

UNIVERSITE CHEICK ANTA DIOP DE DAKAR (UCAD)

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



Année 2014-2015

Mémoire N° : 1159

Optimisation du délai d'identification des bacilles à Gram négatif par microplaques CSB®

DOMAINE : SCIENCES, TECHNOLOGIE ET SANTE

MENTION : BIOLOGIE, NUTRITION ET PATHOLOGIE HUMAINES

MEMOIRE

Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Présenté et soutenu par :

Etienne Ibrahim Jean Oumalher Nathalie

Le 31 Octobre 2015

Jury

Président :	Mr Cheick Saad Bouh BOYE	Professeur
Membres :	Mr Makhtar CAMARA	Maître de Conférence agrégé
	Mme Halimatou Diop NDIAYE	Maître de Conférence agrégé
Directeur de mémoire :	Mr Cheick Saad Bouh BOYE	Professeur
Co-directeur de mémoire :	Mr Abdoulaye SECK	MaîtreAssistant

Dédicaces et remerciements.

Je dédie ce travail :

A mes parents **SAID MOUZE Faouzia** et **ETIENNE Ibrahim**, merci pour cet amour et ce soutien inconditionnel. Puisse Dieu vous donner longue vie.

A mes sœurs,

Pour votre présence et votre affection, je vous dis merci.

Aux autres membres de la famille que je n'ai pas pu citer. Puisse le bon Dieu exaucer vos souhaits et vous combler de ses bienfaits.

A nos Maîtres du Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée, en particulier Professeur **Cheick Saad Bouh BOYE** et Docteur **Abdoulaye SECK**.

A mon co-directeur, Dr Abdoulaye SECK,

Vous vous êtes personnellement investi dans la réalisation de ce travail. Nous vous renouvelons nos sincères remerciements pour votre disponibilité et votre compétence.

A Dr **Sokhna FALL**,

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude pour votre contribution et votre disponibilité dans la rédaction de ce mémoire.

A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie Virologie du Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec, en particulier **Amadou Diop**, **Abdoulaye Diop**, **Adja Tchiané**, **Fatou Bintou Guèye**, **Dior Dieng**.

A mes promotionnaires et camarades du Master.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation et à la réalisation du présent travail, je vous dis merci.

A notre Maître et Président du jury

Professeur Cheick Saad Bouh BOYE

Merci cher Professeur pour le temps que vous nous accordez en acceptant de présider ce jury.

Votre esprit d'ouverture et votre disponibilité vis-à-vis de vos étudiants font de vous une personnalité exceptionnelle. La pertinence de vos analyses scientifiques ainsi que votre réputation fera sans doute de ce travail un document fiable. Veuillez trouver dans ces mots l'expression de notre sincère admiration. Que Dieu vous guide et vous bénisse.

A notre Maître et juge

Madame Halimatou Diop-NDIAYE

Cher Maître merci d'avoir accepté sans réserve de siéger dans ce jury malgré notre sollicitation tardive. Cela témoigne de votre gentillesse et votre dévouement pour tous. Vos contributions apporteront sans doute de la qualité à ce document vue la perspicacité de votre esprit scientifique.

A notre Maître et juge

Monsieur Makhtar CAMARA

En acceptant de juger ce travail, vous nous faites un grand honneur.

Soyez assuré très cher maître, de notre haute considération et de notre vive reconnaissance.

Liste des abréviations

ADH	: Arginine Dihydrolase
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ADP	: Adénoside Diphosphate
AMC	: Acide Methyl Carbinol
Ara	: Arabinose
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adénosine Triphosphate
BGN	: Bacille à Gram Négatif
BGNNF	: Bacille à Gram Négatif Non Fermentaire
BT	: Bouillon Thioglycolate
CLED	: Cystine Lactose Electrolyte Deficient
CSB	: Cheikh Saad-Bouh Boye
CS	: Citrate de Simmons
ESC	: Esculine
Glu	: Glucose
H₂S	: Sulfure d'Hydrogène
Ind	: Indole
ID-GBN	: Identification Bacille à Gram Négatif
KDPG	: 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate
Lac	: Lactose
LDC	: Lysine Décarboxylase
Man	: Mannitol
MEVAG	: Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides.

MGY	: Milk Glucose Yeast
MH	: Mueller Hilton
NADP	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Nit	: Nitrate
ODC	: Ornithine Décarboxylase
ONPG	: Ortho-NitroPhényl-β-Galactoside
PEP	: PhosphoEnol Pyruvate
pH	: potentiel d'Hydrogène
Rha	: Rhamnose
Sac	: Saccharose
Sor	: Sorbitol
TDA	: Tryptophane Désaminase
TDC	: Témoin Décarboxylase
TCS	: Trypto-Caséine-Soja
VP	: Voges-Proskauer
VP1	: α-naphtol (réactif de révélation)
VP2	: KOH (réactif de révélation)

	Page
Sommaire	
Liste des abréviations	4
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Introduction	10
Première partie : Revue de la littérature	12
I. Généralités sur les entérobactéries	13
I.1. Taxonomie-Classification	13
I.2. Les caractères bactériologiques des entérobactéries	14
I.2.1. Les caractères morphologiques	14
I.2.2. Les caractères cultureux	14
I.2.3. Les caractères biochimiques	14
II. Généralités sur les bacilles à Gram négatif non fermentaires	23
II.1. Classification.....	23
II.2. Les caractères bactériologiques des bacilles à Gram négatif non fermentaires.....	24
II.2.1. Les caractères morphologiques	24
II.2.2. Les caractères cultureux	24
II.2.3. Les caractères biochimiques.....	24
Deuxième Partie : Etude Expérimentale	26
I. Objectifs de l'étude	27
II. Cadre d'étude.....	27
III. Matériels.....	27
III.1. Souches bactériennes.....	27
III.2. Matériels	28
III.2.1. Matériels pour l'enrichissement et l'isolement.....	28
III.2.2. Matériels pour la conservation des souches.....	28
III.2.3. Milieux pour l'enrichissement et l'isolement	28

III.2.4. Réactifs de révélation.....	29
III.3. Milieux de culture.....	29
III. 3.1. Contrôle des milieux liquides	29
III.3.2. Distribution et déshydratation des milieux	30
III.3.3. Contrôle qualité des milieux déshydratés	31
IV. Méthodologie	32
IV.1. Ré-isolément et ré-identification des souches	32
IV.2. Modification de l’algorithme d’identification des bacilles à Gram négatif.	33
IV.3. Validation de l’algorithme d’identification	33
IV.4. Etude de la réduction du temps d’incubation du VP et des décarboxylases	34
IV.5. Mode opératoire de la microplaque CSB	35
IV.5.1. Ensemencement et incubation	35
IV.5.2. Lecture et interprétation.....	35
V. Résultats	37
V.1. L’identification des souches bactériennes	37
V.2. Résultats de la réduction du temps de lecture des tests VP et décarboxylases.....	48
VI. Discussion	50
Conclusion.....	52
Références bibliographiques	53
Annexes.....	55

Liste des tableaux

Tableau I: Composition et caractères différentiels de la famille des entérobactéries.....	4
Tableau II: Espèces bactériennes non fermentaires rencontrées en pathologie humaine.....	14
Tableau III: Souches témoins utilisées pour le contrôle d'efficacité des substrats des microplaques CSB®.....	30
Tableau IV: Plan de contrôle de stérilité des microplaques CSB® Entérobactéries	32
Tableau V: Plan de contrôle de stérilité des microplaques CSB® Bacilles à Gram négatif non fermentaires.....	32
Tableau VI: Réactifs de révélation et lecture des caractères biochimiques.....	36
Tableau VII: Profils d'une souche <i>Escherichia coli</i> probable et des espèces apparentées	42
Tableau VIII: Probabilité d'appartenance de la souche X aux espèces apparentées.....	43
Tableau IX: Profil des souches X1 et X2 à identifier et ceux des souches apparentées.....	43
Tableau X: Probabilités d'appartenances des souches X1 et X2 aux espèces apparentées	35
Tableau XI: Profils de la souche X à identifier et ceux des espèces apparentées.....	35
Tableau XII: Probabilité d'appartenance de la souche X aux espèces apparentées	36
Tableau XIII: Profils des souches X1 et X2 à identifier et ceux des souches apparentées	45
Tableau XIV: Probabilités d'appartenance des souches X1 et X2 aux espèces apparentées .	37
Tableau XV: Profils de la souche X et des espèces apparentées	37
Tableau XVI: Probabilité d'appartenance de la souche X aux espèces apparentées.....	38
Tableau XVII: Profils des souches X1 et X2 et des espèces apparentées	38
Tableau XVIII: Probabilités d'appartenance des souches X1 et X2 aux espèces apparentées	39
Tableau XIX: Résultats attendus et obtenus des différentes espèces testées.....	40

Liste des figures

Figure 1: La glycolyse, par la voie d'Embden Meyeroff	6
Figure 2: La voie d'Enter Doudoroff	7
Figure 3: La voie des pentoses phosphates	8
Figure 4: La voie des acides mixtes	9
Figure 5: La voie du butane-2-3-diol	9
Figure 6: Disposition de la microplaque CSB [®] d'identification des entérobactéries.....	231
Figure 7: Disposition de la microplaque CSB [®] d'identification des bacilles à Gram négatif.	31
Figure 8: Algorithme d'identification des principaux bacilles à Gram négatif.....	29
Figure 9: Algorithme d'identification des souches d'entérobactéries (1)	30
Figure 10: Algorithme d'identification des souches d'entérobactéries (2)	40
Figure 11: Algorithme d'identification des principales espèces de bacilles à Gram négatif non fermentaires	41

Introduction

En milieu hospitalier, il est primordial d'identifier les germes responsables d'infection. Ainsi, pour assurer une bonne prise en charge des patients, de nombreuses méthodes d'identification ont vu le jour : d'abord les mini galeries classiques, puis les automates d'identification et l'hybridation moléculaire de l'ADN.

Ces méthodes à la fois précises, rapides et fiables restent cependant, très onéreuses pour les structures sanitaires dans les pays en voie de développement.

Ainsi, pour faire face à l'accessibilité de ces méthodes, l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec a élaboré une méthode d'identification reposant sur l'utilisation de mini galeries : les microplaques CSB®.

La galerie micro CSB® est une méthode miniaturisée, peu coûteuse et fiable, permettant d'identifier les bactéries. Elle comporte plusieurs paramètres biochimiques non retrouvés sur une galerie classique (16 tests biochimiques pour les bacilles à Gram négatif). Elle nécessite un temps d'incubation de 12 heures qui constitue un handicap dans la prise en charge rapide de l'infection avec l'identification du germe ou des germes en cause.[6,7]

Le but de ce travail était d'étudier la possibilité de réduire le temps d'incubation des microplaques CSB® pour une identification rapide et fiable de la(es) souche(s) responsable(s) de l'infection dans un délai de 6 heures, afin de permettre une prise en charge rapide du patient. Pour ce faire, nous avons ajouté dans les milieux de culture habituels le pyruvate, un substrat qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- De réadapter l'algorithme d'identification des bacilles à Gram négatif établi au cours des années précédentes pour une lecture en 6 heures de la microplaque ;
- De réduire le temps d'incubation du test VP ;
- De réduire le temps d'incubation pour la recherche des décarboxylases.

Première partie : Revue de la littérature

I. Généralités sur les entérobactéries

I.1. Taxonomie-Classification

Les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* appelées entérobactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux. Elles constituent une grande famille très hétérogène aux plans pathologiques et écologiques. Les espèces qui composent cette famille sont soit des parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit des commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp*), soit des saprophytes (*Serratia spp*, *Enterobacter spp*) [11].

Les entérobactéries sont définies comme des bacilles à Gram négatif, oxydase négative, catalase positive à l'exception de *Shigella dysenteriae*, aéro-anaérobie facultatives (AAF), fermentant ou non le glucose, réduisant les nitrates en nitrites et poussant sur milieux ordinaires [9].

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 44 genres dont 176 espèces répertoriées et classées en fonction de caractères biochimiques clés (cf. tableau I). 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*. [2]

Tableau I: Composition et caractères différentiels de la famille des entérobactéries [4]

Tribus	Caractères biochimiques clés	Principaux genres chez l'homme
<i>Escherichiae</i>	VP-, TDA-, uréase-	<i>Escherichiae</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Moellera</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Leminorella</i> , <i>Yokenella</i> , <i>Trabulsiella</i>
<i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia (Hafnia)</i>	VP+	<i>Klebsiella</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Enterobacter</i> <i>Hafnia</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Serratia</i> <i>Cedecea</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Ewingella</i>
<i>Proteae</i>	TDA+	<i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Morganella</i> <i>Tatumella</i>
<i>Yersiniae</i>	Lactose-, LDC-,mannitol+	<i>Yersinia</i>

I.2. Les caractères bactériologiques des entérobactéries

I.2.1. Les caractères morphologiques

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif mesurant 2-3 μm de long sur 0,6 μm de large, qui peuvent être mobiles (par ciliature polaire ou péritriche) ou immobiles.

Quelques espèces ont une capsule visible au microscope (*Klebsiella*).

La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion qui confèrent à la bactérie un pouvoir virulent. [9]

I.2.2. Les caractères cultureux

Les entérobactéries se développent rapidement *in vitro* sur milieu ordinaire. La température optimale de croissance est de 37°C mais possible entre 20 et 40°C.

Sur gélose, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 mm de large sauf celles de *Yersinia* (moins de 1mm de diamètre). Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à former un tapis uniforme. Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges, grasses et luisantes [11].

En milieu liquide, les entérobactéries donnent un trouble uniforme du bouillon.

I.2.3. Les caractères biochimiques

Les caractères d'identification sont essentiellement biochimiques et utilisent des tests qui étudient les métabolismes glucidique et protidique.

I.2.3.1. Métabolisme glucidique

Les entérobactéries utilisent les voies d'Embden Meyeroff (cf. figure 1), d'Enter-Doudoroff (cf. figure 2) et des pentoses phosphates (cf. figure 3) pour dégrader le glucose en pyruvate qui va être fermenté via deux voies : la voie des acides mixtes (cf. figure 4) et celle du butane-2-3 diol (cf. figure 5) [9]

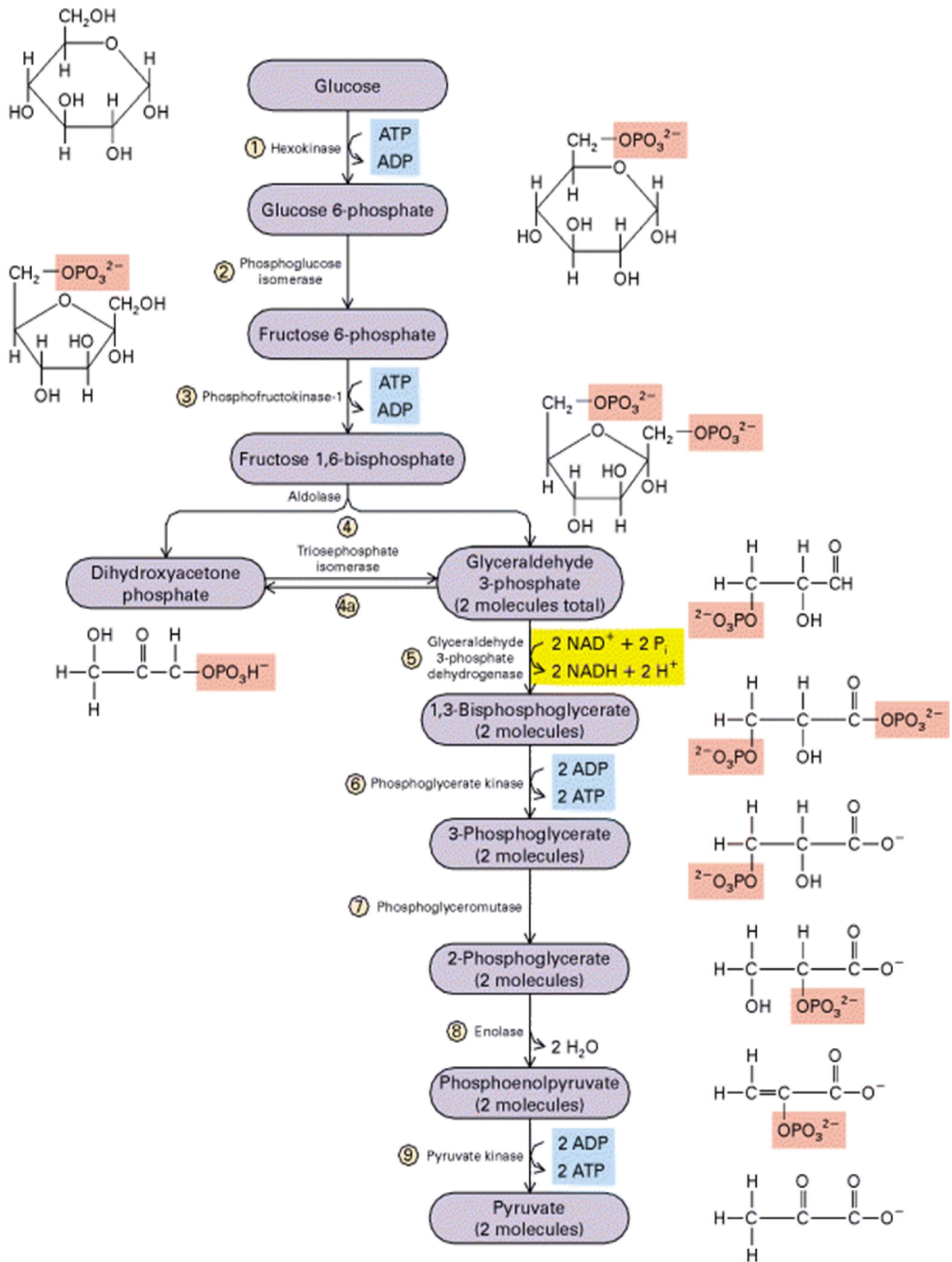


Figure 1: La glycolyse, par la voie d'Embden Meyeroff [20].

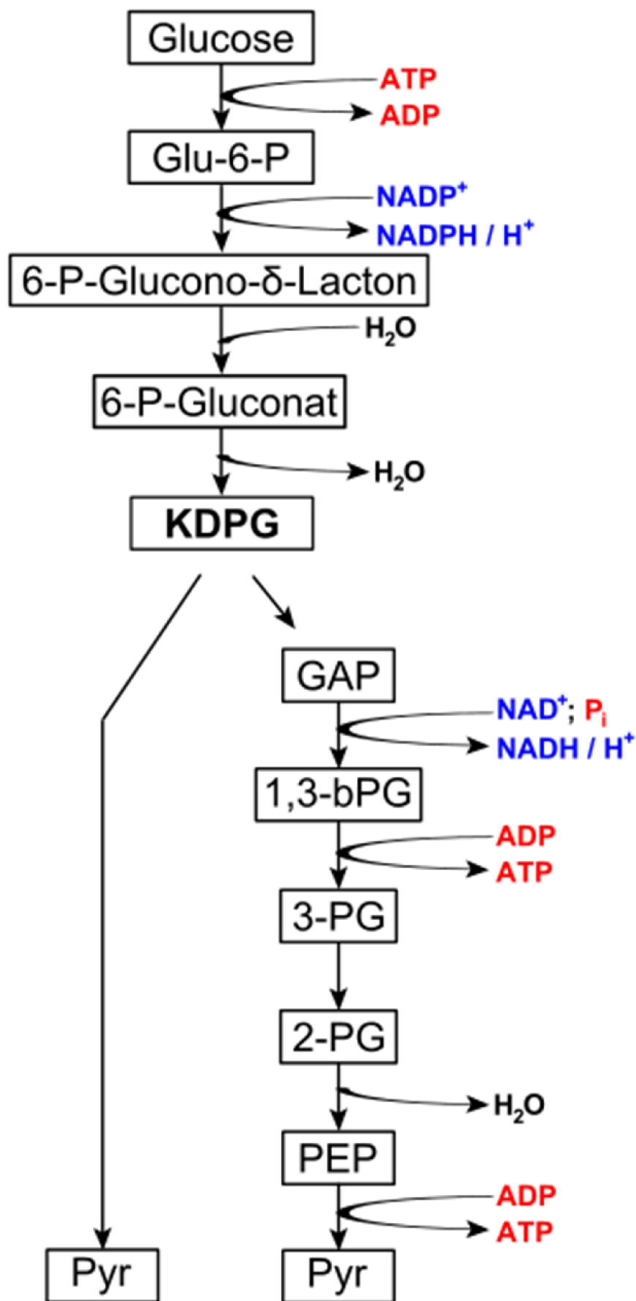


Figure 2: La voie d'Enter Doudoroff [21].

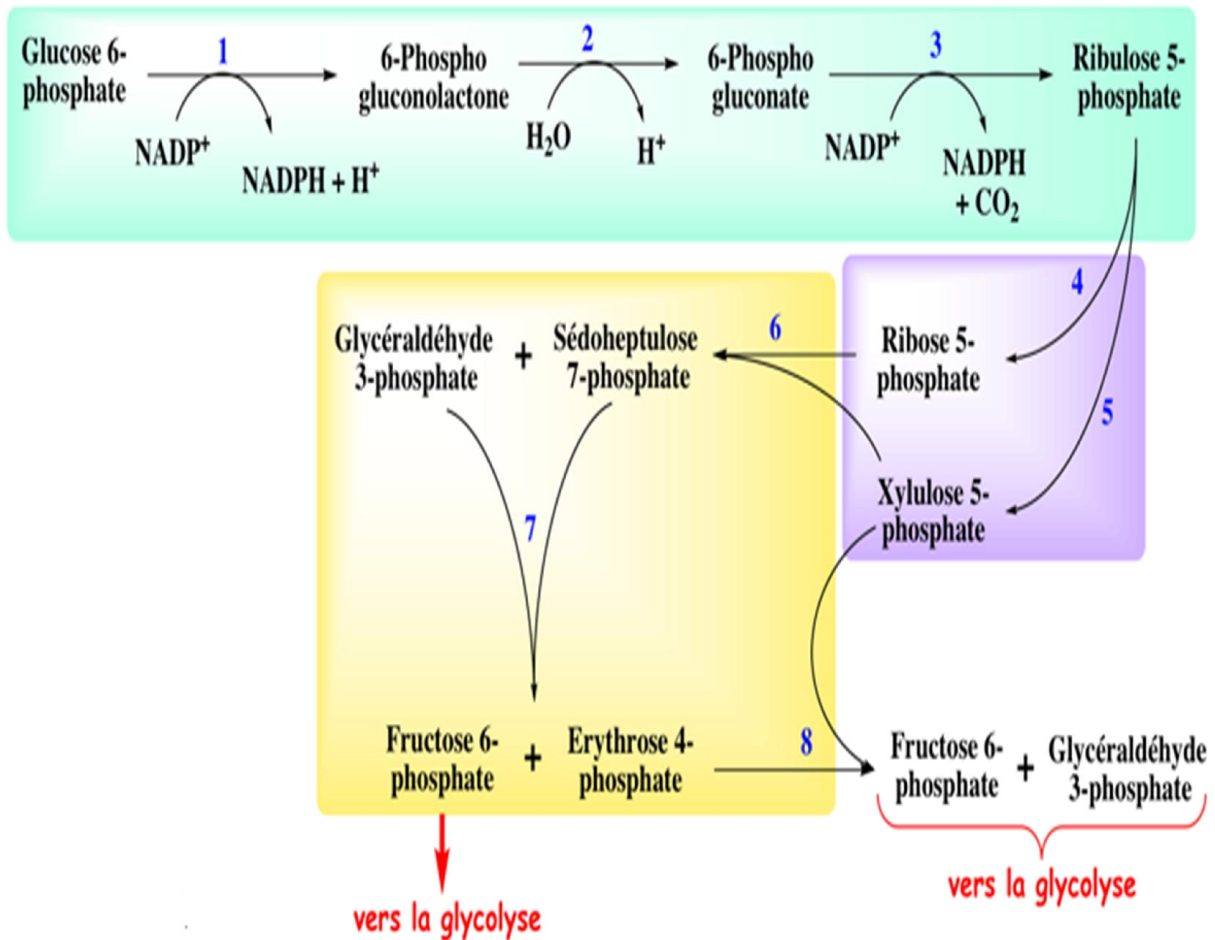


Figure 3: La voie des pentoses phosphates (<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/1PentosePhosphate/1PentosePhosphate.htm>, consultée le 5 Novembre 2015)

Le pyruvate, produit final de la dégradation du glucose, pourrait être fermenté par deux voies : la voie des acides mixtes et celle du butane-diol (cf. figure 4 et 5).

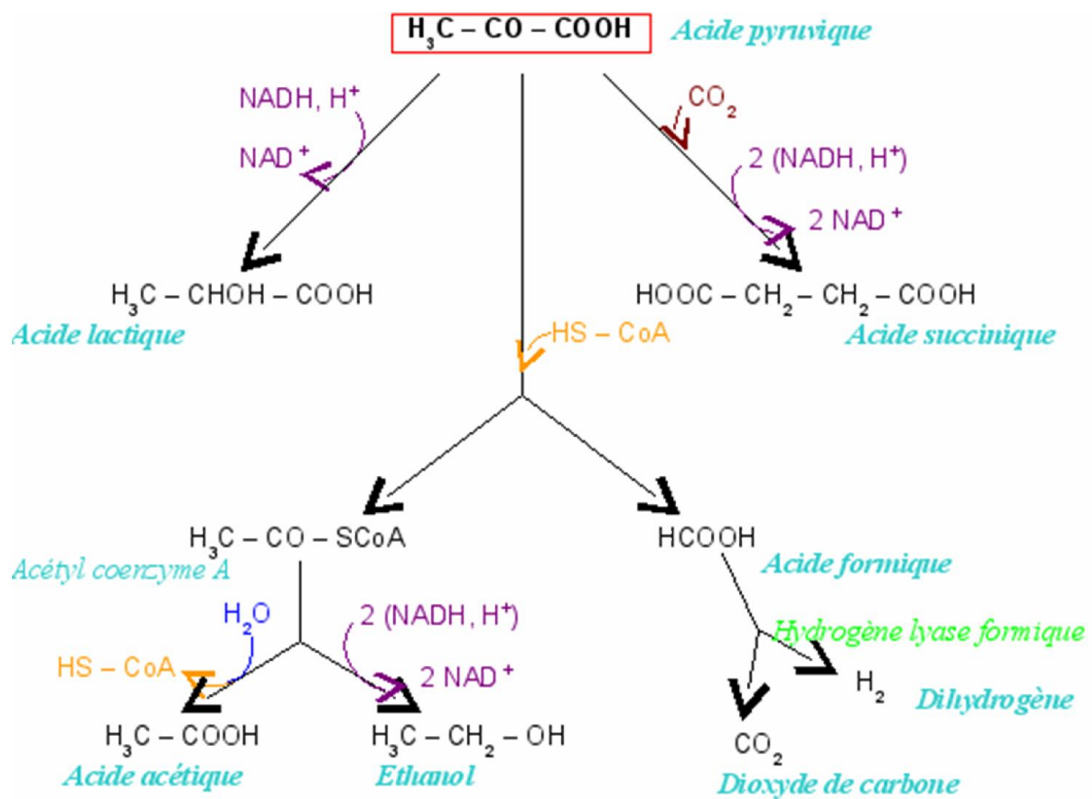


Figure 4: La voie des acides mixtes

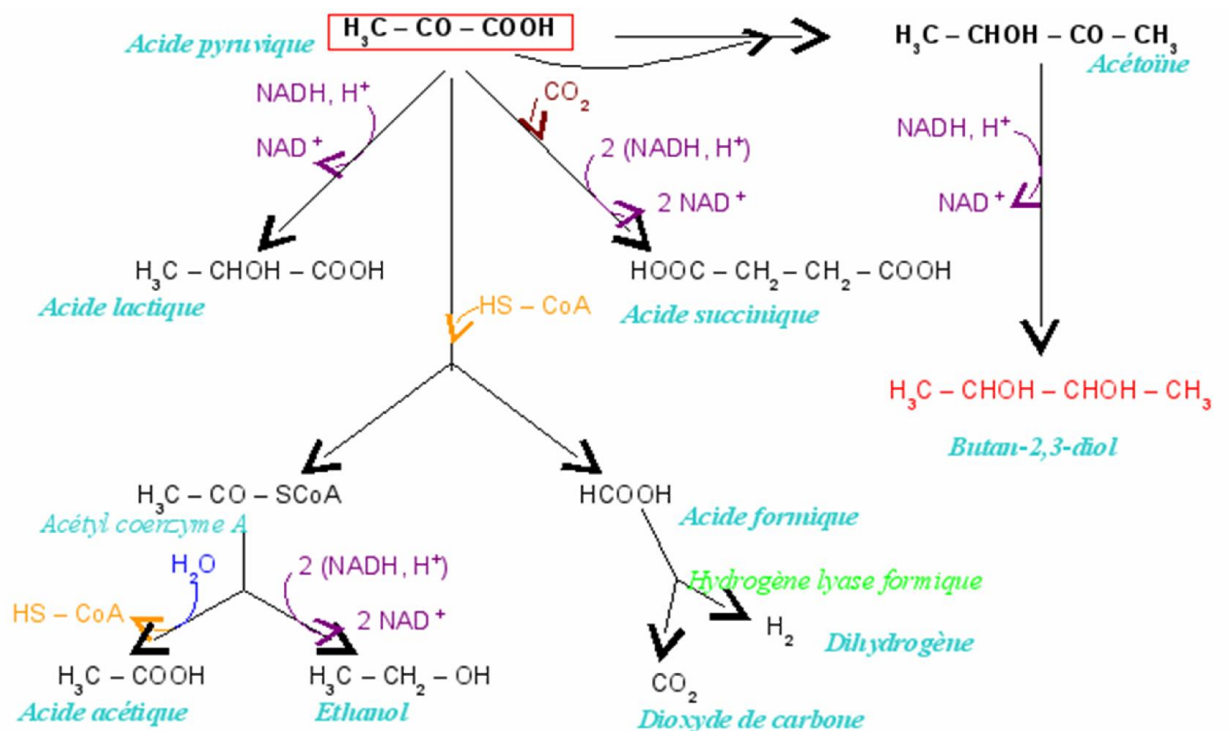


Figure 5: La voie du butane-2-3-diol (http://fr.wikipedia.org/wiki/Voies_fermentaires_des_ent%C3%A9robact%C3%A9ries, consultée le 24 Avril 2015)

L'utilisation des différentes voies métaboliques par la bactérie peut être étudiée avec les tests suivants :

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

On étudie la formation de l'acétyl méthyl carbinol (AMC 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) [10]

- **Test à l'ONPG (Orthonitrophényl β -D-Galactopyranoside).**

Le terme ONPG hydrolase est plus approprié 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 nitro-2-phénol et non celui du β -galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas les lactoses.

Le test à l'ONPG est basé sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène (l'ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside ou le 2-naphtol- β -D-galactopyranoside) utilisée comme substrat et libère respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le β -naphtol [5]

I.2.3.2. Métabolisme protidique

- **Recherche des décarboxylases**

Les décarboxylases (LDC, ODC, ADH) scindent les acides aminés, entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO_2 suivant la réaction :



Les décarboxylases sont des enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH optimum : 3,5 à 5,5) et des conditions d'anaérobiose.

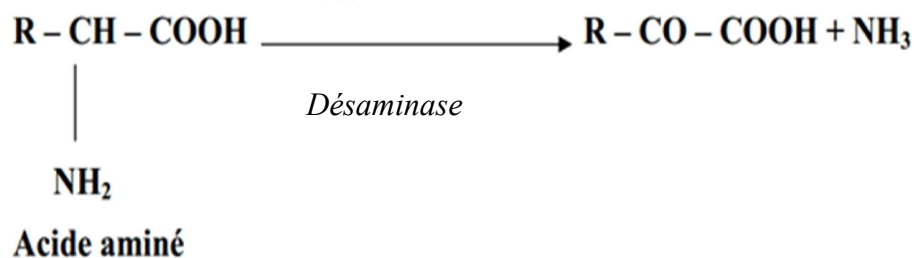
Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré (le rouge phénol) et l'acide aminé concerné.

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 du milieu.

Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu reste acide (coloration jaune) [16]

- **Recherche des désaminases oxydatives**

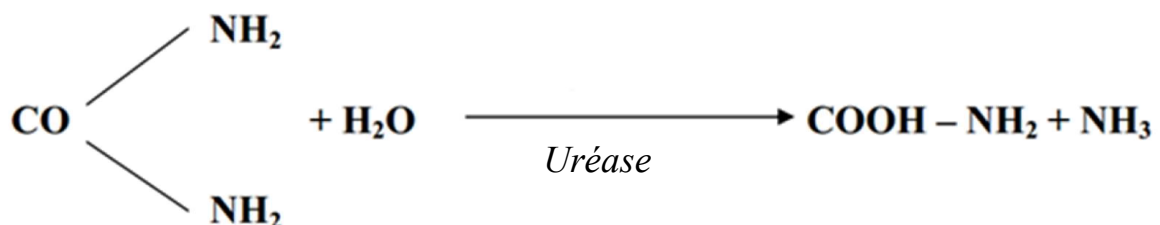
Les désaminases sont des enzymes induites qui agissent sur les acides aminés entraînant la formation des acides cétoniques correspondants, selon la réaction :



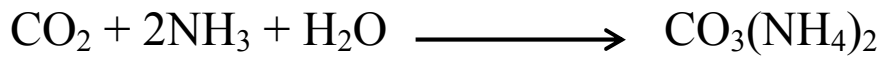
Les acides cétoniques formés ont la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe^{3+} . Cette propriété est utilisée pour la lecture en fin de la réaction [16]

- **Recherche de l'uréase**

Toutes les bactéries hydrolysent l'urée



CO₂+ NH₃ se combinent et donnent du carbonate d'ammonium selon la réaction suivante:

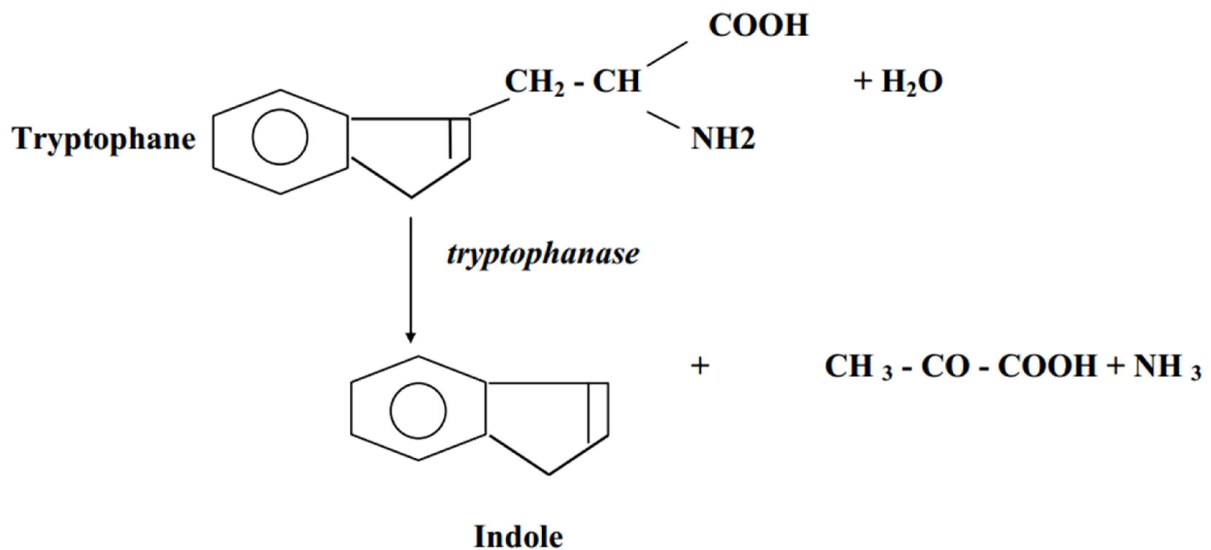


Sous l'action d'une uréase il y'a alcalinisation du milieu. Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu entrainant le virage de l'indicateur coloré de l'orange au rose framboise ou des fois au rouge violacé [16]

- Production d'indole

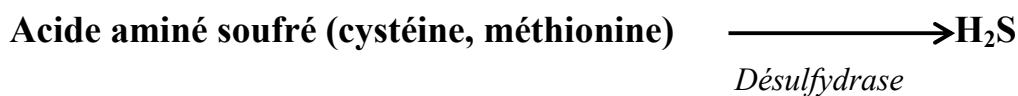
Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase avec formation de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac.

L'indole est apolaire et réagit fortement avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde en milieu acide et donne un anneau rouge qui remonte en surface [5]



- Production de H₂S

La mise en évidence de la production de H₂S se fait grâce à la présence de thiosulfate de sodium et de citrate ferrique.



Chez une souche dite H₂S +, le thiosulfate est réduit en anaérobiose en H₂S qui se combine au citrate de fer présent pour former un précipité de sulfure de fer noir [5]

I.2.3.3. Dégradation de certains sels organiques

- Utilisation du citrate de sodium

Certaines bactéries sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone. Une réaction positive se traduit par le virage du milieu au bleu [19]



- Milieu au citrate de Christensen

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

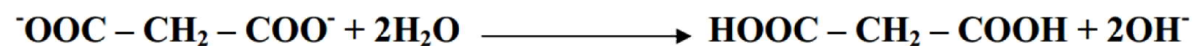
Dans ces conditions, certaines bactéries citrate négative sur milieu de Simmons sont capables d'utiliser le citrate en milieu de Christensen.

La formation d'ions hydroxydes alcalinise le milieu (virage du jaune au rose) [1]

- Dégradation du malonate de sodium

Le malonate est un inhibiteur du cycle de Krebs (inhibition de la succinate déshydrogénase). Seules les bactéries pouvant utiliser le cycle glyoxalique sont capables de pousser sur un milieu au malonate [22].

L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions OH⁻ alcalinisant la réaction suivante



Acide malonique

II. Généralités sur les bacilles à Gram négatif non fermentaires

II.1. Classification

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires regroupent plusieurs familles et genres de bactéries mobiles ou immobiles, se cultivant sur milieux ordinaires et possédant un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminal d'électron) [11].

Ces bacilles à métabolisme oxydatif ne fermentent pas les sucres en anaérobiose et sont donc qualifiés de « non fermentants » ou « non fermentaires ».

Avec l'apport de techniques moléculaires, les bacilles à Gram négatif non fermentaires ont fait l'objet de nombreux remaniements taxonomiques à l'origine de plusieurs genres (cf. tableau II).

Tableau II: Espèces bactériennes non fermentaires rencontrées en pathologie humaine

Principaux genres	Caractères morphologiques	Caractères biochimiques
<i>Pseudomonas</i>	Ciliature polaire, présence de pigment	Oxydase+
<i>Acinetobacter</i>	Immobilés	Oxydase-
<i>Flavobacterium</i>	Immobilés, pigment jaune pâle	Oxydase+, indole+
<i>Shewanella</i>	Mobilés	Oxydase+, H ₂ S+
<i>Xanthomonas</i>	Mobilés	Oxydase+
<i>Sphingomonas</i>	Mobilés	ONPG+
<i>Moraxella ssp</i>	Immobilés, diplococcobacilles	Oxydase-, NR+
<i>Weeksella</i>	Immobilés	Oxydase+
<i>Bordetella</i>	Coccobacilles courts	Oxydase+
<i>Agrobacterium</i>	Ciliature péritriche	Oxydase+

II.2. Les caractères bactériologiques des bacilles à Gram négatif non fermentaires

II.2.1. Les caractères morphologiques

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires se présentent sous forme de bacilles longs et fins à extrémité effilée (*Pseudomonas*) mais également sous forme de diplobacilles à extrémité arrondie avec des formes coccoïdes et longues (*Acinetobacter*), pouvant être mobiles par ciliature polaire ou péritriche ou immobiles [9].

Chez certaines espèces, il y'a la présence d'une capsule (Slime) qui joue le rôle de facteur de virulence dans la survenue de l'infection.

II.2.2. Les caractères cultureux

En général, les bacilles à Gram négatif non fermentaires poussent sur milieux ordinaires comme la gélose Trypto-Caseine Soja (TCS) et la gélose Mueller Hilton entre 30°C à 37°C, avec un temps d'incubation de 48 à 72 heures.

Certaines espèces bactériennes élaborent des pigments :

- La pyocyanine, pigment bleu-vert, est caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* ;
- Des pigments allant du jaune pâle au jaune orangé peuvent être produits par diverses espèces au sein des genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Xanthomonas* [9].

II.2.3. Les caractères biochimiques

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires utilisent surtout la voie d'Etner Doudoroff mais peuvent également attaquer le glucose par la voie d'Embden Meyeroff.

Certains caractères biochimiques peuvent être recherchés en utilisant l'Api NE.

II.2.3.1. Hydrolyse de la gélatine

La gélatinase est une enzyme qui hydrolyse la gélatine en acides aminés ou en peptides. Elle se traduit par l'apparition de particules libres de charbon qui sédimentent au fond du milieu de culture. Plus tard le disque se désagrège complètement avec la formation d'un nuage noir, nettement visible [19].

II.2.3.2. Attaque de l'esculine

L'esculine est un hétéroside qui libère par hydrolyse, du glucose et de l'esculétine. L'esculétine produite lors de l'hydrolyse forme un précipité noir en présence de fer III [5].

Deuxième Partie : Etude Expérimentale

I. Objectifs de l'étude

L'objectif général de cette étude était de réduire de 12 heures à 6 heures le délai d'identification des bacilles à Gram négatif fréquemment rencontrés en pathologie humaine par microplaques CSB®.

Les objectifs spécifiques étaient :

- De réadapter l'algorithme d'identification des bacilles à Gram négatif établi au cours des années précédentes pour une lecture en 6 heures de la microplaque ;
- De réduire le temps d'incubation du test VP ;
- De réduire le temps d'incubation pour la recherche des décarboxylases.

II. Cadre d'étude

Ce travail a été effectué au niveau de l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec et au niveau du laboratoire de Bactériologie-Virologie Fondamentale et Appliquée de l'UCAD II.

III. Matériels

III.1. Souches bactériennes

Notre étude portait sur des espèces bactériennes appartenant à la famille des entérobactéries et aux genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter*.

Nous avons utilisé 9 souches dont 2 souches de contrôle :

- *Escherichia coli* 25922 ATCC
- *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC
- *Acinetobacter baumannii* (n=1)
- *Klebsiella pneumoniae* (n=2)
- *Enterobacter cloacae* (n=1)
- *Proteus mirabilis* (n=1)
- *Proteus vulgaris* (n=1)
- *Morganella morganii* (n=1)

III.2. Matériels

III.2.1. Matériels pour l'enrichissement et l'isolement

- Bec Bunsen
- Autoclave
- Anse de platine
- Etuve
- Autoclave
- Balance de précision
- Bain marie
- Eprouvettes
- Erlenmeyer
- Filtres millipores
- Tubes à essai stériles
- Four à micro-ondes
- Microscope optique
- Micropipettes
- Embouts stériles
- Plateau (inoxydable de préférence)
- Becher rempli d'eau de javel
- Emballage en plastique
- Lames porte-objet
- Lamelles
- Microplaques

III.2.2. Matériels pour la conservation des souches

- Tubes Nunc
- Tubes stériles à vis

III.2.3. Milieux pour l'enrichissement et l'isolement

- Bouillon au Thioglycolate (BT)
- Gélose Mueller Hinton (MH)
- Gélose CLED
- Gélose Mac Conkey

- Bouillon MGY

III.2.4. Réactifs de révélation

- Acide sulfanilique
- Acide alpha naphthylamine
- Alpha naphthol
- FeCl₃
- KOH
- Diméthyl-amino-4-benzaldéhyde
- Acide chlorhydrique pur
- Pentanol-1 (alcool empirique)

III.3. Milieux de culture

III. 3.1. Contrôle des milieux liquides

Un contrôle d'efficacité et de stérilité était réalisé sur chaque lot de milieu préparé.

- Contrôle de stérilité

Un millilitre de chaque milieu préparé était déposé dans des tubes à hémolyse stériles qui étaient ensuite incubés à 37° C pendant 24 heures. Les milieux étaient considérés stériles en l'absence de trouble, et en l'absence de coloration.

- Contrôle d'efficacité

Chaque lot de milieu préparé était testé avec une souche de contrôle. Lorsque la souche pousse bien sur le milieu, le test d'efficacité était positif (cf. tableau III).

Tableau III: Souches témoins utilisées pour le contrôle d'efficacité des substrats des microplaques CSB®

Tests	Témoins positifs	Témoins négatifs
ADH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
ODC	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LDC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
UREE	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
INDOLE	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
TDA	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
H ₂ S	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
NITRATE	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
VP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella</i>
ONPG	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
GLUCOSE	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
LACTOSE	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MANNITOL	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
ARABINOSE	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
SACCHAROSE	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
SORBITOL	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
RHAMNOSE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>

III.3.2. Distribution et déshydratation des milieux

III.3.2.1. Distribution des milieux

Les milieux liquides préalablement préparés (cf. annexe) étaient répartis dans les puits des microplaques, à raison de 100 µl de milieu et 10µl de sucre à 10% (cf. figures 6 et 7).

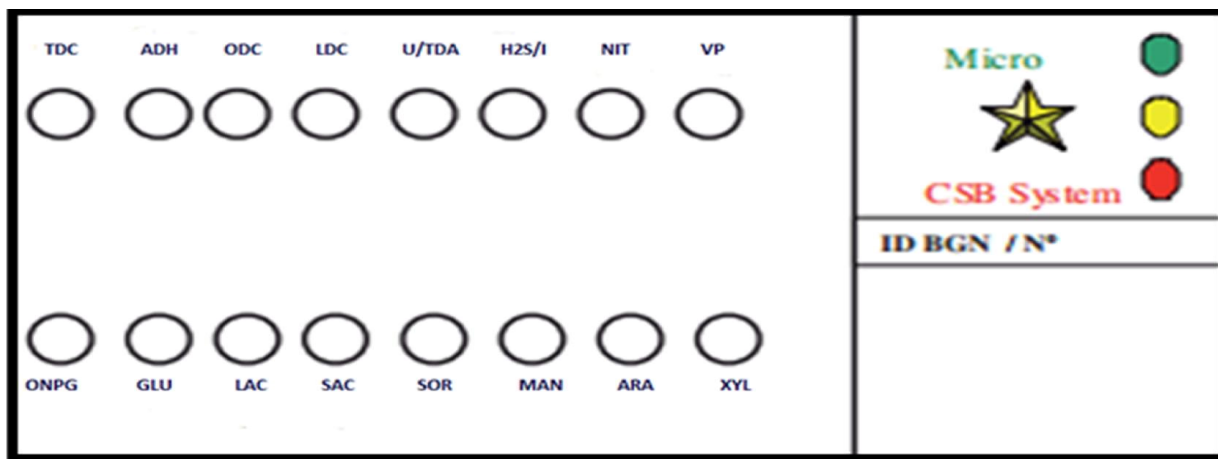


Figure 6: Disposition de la microplaque CSB® d'identification des entérobactéries

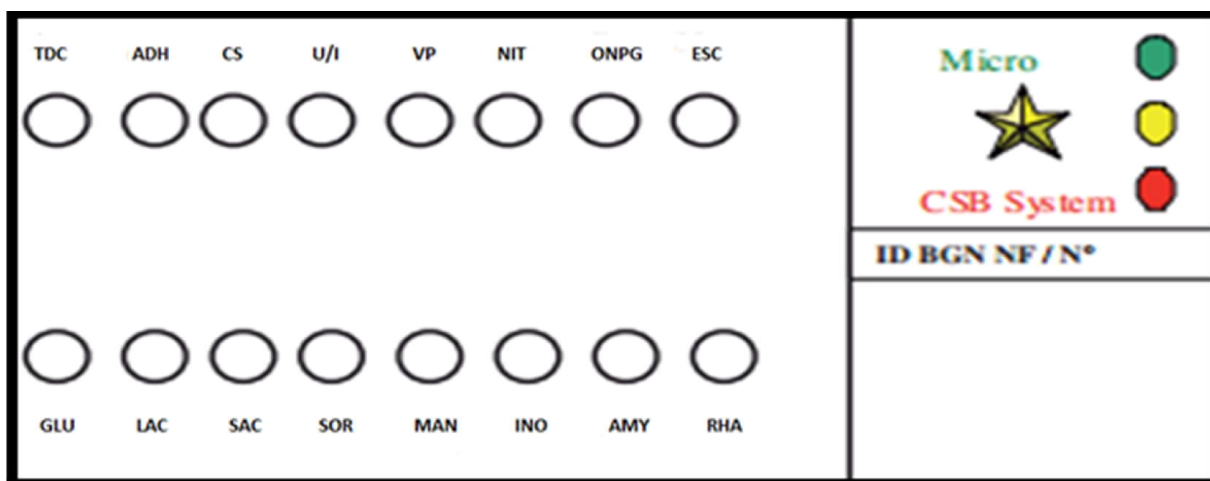


Figure 7: Disposition de la microplaque CSB® d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires

III.3.2.2. Déshydratation des milieux

Après répartition dans les microcupules, les milieux liquides étaient déshydratés à l'étuve à une température de 43°C pendant 48 heures.

III.3.3. Contrôle qualité des milieux déshydratés

Une fois qu'un lot de milieux déshydratés a été préparé, des tests de stérilité et d'efficacité étaient réalisés sur chaque lot de milieux préparés.

Le contrôle de stérilité consistait à mettre en évidence l'absence de souillures ou de contaminants sur les milieux préalablement déshydratés.

De l'eau physiologique était distribuée dans les cupules contenant TDC à ONPG (pour les entérobactéries) et TDC à ESC (pour les BGNNF), ensuite du MEVAG était distribué dans les cupules contenant GLU à RHA (aussi bien pour les entérobactéries que pour les BGNNF) (cf. tableaux IV et V).

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

TDC	ADH	ODC	LDC
Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique
U/TDA	H₂S/I	NIT	VP
Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique
ONPG	GLU	LAC	SAC
Eau physiologique	MEVAG	MEVAG	MEVAG
SOR	MAN	ARA	XYL
MEVAG	MEVAG	MEVAG	MEVAG

Tableau V: Plan de contrôle de stérilité des microplaques CSB Bacilles à Gram négatif non fermentaires

TDC	ADH	CS	U/I
Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique
VP	NIT	ONPG	ESC
Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique	Eau physiologique
GLU	LAC	SAC	SOR
MEVAG	MEVAG	MEVAG	MEVAG
MAN	INO	AMY	RHA
MEVAG	MEVAG	MEVAG	MEVAG

Le contrôle d'efficacité était identique à celui effectué pour les milieux liquides.

IV. Méthodologie

IV.1. Ré-isolément et ré-identification des souches

Nous avons réalisé un ré-isolément et une ré-identification des souches afin de vérifier la stabilité de leurs caractères biochimiques.

Le contenu des tubes Nunc conservés à -20°C a étéensemencé dans un bouillon d'enrichissement (BT) puis repiqué sur la gélose MH incubé à 37°C pendant 24 heures. Les colonies ainsi obtenues ont été réidentifiées à partir de leurs caractères cultureux, morphologiques et biochimiques.

IV.2. Modification de l'algorithme d'identification des bacilles à Gram négatif.

L'algorithme d'identification établi et validé au cours des années précédentes [15] permet d'identifier les bacilles à Gram négatif d'abord la famille, ensuite le genre (oxydase, catalase) et enfin les différentes espèces.

La coloration de Gram et la fermentation du glucose ont été des caractères clés pour classer les familles des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Cependant, chez les non fermentaires en plus du test d'oxydase, nous avons réalisé l'examen microscopique qui nous a permis de distinguer les principaux genres par leur capacité à être mobiles (polaire, pérित्रiche) et immobiles.

Le diagnostic d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques.

Ainsi, nous avons apporté quelques modifications pour adapter l'algorithme par rapport aux caractères biochimiques de la microplaque.

IV.3. Validation de l'algorithme d'identification

Après avoir élaboré un algorithme adapté à notre microplaque et identifié les différentes souches testées, il était important de valider l'algorithme par l'identification de souches.

Cette identification était basée sur la mesure de similitude entre le profil de la souche et celui des espèces apparentées à l'aide de données recueillies (tables diagnostiques).

Pour cela, nous avons utilisé les résultats établis par les fournisseurs de la galerie API 20E et API 20NE comme références.

Dans les tables diagnostiques (ou matrices de données), il est attribué pour chaque taxon, les probabilités de positivité (f) ou la probabilité de négativité ($1-f$) aux différents tests.

Si la réponse de la souche pour un test était positive, on retenait la valeur f ; si elle était négative, on retenait la valeur $1-f$ (probabilité de négativité).

Le produit des valeurs (probabilité cumulée) donnait la fréquence théorique de la souche dans l'espèce ou probabilité absolue.[18]

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

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

Probabilité absolue = f x (1 - f) x ...

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

On considère généralement les seuils suivants :

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

L'algorithme adopté a été validé en terme de probabilité en se basant sur les seuils ainsi définis.

IV.4. Etude de la réduction du temps d'incubation du VP et des décarboxylases

- Test au VP

La recherche de l'acétoïne (test de VP) se fait normalement dans un délai de 24 à 48 heures.

Nous avons préparé 3 milieux Clarks et Lubs de composition différente.

- La 1^{ère} préparation correspond au milieu standard ;
- La 2^{ème} préparation dans laquelle on a substitué le glucose par le pyruvate ;
- La 3^{ème} préparation dans laquelle on a rajouté du pyruvate en plus du glucose.

Les milieux étaient incubés au bain marie à 35°C.

Nous avons ajouté la créatine au moment de la lecture (avant les réactifs de révélation), et attendu 15 à 30 minutes pour interpréter les résultats.

- Test aux décarboxylases

La recherche des décarboxylases par le milieu de Moeller est réalisée en 2 à 3 jours. Afin d'optimiser la recherche de ces enzymes, nous avons ajouté du pyruvate dans le milieu de

culture. Sur la base de résultats de certaines recherches publiées (Brooks *et al*, 1974 ; Fay *et al*, 1972), nous avons omis le glucose et abaissé le pH à 5.

IV.5. Mode opératoire de la microplaque CSB

L'identification des bactéries a été réalisée par ensemencement des microplaques constituées de cupules contenant des substrats destinés à la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation des substrats carbonés avec l'inoculum bactérien (4 MacFarland).

Le profil des caractères biochimiques de la souche testée était lu directement (virage de l'indicateur coloré) ou après addition de réactifs de révélation.

IV.5.1. Ensemencement et incubation

- Pour les entérobactéries :

Un volume de 100 µl d'inoculum bactérien à 4 MacFarland était distribué dans les cupules allant de TDC à ONPG, puis un volume de 100µl d'un mélange MEVAG et inoculum bactérien était distribué dans les cupules de GLU à RHA.

Deux gouttes de paraffine étaient rajoutées dans les cupules destinées à la recherche des décarboxylases et des sucres afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire à ces réactions.

Les microplaques étaient ensuite incubées à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau pendant 6 heures.

- Pour les bacilles à Gram négatif non fermentaires :

Un volume de 100 µl d'inoculum bactérien à 4 MacFarland était distribué dans les cupules allant de TDC à ESC, puis un volume de 100µl d'un mélange MEVAG et inoculum bactérien était distribué dans les cupules de GLU à RHA.

Deux gouttes de paraffine étaient rajoutées dans les cupules destinées à la recherche des décarboxylases et des sucres afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire à ces réactions.

Les microplaques étaient ensuite incubées à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau pendant 6 heures.

IV.5.2. Lecture et interprétation

La lecture reposait sur le changement ou non de la coloration initiale des différents milieux soit directement ou après l'addition de réactifs de révélation.

L'interprétation des résultats était fonction de la couleur obtenue en se référant au tableau de lecture du fournisseur (cf voir tableau VI).

Tableau VI: Réactifs de révélation et lecture des caractères biochimiques

Tests	Réactifs à ajouter	Interprétation	
		Positif	Négatif
NIT	1 goutte d'acide sulfanilique 1 goutte d' α -naphtylamine poudre de zinc	Rouge bordeaux	Jaune
UREE		Rouge violacé	Jaune
VP	1 goutte de Créatine 1 goutte de VP1 1 goutte de VP2 (Lecture après 20 à 30min)	Rouge	Jaune
TDA	1 goutte de FeCl ₃	Marron	Jaune
ADH		Violet	Jaune
ODC		Violet	Jaune
LDC		Violet	Jaune
ONPG		Jaune	Incolore
IND	1 goutte de Kovacs	Anneau rouge	Anneau jaune
CS		Bleu	Vert
GLU		Jaune	Bleu vert
LAC		Jaune	Bleu vert
SAC		Jaune	Bleu vert
SOR		Jaune	Bleu vert
MAN		Jaune	Bleu vert
XYL		Jaune	Bleu vert
RHA		Jaune	Bleu vert

V. Résultats

V.1. L'identification des souches bactériennes

L'identification correcte des bactéries était basée sur un algorithme d'identification des souches que nous avons modifié comportant les caractères biochimiques essentiels (cf. figures 8, 9,10 et 11).

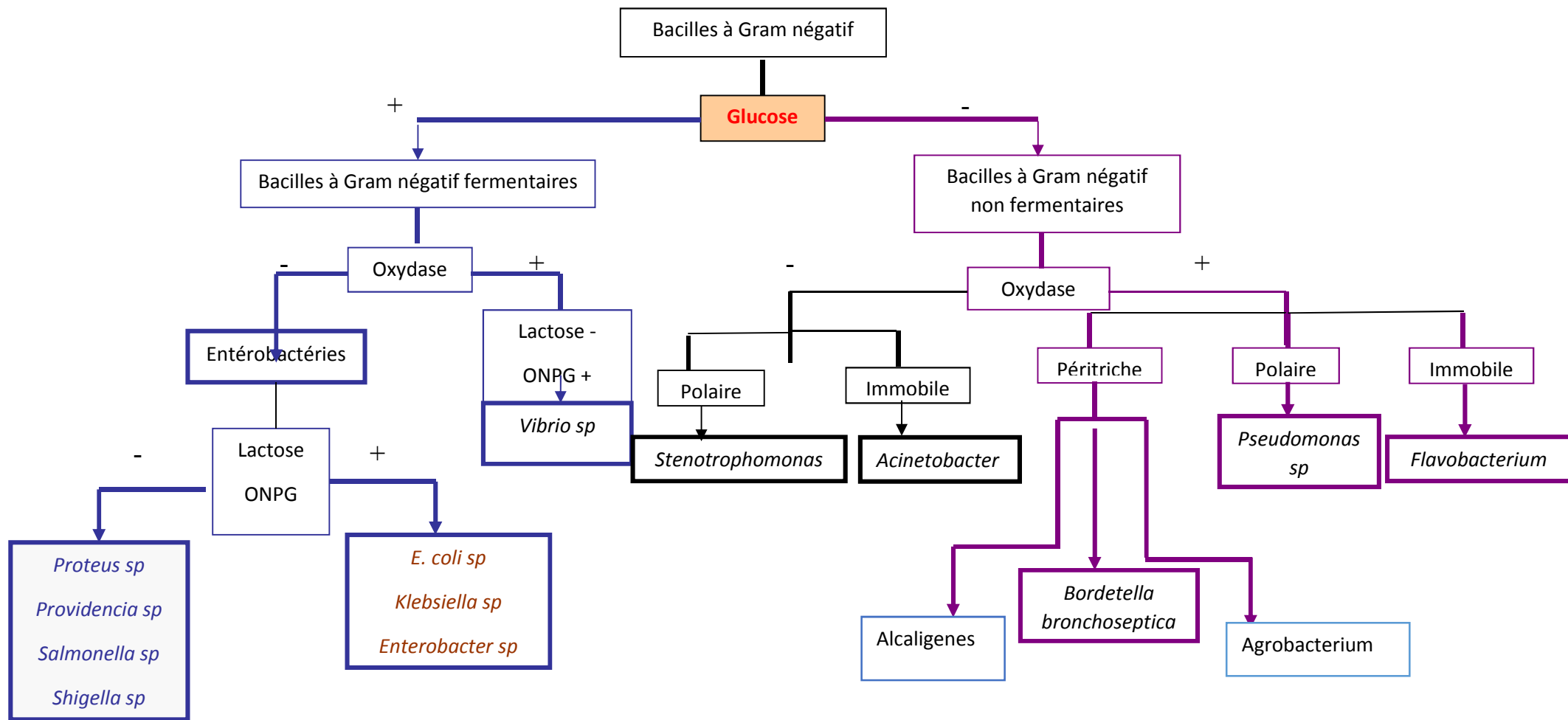


Figure 8: Algorithme d'identification des principaux bacilles à Gram négatif

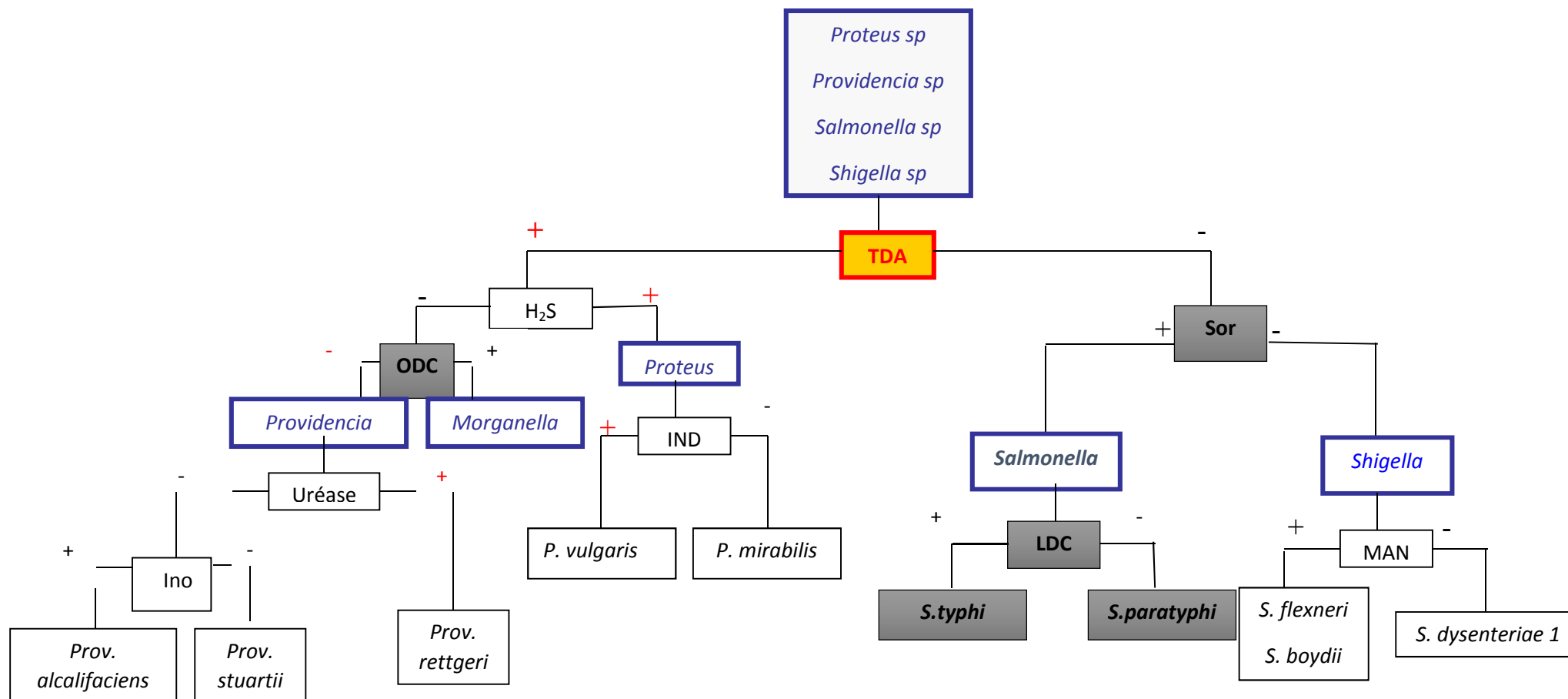



Figure 9: Algorithme d'identification des souches d'entérobactéries (1)

 Modifications apportées à l'algorithme.

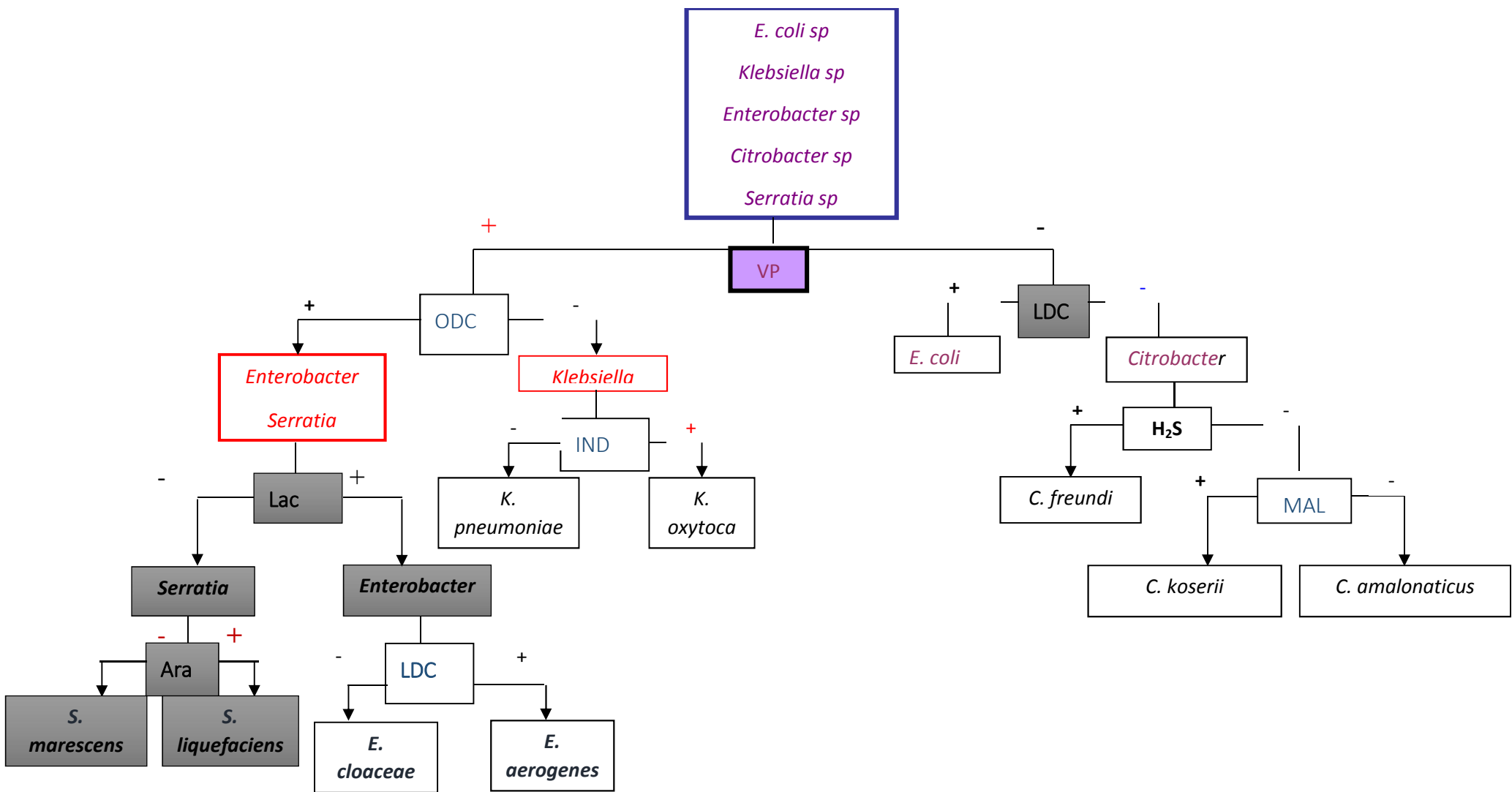


Figure 10: Algorithme d'identification des souches d'entérobactéries (2)



Modifications apportées à l'algorithme

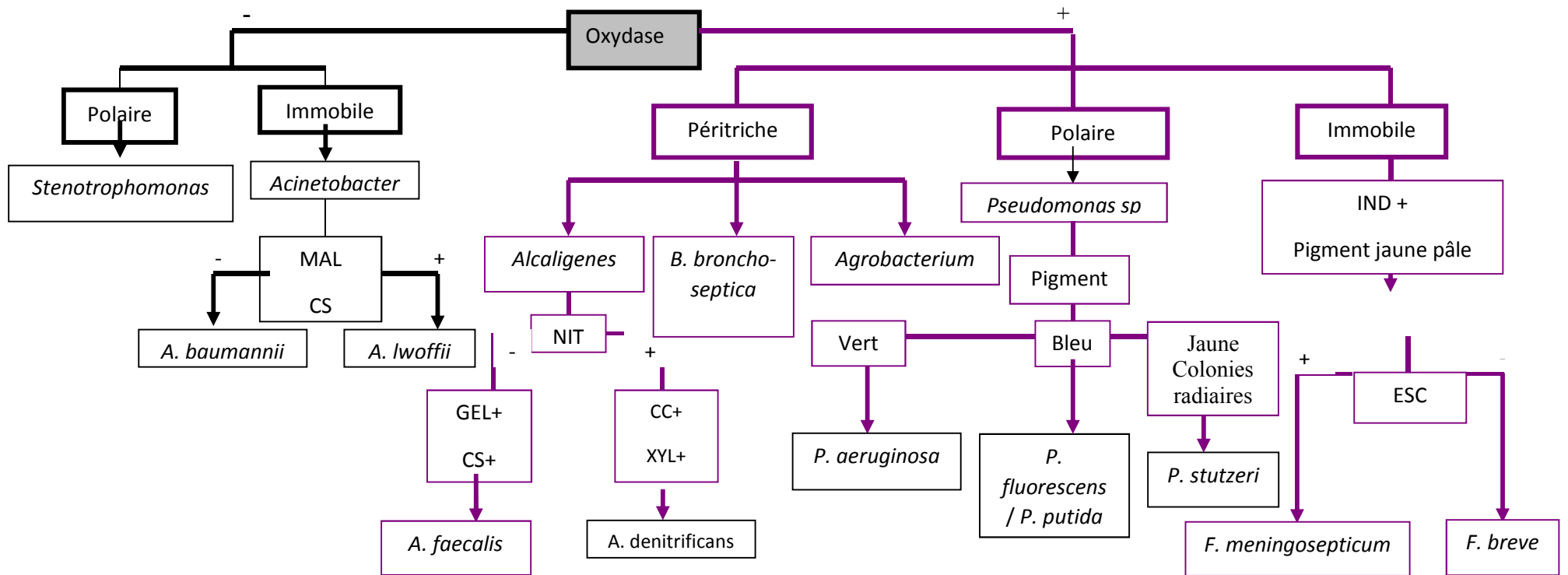


Figure 11: Algorithme d'identification des principales espèces de bacilles à Gram négatif non fermentaires

La totalité des souches testées ont pu être correctement identifiées sur la base des algorithmes établis.

- **Identification d'*Escherichia coli***

La souche X étudiée était bien identifiée à l'espèce *Escherichia coli* 1 avec une probabilité relative de 95,36% (cf. tableau VII et VIII).

Tableau VII: Profils d'une souche *Escherichia coli* probable et des espèces apparentées

Caractères d'identification	Espèces				
	Espèce à identifier	<i>E. coli</i> 2	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. coli</i> 1
Oxydase	-	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
Catalase	+	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)
ONPG	+	d(47)	+ (96)	+ (100)	+ (88)
LDC	+	d(45)	+ (99)	d(42)	+ (74)
ODC	+	d(30)	+ (100)	- (0)	+ (70)
ADH	-	- (10)	- (1)	d(64)	- (5)
VP	-	- (0)	- (3)	- (0)	- (0)
UREE	-	- (1)	- (0)	- (1)	- (2)
H ₂ S	-	- (2)	- (0)	- (0)	- (3)
IND	+	+ (77)	+ (99)	- (0)	+ (89)
TDA	-	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
GLU	+	+ (97)	+ (100)	+ (100)	+ (99)
MAN	+	+ (84)	+ (99)	+ (100)	+ (98)
MOB	+	- (5)	+ (93)	+ (100)	+ (95)

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

Tableau VIII: Probabilité d'appartenance de la souche X aux espèces apparentées

Espèce probable	Espèce X à identifier	
	PA	PR (%)
<i>E. coli 1</i>	0,337	95,36
<i>E. coli 2</i>	0,00019	0,75
<i>E. fergusonii</i>	0,0008	31,75
<i>E. vulneris</i>	0	0

PA : probabilité absolue, PB : probabilité relative

- Identification de *Klebsiella pneumoniae*

Les souches X1 et X2 étudiées étaient bien identifiées à l'espèce *K. pneumoniae* avec respectivement les probabilités relatives de 99,35% et 97,80% (cf. tableau IX et X).

