ceci, à notre avis, pourrait s'expliquer par la différence notoire entre les concepts des deux sciences : microbiologie et mathématique. Inoculum, temps d'incubation et caractères d'identification, qui ne sont que des variables en analyse mathématique, deviennent des conditions de croissance de bactéries qui sont des êtres vivants. Et la croissance optimale d'une bactérie dépend de nombreux facteurs intrinsèques et environnementaux.
- Aussi, ne sommes-nous pas restés figés sur les résultats de l'analyse mathématique lors de la validation, même si notre observation directe des profils biochimiques a donné les mêmes résultats. Puisqu'apparemment, les profils obtenus indiquaient une possibilité d'identification après 4h d'incubation, nous avons donc validé deux inocula successifs : 10^7 et 10^8 UFC/ml, pour augmenter les chances d'obtenir des résultats probants.

- Les caractères discriminatoires ne posaient pas de problèmes : généralement en bactériologie, une bonne identification repose difficilement sur la seule fermentation de sucres, car ce caractère varie énormément et est parfois aléatoire. La preuve, c'est la fermentation de tous les sucres par *E. coli* et *S. paratyphi A*, avec un inoculum de 10^7 UFC/ml, après 4h d'incubation, et par les trois espèces avec l'inoculum 10^8 UFC/ml.

➤ **Résultats**

- Une différenciation parfaite des trois espèces a été obtenue après validation avec un inoculum de 10^8 UFC/ml. Avec 10^7 UFC/ml, seule *K. pneumoniae* n'a pu être identifiée. Cela pourrait être lié à des facteurs intrinsèques que nous ne maîtrisons pas, puisque *E. coli* et *S. paratyphi A* sont bien identifiés avec un inoculum de 10^7 UFC/ml, et dans les mêmes conditions de manipulation que *K. pneumoniae*. Une deuxième validation permettrait de lever le doute sur cet aspect.
- Pour le temps d'incubation < 24 h, nous avons pu démontrer la possibilité d'une bonne identification en 4h d'incubation ; selon certains travaux antérieurs, il fallait 12h d'incubation de la galerie [9].
- L'ensemble des caractères figurant sur la galerie se sont avérés nécessaires pour une bonne identification en 4h de temps. Ce qui paraît logique, car si la galerie est constituée de ces caractères, c'est qu'ils sont tous importants pour une bonne identification, quel que soit le temps d'incubation.

CONCLUSION

Les infections dues aux entérobactéries occupent une place importante en pathologie infectieuse en raison de leur fréquence et de leur gravité.

Le diagnostic et le traitement de ces infections imposent l'identification correcte de l'agent étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique.

L'existence actuelle de toute une gamme de galeries facilite l'identification au laboratoire de la plupart des espèces bactériennes isolées en pathologie humaine. Mais leur inaccessibilité aux couches sociales défavorisées, liée à leur coût élevé, a conduit à l'élaboration, à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne de l'HALD, des galeries Micro-CSB, moins onéreuses.

Ce sont des micro-méthodes d'identification permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation des sucres et/ou d'assimilation de substrats carbonés.

Leur efficacité, fiabilité et spécificité ont été prouvées par des études antérieures.

Mais l'existence des galeries à incubation réduite telle que les galeries API 4h, pose le problème de la compétitivité des Micro-CSB, surtout en situation d'urgence.

C'est pour répondre à cette préoccupation qu'une série d'études initiées ces dernières années, vise à rechercher les conditions d'une bonne identification en un temps d'incubation aussi court que possible.

Notre travail en fait partie et avait pour objectifs :

- D'étudier la possibilité d'une bonne identification de *E. coli*, *K. pneumoniae*, et *S paratyphi A*, par les Micro-CSB Entérobactéries, en un temps d'incubation inférieur à 24h,
- De rechercher, l'inoculum bactérien permettant cette identification,
- De valider expérimentalement les résultats obtenus.

Cette étude a eu lieu au laboratoire de Bactériologie et Virologie Fondamentale et Appliquées de l'UCAD II entre Janvier et Juin 2009, avec l'aide de partenaires mathématiciens.

Elle a porté sur trois souches déjà identifiées et conservées à -20°C :

- *Escherichia coli* ATCC 25922, souche de référence,
- 2 souches de contrôle : *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Paratyphi A*.

Après une identification sommaire des souches, nous avons testé différents inocula des espèces étudiées (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. paratyphi A*), sur les galeries micro-CSB Entérobactéries, et déterminé la concentration bactérienne qui donne le maximum de caractères concordants en un temps aussi court que possible ($< 24\text{h}$).

Pour ce faire :

- Des inocula de chaque espèce ont été obtenus après incubation d'un inoculum de départ, et dénombrement bactérien sur boîte de Pétri pour en déterminer la concentration (en UFC/mL) à différents intervalles de temps,
- Des galeriesensemencées avec chaque inoculum ont été incubées pendant 4h, 8h, 12h et 24h.

Les profils biochimiques obtenus pour chaque espèce en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation de la galerie, ont ensuite été analysés par deux méthodes : une analyse mathématique grâce au programme **R**, et une analyse directe des différents profils.

La validation des résultats de l'analyse par des tests de répétabilité, reproductibilité et le calcul des probabilités d'appartenance des espèces, nous a permis d'aboutir à la conclusion suivante : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Salmonella paratyphi A* peuvent être identifiés par les galeries Micro-CSB Entérobactéries, après **4h** d'incubation, avec un inoculum de **10⁸** UFC/ml, en se basant sur l'ensemble des caractères biochimiques composant la galerie.