Tableau IX: Profil des souches X1 et X2 à identifier et ceux des souches apparentées

Caractères d'identification	Espèces					
	Espèce X1 à identifier	Espèce X2 à identifier	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. oxytoca</i>
Oxydase	-	-	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)
Catalase	+	+	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)
ONPG	+	+	+(100)	-(25)	+(94)	+(89)
ADH	-	-	-(0)	-(0)	-(23)	-(0)
LDC	+	+	+(73)	-(2)	-(30)	+(80)
ODC	-	-	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)
Urée	+	-	+(75)	-(1)	-(1)	+(78)
Ind	-	-	-(0)	-(0)	-(0)	+(99)
VP	+	+	+(75)	-(1)	-(1)	D(44)
Glu	+	+	+(100)	+(92)	+(96)	+(100)
Man	+	+	+(90)	+(100)	+(94)	+(100)

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

Tableau X: Probabilités d'appartenances des souches X1 et X2 aux espèces apparentées

Espèce probable	Espèce X1 à identifier		Espèce X2 à identifier	
	PA	PR (%)	PA	PR (%)
<i>K. ozaenae</i>	0,00002	0,005	0,002	1,63
<i>K. pneumoniae</i>	0,37	99,35	0,12	97,80
<i>K. rhinoscleromatis</i>	0,0000005	0	0,000045	0
<i>K. oxytoca</i>	0,0024	0,64	0,0007	0,57

PA : probabilité absolue ; PR : probabilité relative

- Identification d'*Enterobacter cloacae*

La souche X étudiée était bien identifiée à l'espèce *Enterobacter cloacae* avec une probabilité relative de 99,99% (cf. tableau XI et XII).

Tableau XI: Profils de la souche X à identifier et ceux des espèces apparentées

Caractères d'identification	Espèces			
	Espèce X à identifier	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Oxydase	-	-(0)	-(0)	-(0)
Catalase	+	+(100)	+(100)	+(100)
ONPG	+	+(98)	+(100)	+(93)
ADH	+	+(75)	-(0)	-(0)
LDC	-	-(1)	D(35)	+(93)
ODC	+	+(88)	+(100)	+(98)
Urée	-	-(1)	+(95)	-(2)
Indole	-	-(0)	-(0)	-(0)
VP	+	+(85)	+(91)	+(73)
GLU	+	+(100)	+(100)	+(99)
MAN	+	+(98)	+(99)	+(99)

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

Tableau XII: Probabilité d'appartenance de la souche X aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X à identifier	
	PA	PR (%)
<i>E. cloacae</i>	0,53	99,99
<i>E. gergoviae</i>	0	0
<i>E. aerogenes</i>	0	0

PA : probabilité absolue ; PR : probabilité relative.

- **Identification de *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris***

Les souches X1 et X2 étudiées étaient bien identifiées comme appartenant respectivement à l'espèce *Proteus mirabilis* et à l'espèce *Proteus vulgaris* avec des probabilités relatives de 99,99% et de 99,96% (cf. tableau XIII et XIV)

Tableau XIII: Profils des souches X1 et X2 à identifier et ceux des souches apparentées

Caractères d'identification	Espèces				
	Espèce X1 à identifier	Espèce X2 à identifier	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. penneri</i>
Oxydase	-	-	-(0)	-(0)	-(0)
Catalase	+	+	+(100)	+(100)	+(100)
ONPG	-	-	-(0)	-(1)	-(0)
ADH	-	-	-(0)	-(1)	-(0)
LDC	-	-	-(0)	-(1)	-(0)
ODC	+	-	-(0)	+(98)	-(0)
H ₂ S	+	+	+(83)	+(83)	-(17)
UREE	+	+	+(98)	+(99)	+(100)
TDA	+	+	+(99)	+(98)	+(99)
INDOLE	-	+	+(92)	-(2)	-(0)
VP	-	-	-(0)	-(4)	-(0)
GLU	+	+	+(97)	+(96)	+(100)
MAN	-	-	-(1)	-(1)	-(0)
MOB	+	+	+(94)	+(95)	+(85)

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

Tableau XIV: Probabilités d'appartenance des souches X1 et X2 aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X1 à identifier		Espèce X2 à identifier	
	PA	PR (%)	PA	PR (%)
<i>P. mirabilis</i>	0,66	99,99	0,00027	0,04
<i>P. vulgaris</i>	0	0	0,682	99,96
<i>P. penneri</i>	0	0	0	0

PA : probabilité absolue ; PR : probabilité relative

- **Identification de *Morganella morganii***

La souche X étudiée était bien identifiée à l'espèce *Morganella morganii* avec une probabilité relative de 99,62% (cf. tableau XV et XVI)

Tableau XV: Profils de la souche X et des espèces apparentées

Caractères d'identification	Espèces				
	Espèce X à identifier	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. penneri</i>	<i>Morganella morganii</i>
Oxydase	-	-(0)	-(0)	-(0)	-(1)
Catalase	+	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)
ONPG	-	-(1)	-(0)	-(0)	-(1)
ADH	-	-(1)	-(0)	-(0)	-(1)
LDC	-	-(1)	-(0)	-(0)	-(5)
ODC	+	+(98)	-(0)	-(0)	+(98)
H ₂ S	-	+(83)	+(83)	-(17)	-(1)
UREE	+	+(99)	+(98)	+(100)	+(99)
TDA	+	+(98)	+(99)	+(99)	+(91)
INDOLE	+	-(2)	+(92)	-(0)	+(97)
VP	-	-(4)	-(0)	-(0)	-(0)
GLU	+	+(96)	+(97)	+(100)	+(97)
MAN	-	-(1)	-(1)	-(0)	-(1)
MOB	+	+(95)	+(94)	+(85)	-(95)

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

Tableau XVI: Probabilité d'appartenance de la souche X aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X à identifier	
	PA	PR (%)
<i>P. mirabilis</i>	0,0027	0,37
<i>P. vulgaris</i>	0	0
<i>Morganella morganii</i>	0,72	99,62

- **Identification de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.***

Les souches X1 et X2 étudiées étaient bien identifiées comme appartenant respectivement aux espèces *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp* avec des probabilités relatives de 99,99% et de 99,95% (cf. tableau XVII et XVIII).

Tableau XVII: Profils des souches X1 et X2 et des espèces apparentées

Caractères d'identification	Espèces				
	Espèce X1 à identifier	Espèce X2 à identifier	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Acinetobacter ssp</i>
Oxydase	+	-	+(97)	+(97)	-(0)
Catalase	-	-	-(0)	-(0)	-(0)
ONPG	-	-	-(0)	-(0)	-(0)
ADH	+	-	+(87)	+(74)	-(0)
CS	+	+	+(92)	d(68)	d(48)
UREE	-	-	d(35)	-(1)	-(1)
GLU	+	+	d(57)	d(41)	d(60)
NIT	+	-	d(56)	-(0)	-(0)
MOB	+	-	+(97)	+(100)	-(0)

+ = (f) ; - = (1-f) ; d=26 à 70% des souches l'expriment

Tableau XVIII: Probabilités d'appartenance des souches X1 et X2 aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X1 à identifier		Espèce X2 à identifier	
	PA	PR (%)	PA	PR (%)
<i>P. aeruginosa</i>	0,156	99,99	0,00002	0
<i>P. fluorescens/putida</i>	0	0	0	0
<i>Acinetobacter spp</i>	0	0	0,285	99,95

PA : probabilité absolue ; PR : probabilité relative.

V.2. Résultats de la réduction du temps de lecture des tests VP et décarboxylases

- Test au VP

Les souches testées avec les deux premières préparations avaient toutes donné des résultats négatifs en 6 heures pour le Clarks et Lubs.

La 3^{ème} préparation a permis de faire la lecture du VP en 6 heures (cf. tableau XXI).

- Test des décarboxylases

La recherche des décarboxylases par le milieu de Moeller avec et sans pyruvate avait donné des résultats négatifs pour toutes les souches testées en 6 heures.

Le test aux décarboxylases à partir du milieu sans glucose et à pH=5 a permis une lecture en 6 heures des souches testées (cf. tableau XIX).

Tableau XIX: Résultats attendus et obtenus des différentes espèces testées

Tests Espèce bactérienne	Test de VP		Test des décarboxylases					
	VP Témoin	VP obtenu	ADH Témoin	ADH obtenu	ODC Témoin	ODC obtenu	LDC Témoin	LDC obtenu
<i>Escherichia coli</i>	VP-	VP-	-	+	d	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VP+	VP+	-	-	-	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	VP+	VP+	+	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	VP+	VP+	-	-	+	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	VP-	VP-	-	-	+	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	VP-	VP-	-	-	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	VP-	VP-	-	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VP-	VP-	+	+	-	-	-	-
<i>Acinetobacter spp</i>	VP-	VP-	-	-	-	-	-	-

Caractères (-) : 0-25% des souches l'expriment ;

Caractères (+) : 71-90% des souches l'expriment ;

Caractères (d) : 26-70% des souches l'expriment.

Les souches testées (n=12) pour la recherche de l'acétoïne et des décarboxylases avaient donné les résultats attendus au bout de 6 heures.

Les paramètres biochimiques (urée-indole, tryptophanase désaminase, H₂S, nitrate réductase, sucres) peuvent être lus en 6 heures sans aucune modification.

L'urée peut être lue en moins d'une heure pour les *Proteus* et la nitrate réductase en moins de 4 heures pour les entérobactéries et les non fermentaires.

Les paramètres biochimiques (citrate de Simmons, citrate de Christensen, malonate, gélatine) n'ont pas été étudiés car la lecture se fait au-delà de 6 heures.

VI. Discussion

Cette étude fondamentale sur la réduction du temps d'incubation des microplaques CSB® en 6 heures pour identifier les bacilles à Gram négatif (entérobactéries et non fermentaires) a été réalisée sur 11 souches isolées sur des produits pathologiques. Deux souches de contrôle (*Escherichia coli* 25922ATCC et *Pseudomonas aeruginosa* 27853ATCC) ont permis de valider notre méthode (technique) et nos résultats.

L'objectif de réaliser une identification des bacilles à Gram négatif à l'aide des microplaques CSB® a été atteint avec cependant des modifications apportées pour certains tests.

Ainsi le test du VP a été modifié par ajout du pyruvate (même quantité que celle du glucose) mais aussi de la créatine juste avant d'amorcer les tests de révélation.

De ce fait, le VP pouvait être lu en 6 heures avec les microplaques CSB® pour identifier les bacilles à Gram négatif.

Il en est de même pour les tests aux décarboxylases pour lesquels le glucose n'a pas été ajouté, cependant le milieu a été acidifié à pH=5 avec du HCl. Ces modifications ont permis une lecture des décarboxylases en moins de 6 heures avec les microplaques CSB®.

Cette réduction du temps d'incubation pour déterminer l'activité des décarboxylases a été proposée depuis les années 1970 [3,8].

L'avènement des automates d'identification pourrait expliquer le non intérêt d'appliquer cette réduction du temps d'incubation pour déterminer l'activité des décarboxylases sur les galeries classiques utilisées au laboratoire.

Certains tests (Urée, Indole, TDA, Sucres, Nitrate réductase) pouvaient être lus en moins de 6 heures (donc nécessitent une vigilance accrue du technicien pour une bonne lecture de ces différents paramètres biochimiques).

Ainsi l'urée pourrait être lue entre 30 minutes (*Proteus*, *Morganella*) et 2 heures (*Klebsiella*) ; la NR, les sucres et la TDA pourront être lus en 4 heures.

Ainsi, à partir des résultats obtenus, il est possible d'identifier les bacilles à Gram négatif (entérobactéries et non fermentaires) isolés en routine sur des produits pathologiques après 6 heures d'incubation sur microplaques CSB®.

La totalité des souches utilisées durant notre étude ont montré une probabilité relative d'identification supérieure à 90% comparable aux taux obtenus avec les galeries API 20E.

Pour mener à bien cette identification des bacilles à Gram négatif avec les microplaques CSB® nous avons travaillé avec un inoculum de 4 MacFarland. L'utilisation de cet inoculum a été validée par les travaux D'Erneville [6].

Au vu de ces résultats, il serait intéressant de réaliser cette étude sur un grand nombre de souches afin de déterminer la sensibilité des tests en comparaison avec ceux existant sur le marché.

L'utilisation des microplaques CSB® pour identifier les bacilles à Gram négatif en 6 heures doit requérir une grande vigilance du technicien pour une lecture des paramètres biochimiques au moment opportun.

En outre, le biologiste doit faire preuve d'ouverture d'esprit afin d'utiliser ces nouvelles méthodes permettant une lecture plus rapide des caractères biochimiques. Ceci implique des résultats rapides et donc une meilleure prise en charge du patient.

Enfin, le respect des bonnes pratiques de fabrication des microplaques ainsi qu'un respect strict des conditions de conservation permettront de réaliser les tests sur des kits stables pour donner les caractères biochimiques de la souche testée.

Conclusion

Cette étude portant sur la réduction du délai d'identification des bacilles à Gram négatif par microplaques CSB® a permis de montrer une identification correcte de la totalité des souches étudiées dans un délai court.

Les 11 souches analysées durant cette étude ont pu être correctement identifiées avec une probabilité relative supérieure à 90% au bout de 6 heures d'incubation.

Afin d'obtenir une lecture des caractères biochimiques en temps voulu, il était nécessaire de modifier le milieu du test de VP et celui des décarboxylases.

Les caractères biochimiques Urée, Indole, TDA, Sucres, Nitrate réductase pouvaient être lus en moins de 6 heures et nécessitent une surveillance régulière de la part du technicien pour une bonne lecture.

Nos résultats montrent qu'il est possible d'identifier les bacilles à Gram négatif fréquemment rencontrés en pathologie humaine par microplaques CSB® après 6 heures d'incubation.

Les limites de ces microplaques résident d'abord dans le fait qu'elles ne permettent pas l'identification des bacilles à Gram négatif exigeants (*Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*), ensuite sur l'instabilité de certains tests (décarboxylases, sucre) au bout de 24 heures et enfin sur le nombre de souches limitées avec lesquelles les microplaques CSB® ont été testées.

Dans le but d'une identification rapide et donc une meilleure prise en charge de travail, le technicien doit respecter les conditions d'utilisation et de conservation des microplaques, mais aussi l'utilisation d'un inoculum lourd.

Une étude portant sur un grand nombre de souches permettra d'améliorer l'identification des bacilles à Gram négatif à partir des microplaques CSB®.

Références bibliographiques

- 1- **Atlas R.M.**, Microbiological media for the examination of food, Second edition, CRC Press, London New York, 2006, 446p.
- 2- **Bamler D., Ma B., Reed J.T., Perna N.T.**, Inferring ancient metabolism using ancestral core metabolic models of enterobacteria. *BMC Syst Biol.* 2013; 7: 46.,. doi: [10.1186/1752-0509-7-46](https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-46)
- 3- **BROOKS K., SODEMAN T.** A rapid method for determining decarboxylase and dihydrolase activity. *J.Clin Path.* 1974, 27, pp148-152.
- 4- **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R.**, Bactériologie Médicale : Techniques usuelles, Elsevier Masson, 2007, 460p.
- 5- **Delarras C.**, Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures, Lavoisier, Paris, 2014,772p.
- 6- **D’Erneville Marie Madeleine**, Etude de l’effet de l’inoculum et du temps d’incubation sur l’identification des bacilles à Gram négatif, Thèse de pharmacie n°106, Université Cheikh Anta Diop, Juillet 2008.
- 7- **Diop Ramatou**, Standardisation et optimization d’une microméthode d’identification des bacilles à Gram négatif, Thèse de pharmacie n°75, Université Cheikh Anta Diop, 2001.
- 8- **Fay G.D., Barry A.L.**, Rapid ornithine decarboxylase test for identification of Enterobacteriaceae, *Applied Microbiology*, 1972 April, 710-713.
- 9- **Freney J., Renaud F., Leclercq R., Riegel P.**, Précis de Bactériologie Clinique, 2ème édition, Edition ESKA, Paris, 2007, 1764p.
- 10- **Goldman E., Green L.H.**, Pratical handbook of Microbiology, Second edition, CRC Press, New York, 2009, 874p.
- 11- **Hart T., Shears P.**, Atlas de poche de microbiologie, Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1997, 314p.
- 12- **Hussain Qadri S.M., Nichols C.W., Qadri S.G.M., et al**, Rapid test for acetyl-methyl-carbinol formation by Enterobacteriaceae, *J Clin Microbiol.* 1978 Oct, 463-464.
- 13- **Miller J.M and O’Hara M.C.**, Substrate Utilisation Systems for the identification of Bacteria and yeasts. *A.S.M* 1998, 6^{ème} édition, 10, 103-109.

- 14- M.O'Hara C., et Miller J. M.,** Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB Assay for Identification of Members of the Family *Enterobacteriaceae* and Other Nonenteric Gram-Negative Bacilli and Comparison with the Vitek GNI+ Card, *J Clin Microbiol.* Mai 2003; 41(5): 2096–2101
- 15- Ndoye Rokhaya,** Algorithmes d'identification des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires, Thèse de pharmacie n°83, Université Cheikh Anta Diop, Juillet 2004.
- 16- Norris J.R., Ribbons D.W.,** Methods in Microbiology, Volume 6A, Elsevier, Academic Press, London and New York, 1971, 593p.
- 17- Overman T.L., Plumley D., Overman S.B., et al,** Comparison of the API rapid E four-hour system with the API 20E overnight system for the identification of routine clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae*, *J Clin Microbiol.* Avril 1985 ; 21(4): pp542–545.
- 18-Pina G., Raynaud D.,** Critères de choix d'une méthode d'identification, *DES Bactériologie-Virologie*, 2003 : 1-27.
- 19- Prescott L.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J., Willey J.M., Harley, Klein,** Microbiologie, 3^{ème} édition, Deboeck, Paris, 2010, 1216p.
- 20- Look for diagnostics,** Glycolyse,
http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Glycolyse&lang=4, page consultée le 24Avril 2015
- 21-Université d'Angers,** La voie des pentoses phosphates, <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/1PentosePhosphate/1PentosePhosphate.htm>, page consultée le 5 Novembre 2015
- 22- Microbiologie médicale,** Milieu au malonate, disponible sur <http://www.microbiologie-medicale.fr/metabolisme/malonate.htm> , page consultée le 4 Septembre 2015
- 23- Wikipédia,** Entner Doudoroff pathway,
http://en.wikipedia.org/wiki/Entner%E2%80%93Doudoroff_pathway#/media/File:Entner%E2%80%93Doudoroff_pathway.svg, page consultée le 24 Avril 2015.
- 24- Wikipédia,** Voies fermentaires des entérobactéries,
http://fr.wikipedia.org/wiki/Voies_fermentaires_des_ent%C3%A9robact%C3%A9ries, page consultée le 24 Avril 2015.

Annexes

Milieu Urée-Tryptophane

Pour un volume de 100ml :

Eléments constitutifs.	Quantité (g)	Rôle
Phosphate monopotassique	0,05	Source de sels minéraux. Léger effet tampon.
Phosphate dipotassique	0,05	Source de sels minéraux. Léger effet tampon.
NaCl	0,25	Maintien de la pression osmotique favorisant l'isotonie qui permet l'éclatement des cellules et la libération des enzymes.
Alcool à 95%	0,5ml	Facilite la libération des enzymes.
L-tryptophane	0,15	Permet la recherche de l'indole et de la TDA.
Urée	1	Substrat de l'uréase
Rouge phénol à 1%	0,125ml	Indicateur de pH

La stérilisation se fait par filtration.

Réactif de Kovacs

- Diméthyl-amino-4-benzaldéhyde 5g
- Acide chlorhydrique pur 25ml
- Pentanol-1 (alcool empirique) 75ml

Dissolution du benzaldéhyde dans l'alcool au bain marie à 60°C.

Mettre le flacon dans la glace. Ajouter goutte à goutte l'acide en maintenant le flacon dans la glace. Mettre le produit fini dans un flacon et conserver à +4°C.

Réactif de TDA/PDA

- 30ml de perchlorure de Fer officinal
- Ajouter 60ml d'eau distillée

Bien homogénéiser et conserver à + 4°C à l'abri de la lumière.

Bouillon nitrate

Pour un volume de 100ml :

Eléments constitutifs	Quantité (g)	Rôle
Bouillon nutritif	0,8	Apporte les facteurs de croissance, vitamines et acides aminés
Nitrate de potassium	0,1	Apporte le Nitrate essentiel à la recherche de l'enzyme

Autoclaver pendant 15minutes à 121°C.

GRIESS I

- Acide acétique 5N 50ml
- Acide sulfanilique 0,4g

Bien agiter jusqu'à dissolution complète puis conserver à +4°C à l'abri de la lumière.

GRIESS II

- Acide acétique 5N 50ml
- A naphtylamine 0,3g

Bien agiter jusqu'à dissolution complète puis conserver à +4°C à l'abri de la lumière.

Milieu de Clark et Lubs (milieu standard).

Pour un volume de 100ml :

Eléments constitutifs	Quantité (g)	Rôle
Peptone tryptique	0,7	Source d'azote, d'acides aminés, de carbone et éventuellement d'énergie
Glucose	0,5	Source de carbone et d'énergie
Phosphate bipotassique	0,5	Effet tampon et source d'ions phosphate et potassium

Autoclaver pendant 15minutes à 121°C

Milieu Clark et Lubs (2^{ème} préparation : substitution du glucose par le pyruvate)

Pour un volume de 100ml :

Eléments constitutifs	Quantité (g)	Rôle
Peptone tryptique	0,7	Source d'azote, d'acides aminés, de carbone et éventuellement d'énergie
Pyruvate	1	Source de carbone et d'énergie
Phosphate bipotassique	0,5	Effet tampon et source d'ions phosphate et potassium

Autoclaver pendant 15minutes à 121°C

Milieu Clark et Lubs (3^{ème} préparation : ajout du pyruvate)

Pour un volume de 100ml :

Eléments constitutifs	Quantité (g)	Rôle
Peptone tryptique	0,7	Source d'azote, d'acides aminés, de carbone et éventuellement d'énergie
Glucose	0,5	Source de carbone et d'énergie
Pyruvate	0,5	Source de carbone et d'énergie
Phosphate bipotassique	0,5	Effet tampon et source d'ions phosphate et potassium

Autoclaver pendant 15minutes à 121°C

Réactifs de révélation

VP1 :

- Alpha-naphtol 6g
- Ethanol 100ml

Dissoudre l'alpha-naphtol dans les 100ml d'éthanol. Bien agiter jusqu'à dissolution complète et conserver à l'obscurité à +4°C.

VP2 :

- Hydroxyde de potassium 40g
- Créatine 300mg

Dissoudre les masses pesées dans 100ml d'eau distillée. Bien agiter jusqu'à dissolution complète et conserver à +4°C à l'obscurité.

Milieu de recherche des décarboxylases.

Pour un volume de 100ml :

Eléments constitutifs.	Quantité (g)	Rôle
Base de Moeller	1,05	Source de facteurs de croissance
Acide aminé	1	Recherche de l'enzyme
Pyruvate	0,05	Source de carbone et d'énergie initiale

Le pH est ajusté à 6 puis la stérilisation se fait par autoclavage.

Milieu de recherche des décarboxylases (formule validée par des chercheurs)

Pour un volume de 100ml :

Eléments constitutifs	Quantité (g)	Rôle
Peptone	0,5	Source d'azote, d'acides aminés, de carbone et éventuellement d'énergie
Extrait de levure	0,3	Source de facteurs de croissance
0,2% de pourpre de bromocrésol	0,5ml	Indicateur coloré
Acide amine (lysine, ornithine, arginine)	1	Recherche de l'enzyme

Le pH est ajusté à 5,5 avec du HCl puis l'autoclavage se fait à 121°C pendant 15 minutes.

Recherche de l'ONPG.

- Poudre d'ONPG 0,3g
- Eau distillée 100ml

Autoclavez l'eau distillée à 121°C pendant 15min. Dans des conditions stériles introduire 0,3g de la poudre. Bien agiter jusqu'à dissolution complète.

Bouillon au citrate de Simmons

Pour un volume de 100ml :

Éléments constitutifs.	Quantité (g)	Rôle
Citrate de sodium.	0,2	Seule source de carbone et d'énergie du milieu.
Sulfate de magnésium.	0,02	Source d'ions sulfate et magnésium.
Hydrogénophosphate de potassium.	0,1	Source d'ions phosphate et potassium.
Dihydrogénophosphate d'ammonium.	0,1	Source d'ions phosphate et d'azote.
Chlorure de sodium	0,5	Maintient de la pression osmotique.
Bleu de bromothymol	800µl	Indicateur coloré de pH.

Ajuster le pH à 7 puis autoclavez à 121°C pendant 15min.

Milieu d'étude des sucres.

Glucides	Stérilisation
Glucose 10%	Autoclavage
Lactose 10%	Tyndallisation
Saccharose 10%	Tyndallisation
Arabinose 10%	Autoclavage
Mannitol 10%	Autoclavage
Sorbitol 10%	Autoclavage
Xylose 10%	Autoclavage

MEVAG

- Bouillon de base 1,6g
- Eau distillée 100ml

Autoclavez pendant 15min à 121°C.