Notre travail n'ayant porté que sur trois espèces, nos résultats semblent insuffisants pour être extrapolés à l'ensemble des entérobactéries.

Il serait donc intéressant que cette étude soit poursuivie et étendue, non seulement à un plus grand nombre de souches et d'espèces d'entérobactéries, mais également aux autres galeries Micro-CSB existantes (Staphylocoques, Streptocoques, Bacilles à Gram négatif non fermentaires...).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

**1. Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des
Facultés de Pharmacie Françaises (AEMIP)**

Microbiologie générale et santé

Editions ESKA, Paris, 2003 ; 155-162.

2. AVRIL J., MONTEIL H., DOBERNAT H., DENIS F.

Bactériologie clinique.

ELLIPSE, Paris, 1992 ; 171, 172, 175, 208, 294, 295.

3. AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H.

Bactériologie Clinique

Ellipses, Paris, 3^e édition, 2000 ; 114.

4. BAKHOUM I.

Contrôle qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne.

Thèse Pharm., Dakar, 2004.

5. BIOMERIEUX

Système d'identification des entérobactéries

BioMérieux SA France, 2002.

6. BOSSERT I. D., YOUNG L.Y.

Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium.

Applied and environmental Microbiology 1986 ; 52 (5): 1117-1122.

7. BRENNER D.J.

Introduction to the family Enterobacteriaceae. In: Starr M.P., Stolp H.G.

Eds the prokaryotes Springer-Verlag K.L. Berlin, 1981 ; 1105 – 1127.

**8. CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER E., PINON G.,
VARGUES R.**

Bactériologie médicale : Techniques usuelles.

SIMEP SA, Paris, 1987 ; 121-137, 146-155.

9. D'ERNEVILLE M.M.

Etude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification des bacilles à Gram négatif.

Thèse de pharm., Dakar, 2008 ; n° 106.

10. DELIGNETTE M.L.

Méthodes de Prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes.

Thèse Lyon n°118, 1995.

11. DENIS F., DABERNATH, MONTEIL H. AVRIL J. L.

Bactériologie clinique

Edition marketing, Paris, 1998 ; 144-145.

12. DIOP R.

Standardisation et optimisation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 75.

13. DRAME B.

Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques.

Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 86.

14. EDWARDS P.R., EWING W.H.

Identification of the *Enterobacteriaceae*

Ed Burgess, Minneapolis, 3rd ed, 1977.

15. FARMER

Biochemical identification of new species and biogroup of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens

J. clin. Microbiol 1985 ; 21 : 46-76.

16. FARMER

Enterobacteriaceae: Introduction and identification In : Manual of clinical Microbiology, P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, Tenover F.C. and R.H. Tenover (eds) 7th ed.

American Society for Microbiology, Washington DC, 1999 ; pp 442-458.

17. FERRON A.

Bactériologie médicale

Editions C. et R. 1984 ; (3, 14, 15): 3-2- 15-6.

18. FERRON A.

Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine

Edition C et R, 12^e édition 1984 ; 122.

19. GUEYE O.

Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif.

Thèse de pharm., Dakar, 2007 ; n° 36.

20. JANDA J. M. and ABBOTT S. L.

Historical perspectives on the family Enterobacteriaceae
Lippin Cott Raven Publishers, Philadelphia 1998 ; 1-7.

21. JAWETZ E., Melnick J. L., Adelberg E. A.

The Growth, Survival, & Death of Micro-organisms.
Review of Medical Microbiology, 1987 ; 5 : 66-70.

22. JOHNSON M.T. (Ph D)

A Simplified Branching flow Diagram. In: Identification of the
Enterobacteriaceae.
Syst., Microbiol, 2004 ; 1-4.

23. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison

Department of Bacteriology
Growth of Bacterial Populations, Rev. 2002 ; 1-7.

24. LE MINOR L., VERON M.

Bactériologie Médicale
Flam. Méd. Science, Paris, 1984 ; 392 – 394.

25. LE MINOR L., VERON N.

Bactériologie Médicale
Flam Med. Science, Paris, 1989 ; 318-333 ; 773-823.

26. NDIR I.

Mise au point d'une microméthode d'identification des entérobactéries
Thèse Pharm. Dakar, 1996 ; n° 05.

27. NDOYE R.

Algorithme d'identification des Entérobactéries et des bacilles gram négatifs non fermentaires.

Thèse Pharm., 2004 ; Dakar, n° 83.

28. NIANG O.

Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Thèse Pharm., Dakar, 2003 ; n° 60.

29. PERRIERE G.

Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation certains aspects de l'expression des gènes chez *E. coli* UCBL.

Thèse Université de Lyon I, France. 1992 ; : 14, 77.

**30. PILET C., BOURDON J. L., TOMA B., MARCHAL N.,
BALBASTRE C.**

Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne.

Doins Paris 2^e édition 1979 ; 109-187.

31. SANAA. M.

Microbiologie prévisionnelle : principaux modèles de croissance utilisée en appréciation quantitative des risques.

Epidemiol et Santé Anim, 2002 ; 41, 169 – 177: 2, 4.

32. SENE A.

Validation des méthodes d'identification bactérienne des bacilles à Gram négatif

Mémoire Master, Université Gaston Berger, 2008.

33. SOW M. F.

Utilisation des méthodes biométriques pour la validation de l'identification des cocci à Gram positif.

Thèse de pharm., Dakar, 2007 ; n° 48.

34. VERON M.

Croissance et nutrition bactériennes

Bactériologie médicale, 1984 ; 2:22-28.

SERMENT DE GALIEN

« Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque. »

VU
LE PRESIDENT DU JURY

VU
LE DOYEN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LE RECTEUR DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR