

## **Introduction**

Les nombreuses études portant sur les bacilles à gram négatif non fermentaires s'expliquent par la difficulté de leur identification et par leur place en pathologie infectieuse humaine et vétérinaire, tant par leur fréquence que par la gravité des infections dont ils sont responsables.

Leur taxonomie, en perpétuelle modification a permis d'individualiser un certain nombre de genre dont les plus fréquents en pathologie humaine sont : Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Alteromonas, Alcaligenes.

Les espèces sont surtout rencontrées dans des prélèvements effectués chez des malades aux systèmes de défense déficients (immunodéprimés, greffés, cancéreux, brûlés, leucémiques ...) patients de services de réanimation ou de soins intensifs autrefois condamnés.

Leur émergence résulte de leur multirésistance aux antibiotiques, de la difficulté de leur isolement, de leur identification et éventuellement de leur sensibilité ou leur résistance aux antibiotiques qui causent de nombreux problèmes.

L'utilisation de galeries miniaturisées prêtes à l'emploi, ont permis l'identification des bacilles à gram négatif non fermentaires qui occupent une place de choix en pathologie humaine.

Le but de ce travail est de mettre au point une microméthode permettant, une identification facile, rapide de ces bacilles à gram négatif non fermentaires qui sera à moindre coût, et accessible à toutes les populations surtout nos pays sous-développés.

## I- TAXONOMIE

Les bacilles à gram négatif non fermentaires sont aérobies stricts, de culture facile et forment un groupe de bactéries très souvent oxydase positif. Ils sont à l'heure actuelle mieux classés grâce à de nombreuses études génétiques ADN – ADN ou ARN – ADN [11] ce qui conduit à l'invention de nouveaux genres.

Nous pouvons distinguer un certain nombre de genres [8]:

- Pseudomonas
- Burkholderia
- Ralstonia
- Comamonas
- Brevundimonas
- Sphingomonas
- Stenotrophomonas
- Chryseomonas
- Flavimonas
- Shewanella
- Acinetobacter
- Chryseobacterium
- Flavobacterium
- Sphingobacterium
- Weeksella
- Alcaligenes
- Agrobacterium
- Ochrobactrum

## **II- CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES**

Les bacilles à gram négatif non fermentaires sont aérobies stricts. Ils occupent une place importante dans le monde bactérien et doivent être différenciés des autres bacilles à gram négatif à l'aide de quelques caractères tels que :

- Le métabolisme du glucose
- La réaction d'oxydase
- La ciliature

En général, les bacilles à gram négatif non fermentaires croissent sur des milieux simples, comme la gélose trypto-caseine soja (TSA) et la gélose lactosée de Drigalski, à 30°C et souvent à 37°C avec un temps d'incubation de 48 à 72 h pour que les colonies soient repiquables.

### **II- 1. La Ciliature**

L'examen au microscope optique, de cultures jeunes en milieu liquide, permet de voir les bactéries vivantes.

Cet examen permet d'observer :

- la taille
- la morphologie
- la mobilité et éventuellement la nature de leur ciliature.

Cette ciliature peut être :

- péritriche : nombreux flagelles autour du corps bactérien (ciliature caractéristique des enterobacteriaceae mobiles)

- péritriche de type dégénéré : présence de 4, 3, 2 ou même un seul flagelle, mais à insertion non polaire (ciliature caractéristiques des Alcaligenes)
- polaire de type monotriche ou multitriche : respectivement à un seul flagelle (Ex : *Pseudomonas aeruginosa*) ou 2 – 4 flagelles (Ex : *Burkholderia cepacia*).

## **II- 2. Réaction d'oxydase**

Elles sont recherchées sur des cultures en milieu gélose exempt de sucres fermentescibles ou de sang : gélose nutritif TSA, gélose MH.

Cette réaction peut se faire soit à l'aide :

- de bandelettes de papier filtre imbibées d'une solution aqueuse à 1% d'oxalate de N- dimethyl paraphenylène diamine préparée extemporainement.
- des disques prêts à l'emploi du commerce imprégnés de réactif et conservés à 4°C. Ces disques sont imbibés avant la recherche d'une goutte d'eau distillée ou physiologique.

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violet-noir, soit immédiatement, soit quelques secondes. La lecture est limitée à 30s.

*Pseudomonas aeruginosa* (test instantanément +)

*Burkholderia cepacia* (test + après 20 à 30 secondes)

*Acinetobacter* ou *Enterobacteriaceae* (test -)

## II 3. Détermination du type respiratoire

Ce sont des bactéries aérobies strictes, c'est-à-dire qui ne poussent en présence d'oxygène de l'air.

Elles respirent en aérobiose par phosphorylation oxydative.

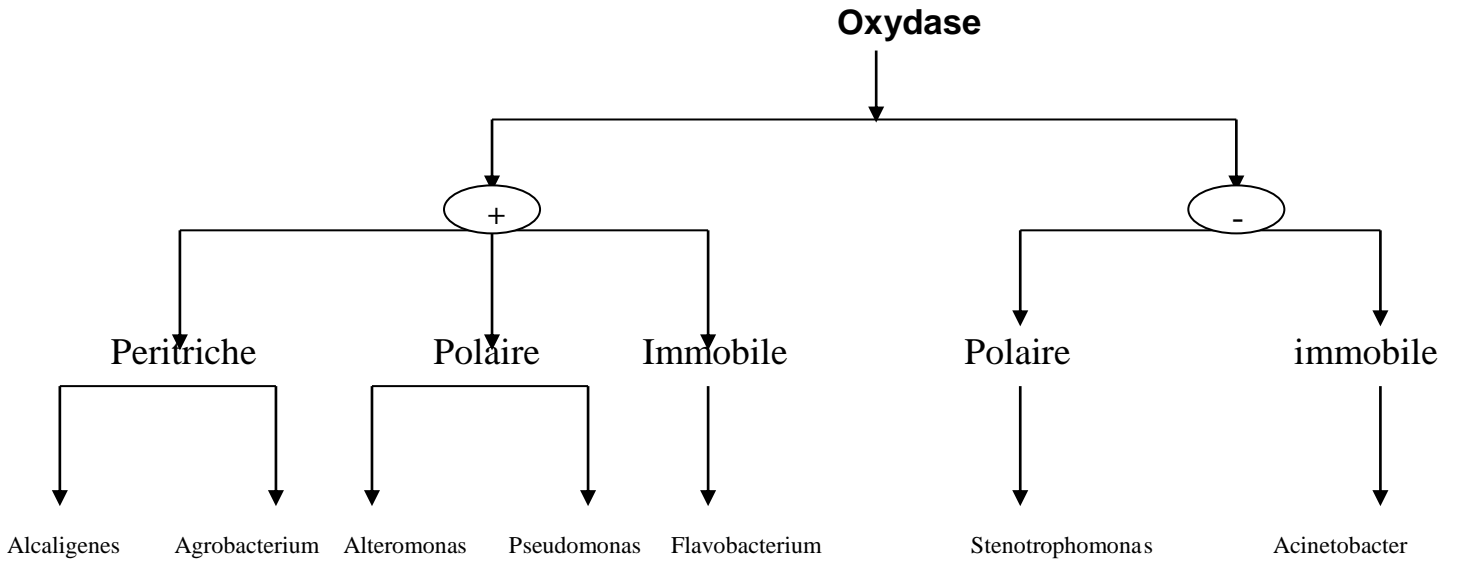
En anaérobiose, ces espèces sont capables de croître, réduisant des accepteurs minéraux autre que l'oxygène comme les nitrates (respiration anaérobie des nitrates ou dénitrification par *Pseudomonas aeruginosa*, *P.stutzeri*...).

Ces bactéries ne fermentent jamais le glucose mais peuvent l'attaquer par voie oxydative ou bien être inactifs vis-à-vis de ce sucre.

**Tableau 1 : Caractères de quelques genres de bacilles à gram négatif non fermentaires**

	<b>Métabolisme du glucose</b>	<b>Réaction d'oxydase</b>	<b>Ciliature</b>
<b>Pseudomonas</b>	Oxydatif	[+]	[polaire]
<b>Stenotrophomonas</b>	Oxydatif	-	Polaire
<b>Alcaligenes</b>	Oxydatif ou Inactif	+	Péritriche degenerate
<b>Agrobacterium</b>	Oxydatif	+	Immobile
<b>Acinetobacter</b>	Oxydatif ou Inactif	-	immobile

[ ] : la majorité possède le caractère indiqué



**Algorithme des principaux genres**

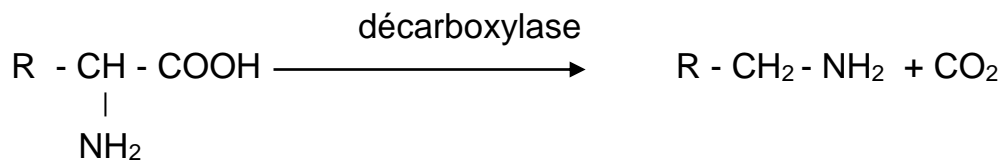
## II-4. Caractères biochimiques

### II-4-1. Métabolisme glucidique

Comme voie métabolique, les bacilles à gram négatif non fermentaires utilisent surtout la voie d'Enter - Doudoroff mais peuvent également attaquer le glucose par la voie d'Embden meyerhof.

### II.4.2. Utilisation des décarboxylases :

Les décarboxylases ( LDC, ODC, ADH ) scindent les acides aminés entraînant la formation de l'acide correspondant et la libération de CO<sub>2</sub> suivant la réaction :



Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide ( pH optimum 3,5 à 5,5).

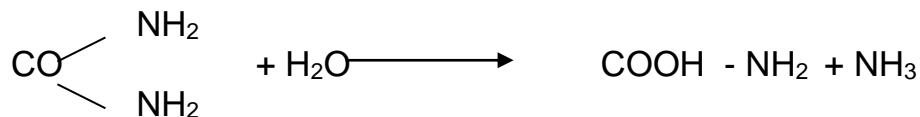
Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré ( rouge de phénol ) et de l'acide aminé.

L'alcalinité, due à l'amine entraîne ensuite le virage de l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement.

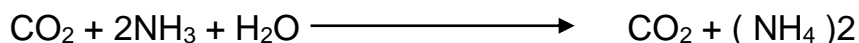
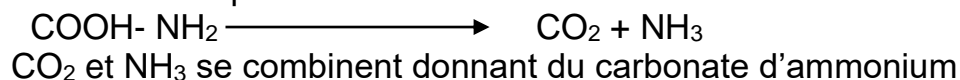
Si la bactérie ne possède pas de décarboxylases, le milieu reste acide donc jaune.

### II .4.3 . Utilisation de l'uréase :

Les bactéries hydrolysent l'urée selon la réaction suivante :



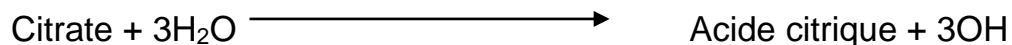
Si la bacterie possede une uréase très active la réaction aboutit finalement :



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

#### II-4-4 L'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 ).



#### II- 4-5 Utilisation du citrate de Christensen ( CC )

A la différence du milieu au citrate de Simmons, ce milieu contient une faible quantité de glucose et 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 hydroxyle alcalinise le milieu ( virage du jaune au rose ).

#### II- 4-6 Attaque de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine rompt la liaison glucosidique et libère du glucose et de l'esculétine qui donne une coloration noire .

#### II- 4-7 Hydrolyse de la gélatine

Elle se traduit par l'apparition de particules libres de charbon qui sédimentent au fond du milieu de culture puis, plus tard le disque se désagrège complètement avec formation d'un nuage noir, nettement visible.

#### II- 4-8 Réduction des nitrates

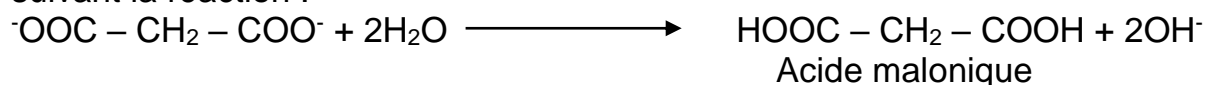
L'étude de la réduction des nitrates se fera par la mise en évidence des nitrites formées.

Ces dernières en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose en présence d'acide sulfanilique et d'alphannaphtylamine (Reaction de Griess).

#### II-4-9 : Utilisation du malonate

Le malonate inhibe le cycle de Krebs (inhibition de la succinate deshydrogénase). Seules les bactéries qui peuvent utiliser le cycle glyoxylique sont capables de pousser sur le milieu au malonate.

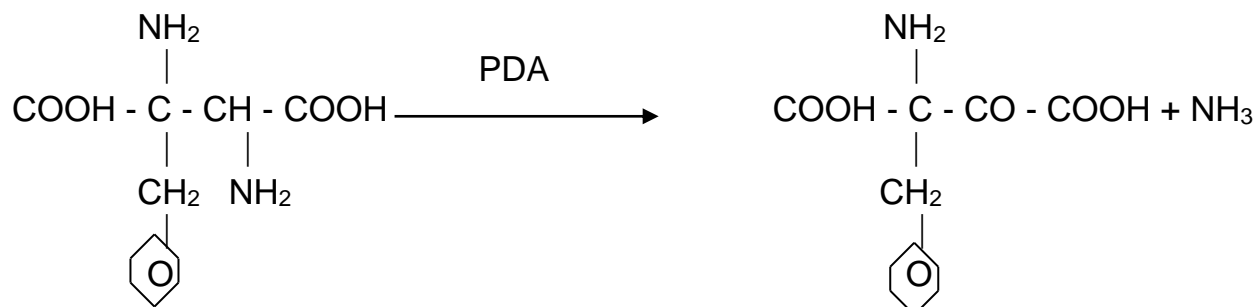
L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions  $\text{OH}^-$  alcalinisant suivant la réaction :





### II-4-10 : Action de la Phenyl alanine désaminase (PDA)

La PDA, enzyme induite, agit sur la Phenyl alanine en entraînant la formation d'acide cétonique correspondant selon la réaction :



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

### II -4-11 : Production de $\text{SH}_2$ (sulfure d'hydrogène)

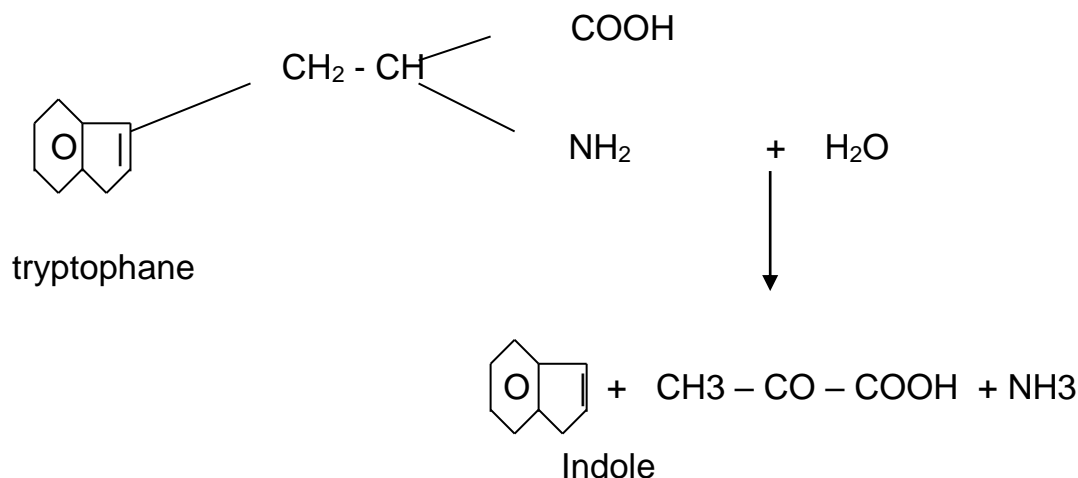
La production de  $\text{SH}_2$  par les microorganismes est mise en évidence par incorporation de fer ou de plomb dans le milieu destiné à cette étude.

Il se forme un précipité noir de sulfure de fer ou de plomb.

### II-4-12 : Production d'indole

Certains bacilles à gram négatif non fermentaires dégradent le tryptophane, grâce à une tryptophanase. Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac.

L'indole étant apolaire, réagit fortement avec le paradiméthyl-amino-benzaldehyde en milieu acide et donne un anneau rouge qui remonte en surface.

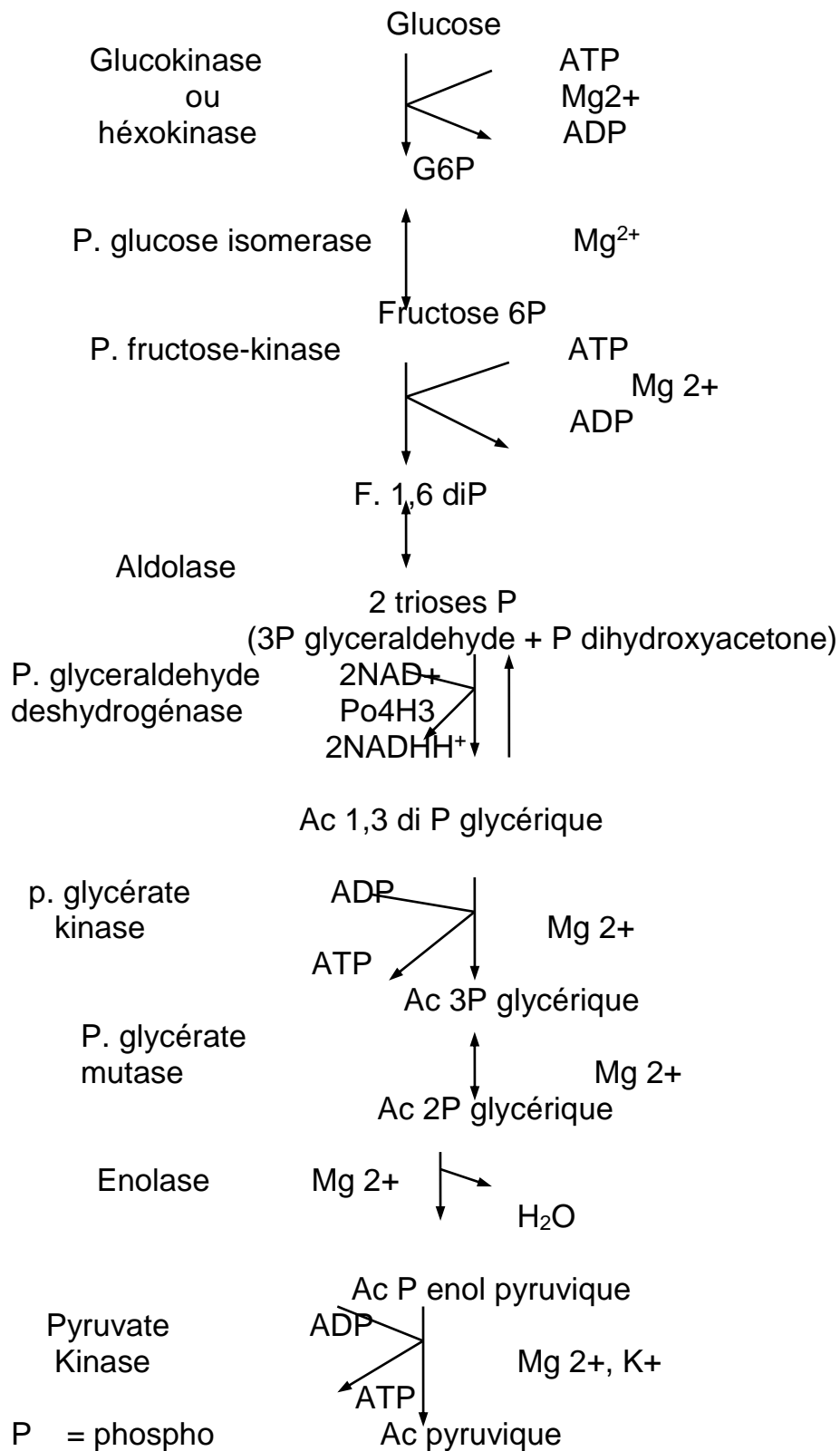


**II-4-13 : Production d' ortho - nitrophenyl  $\beta$ D galactopyranoside (ONPG)**

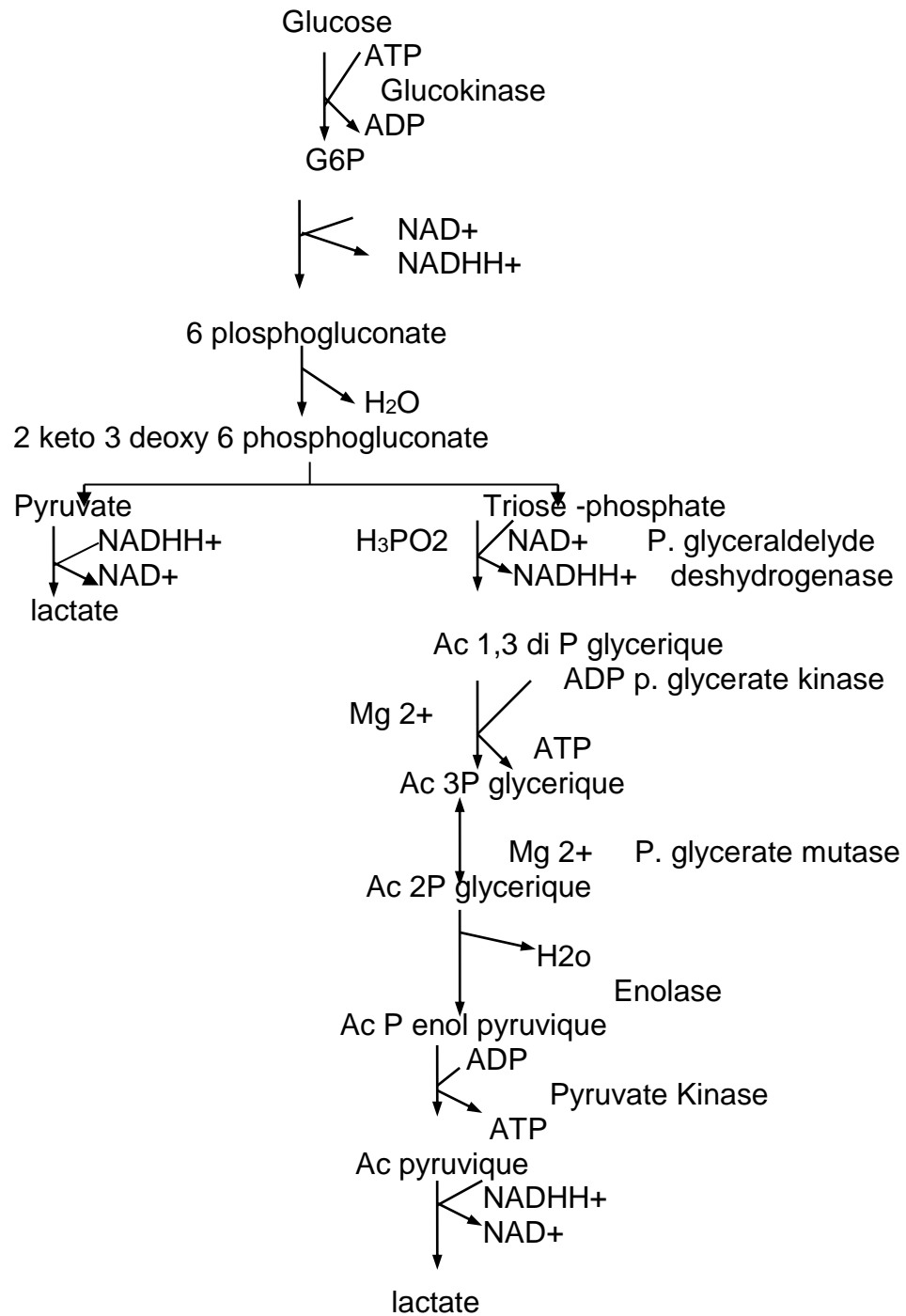
Il est en évidence la présence de  $\beta$ galactopyranoside ( $\beta$ Gal) qui scinde le lactose en glucose et galactose.

L'ONPG en présence de  $\beta$ Gal donne l'ortho-nitrophenol (jaune) et le galactose.

### Voie l'Embden Meyerhof



P = phospho  
Ac = acide, F= fructose



P = Phospho  
Ac = Acide

### Voie d'Entner Doudoroff

### III - ETUDE DES PRINCIPAUX GENRES

#### III -1 Pseudomonas

Le genre *Pseudomonas* est constitué de bacilles à gram négatif non fermentaires, droits ou légèrement incurvés [8],[11].

Ce genre est extrêmement hétérogène et renferme au moins une soixantaine d'espèces :

La classification des espèces du genre *Pseudomonas* a bénéficié :

- des études de taxonomie de STANIER et COLL [11] traitant principalement :
  - . de l'assimilation d'une série de substrats carbonés
  - . des besoins en facteurs de croissance
  - . des voies de clivage des diphenols
  - . des inclusions de polyhydroxy butyrate (PHB)
- des études du génome bactérien de PALLERONI et de VOS et le LEY

On peut définir le genre *Pseudomonas* comme espèces de bacilles à gram négatif :

- aérobies stricts, toutefois certaines espèces peuvent respirer en anaérobiose les nitrates [8] [11] (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, et quelques biotypes de *P. fluorescens*)
- Croissant sur les milieux usuels non enrichis et sur les milieux électifs pour enterobacteriaceae. Ils poussent de préférence à 30°C plutôt qu' à 37°C et la plupart des espèces sont prototrophes ( capable de pousser en milieu minéral défini, contenant une source unique de carbone et d'énergie ).
- Généralement mobile grâce à une ciliature polaire qui peut être monotriche ou multitriche selon les espèces.

Exceptionnellement les espèces mobiles peuvent devenir immobiles, par suite de la perte ou du non fonctionnement de leurs flagelles.

- présentant une réaction d'oxydase positive
- incapable de fermenter le glucose
- production dans de conditions spécifiques de pigments fluorescents ou non fluorescents parmi lesquels :
  - pyocyanine spécifique de *P. aeruginosa* (pigment phenazinique bleu vert diffusible) qui se transforme parfois en pyorubine rouge soluble [8]
  - pigment phenazidinique produit par *P. aureofaciens* (jaune rouge)
  - pyoverdine (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) (pigment fluorescent jaune vert diffusible)

La pyocyanine et la pyoverdine jouent un rôle de captation du fer (siderophore )

[12]

- Ayant des inclusions de PHB pouvant donner une coloration tigrée au gram [8]
- Les modes de clivage des diphenols par oxydation

Ils présentent un intérêt diagnostique

- méta-clivage
- absence de clivage en ortho et en méta
- ortho clivage

L'antibiogramme présente un intérêt non seulement clinique, mais aussi quelque fois diagnostique.

Le contenu en bases des ADN de *Pseudomonas* est compris entre 58 et 71 (coefficient GC%).

Les tests biochimiques conventionnels [11] pour différencier les principales espèces de *Pseudomonas* isolés chez l'homme, chez l'animal et dans l'environnement sont :

- décarboxylases ( LDC, ODC, ADH )
- gélatinase
- uréase
- ONPG
- TTR
- Hydrolyse de l'esculine
- Amylase

### III-1-1 : *Pseudomonas aeruginosa*

Communément appelé bacille pyocyanique ( mot grec: bacille agent du pus bleu ) [8].

C'est l'espèce type du genre *Pseudomonas* et la principale bactérie du groupe des bacilles aérobies stricts, à la fois par sa fréquence et par sa présence dans de nombreuses niches écologiques (eaux, sols, végétaux).

C'est un petit bacille fin à gram négatif très mobile grâce à une ciliature de type polaire monotriche ( F=1 ) aspect en « vol de moucheron » à condition que le milieu de culture liquide soit suffisamment aéré. De rares souches sont immobiles. [11]

La culture de *P. aeruginosa* est abondante dans les milieux peptonés simples : bouillon nutritif, bouillon nitrate, eau peptonée et sur les milieux gélosés tels que la gélose nutritive, TSA, Mueller-Hinton , gélose au sang. Cette culture est plus abondante à 41°C et elle est caractérisée par une odeur aromatique.

Les colonies sont de trois types :

- Colonies en « œuf sur le plat » ou FE ( fried eggs)
- Colonies « petites » ou sm ( small ), rondes, lisses
- Colonies muqueuses, voire très muqueuses ou M.

Sur le milieu de Kliger Hajna, on observe le brunissement de la pente et l'aspect métallisé de la culture.

La réaction d'oxydase est rapidement et intensément positive.

Les réactions négatives sont exceptionnelles.

Les caractères biochimiques sont les suivantes :

- LDC-
- ODC-
- ADH+
- Dénitrification+
- Culture à 41 ° C+
- Gélatinase+
- Esculine -
- CS +
- Pyocyanine +
- H<sub>2</sub> S-
- Indole –
- TDA-
- Uréase - ( certaines souches sont uréase +)
- ONPG - ( 98 % des souches de *P. aeruginosa* du serogroupe 0/11 hydrolysent l'ONPG au moyen d'une enzyme différente de la  $\beta$ -galactosidase) [11].
- DNase et Tween 80 estérase : les résultats sont variables selon les souches

*P. aeruginosa* est le type même des bactéries opportunistes pathogènes chez l'immunodéprimé ou après un traumatisme grave ou chez les brûlés.

Les souches plus particulièrement pathogènes sont productrices de:

- une cytotoxine nécrosante et surtout
- une exotoxine protéique dite A [8].

**Tableau 2** : Sensibilité aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* [11]

Sensibilité à de nouvelles molécules	Sensibilité à des associations bactéricides
- Carboxypénicilline Ticarcilline	Aminosides + $\beta$ lactamine (sisomicine ) ( Ticarcilline)
- Acylureidopénicilline Azlociline Mezlocilline Piperacilline	(Dibekacine ) (Imipenem (Netilmicine )
- Acylpénicilline Apalcilline	Fosfomycine + Aminosite ( Bonne diffusion ) tissulaire
- Cephalosporine 3ème génération Antipyocyaniques Cefoperazone Cefsulodine Ceftazidime	6 fluoroquinolone + $\beta$ lactamine ( ciprofloxacine ) ( piperacilline ) (pefloxacine ) (cefsulodine ) (sauf injections) ( Imipenem)
- Carbapénèmes Imipenem	urinaires
- Monobactames Aztréonam	

### III- 1 –2 : *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida*

Les premiers travaux relatifs à la taxonomie de *P. fluorescens* et *P. putida* étaient basées sur la caractérisation phénotypique des bactéries ( test métaboliques, composition des acides gras, profil protéique ).Ces études ont abouti à la subdivision de *P. fluorescens* et *P. putida* respectivement en 5 et 2 biovars.

La clarification de la taxonomie de *P. fluorescens* et de *P. putida* requiert de recherches complémentaires qui assurent des méthodes phénotypiques récentes et génotypiques [12].

Nous pouvons citer d'autres espèces telles que :

*Pseudomonas mendocina* , *P. stutzeri*

Les caractères de *P. fluorescens* , *P. putida* , *P. mendocina* , *P. stutzeri* sont indiqués dans les tableaux 3 et 4.



**Tableau 3** : caractères différentiels des *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. putida*

	<b>P. aeruginosa</b>	<b>P. fluorescens</b>	<b>P. putida</b>
Réaction d'oxydase	++	+	+
Ciliature	F = 1	F > 1	F > 1
Pyocyanine	V	-	-
Pyoverdine	V	V	V
Croissance à 41°C	+	-	-
Croissance à 4°C	-	+	[+]
Inclusion de PHB	-	-	-
Clivage de diphenols	ortho	ortho	ortho
Assimilation en milieu M 63			
Lactate, arginine, glucose	+	+	+
Acétamide	+	-	[-]
Maltose	-	-	-
Tréhalose, inositol	-	[+]	-
Mannitol	+	v	v
<b>Citrate de Simmons</b>	++	++	++
Malonate	+	v	v
Dénitrification, Nitrate – réductase	+	V	-
<b>LDC ,ODC .</b>	-	-	-
<b>ADH</b>	++	++	++
<b>Gélatinase</b>	+	+	-
DNase	v	v	v
Tween 80 – estérase	v	v	v
<b>Amylase</b>	-	-	-
H <sub>2</sub> S, TDA, indole	-	-	-
<b>Esculine</b>	-	-	-
<b>TTR</b>	[+]	v	v
<b>Uréase</b>	[-]	[-]	[-]
<b>ONPG</b>	[-]	-	-

**TABLEAU 4** : caractères différentiels entre *P. mendocina* et *P. stutzeri*

	<b>P. mendocina</b>	<b>P. stutzeri</b>
Réaction d'oxydase	+	+
Ciliature	F = 1	F = 1
Pigment	Jaune orangé	jaune pâle
Clivage des diphénols	Ortho	ortho
Croissance à 41° C	+	+
Inclusion de PHB	-	-
Assimilation en milieu M63		
-lactate	+	+
-Acétamide, trehalose, inositol	-	-
-Arginine	[+]	-
-glucose	+	+
-maltose	-	+
-mannitol	-	v
Citrate de Simmons	+	+
Malonate	[+]	[+]
Dénitrification	+	+
Nitrate - réductase	+	+
<b>LDC, ODC</b>	-	-
<b>ADH</b>	+	[-]
<b>Gélatinase</b> , DNase	-	-
Tween 80 estérase	+	[+]
Amylase	-	+
H <sub>2</sub> S , <b>ONPG</b> , <b>Uréase</b> , TDA, Indole	-	-
<b>Esculine</b>	-	-
<b>TTR</b>	-	v

### III -2 : Burkholderia:

En 1973, Palleroni et al., au vu des résultats de l'hybridation ARNr- ADN, divisent le genre *Pseudomonas* en 5 groupes d'homologie.

En 1992, Yabuuchi et al., en se basant sur la séquence des ARNr 16 s, sur les homologies ADN-ADN, sur la composition des lipides et des acides gras et sur les caractères phénotypiques transfèrent les espèces du groupe d'homologie II dans un nouveau genre, le genre *Burkholderia* qui a été validé en 1993 [5] [7] [9] [14] [26] .

La définition du genre *Burkholderia* repose avant tout sur des considérations génomiques et sur la composition chimique des lipides cellulaires.

Ce sont des bacilles droits, gram négatif, accumulant généralement des granules de PHB, mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (*Burkholderia mallei* est cependant dépourvu de flagelles et immobile), aérobies stricts, catalase + , oxydase variable selon les espèces , capables de croître en utilisant comme source unique de carbone le glucose, le glycérol, l'inositol, le galactose, le sorbitol , le mannose et le mannitol.

Par ailleurs les espèces du genre *Burkholderia* ont pour principal habitat le sol et les plantes mais quelques espèces sont pathogènes pour l'homme ou l'animal ou se comportent comme des pathogènes opportunistes.

Nous pouvons citer un certain nombre d'espèces:

- *Burkholderia cepacia*
- *Burkholderia mallei*
- *Burkholderia pseudomallei*

#### ***Burkholderia cepacia***

Anciennement appelé *Pseudomonas Kingii* et *P. multirovans* ( dénomination qui indiquait que cette espèce peut assimiler de nombreux substrats ) *Burkholderia cepacia* est une bactérie phytopathogène (oignon, riz) mais cette espèce peut se comporter comme un pathogène opportuniste chez les individus aux moyens de défense affaiblis.

C'est un bacille assez fin, de longueur moyenne ou assez court, mobile grâce à une ciliature de type polaire multitriche, mais ses mouvements simulent souvent ceux d'une bactérie à ciliature péritriche, comme celles des enterobactéries.

### **Burkholderia pseudomallei**

*B. pseudomallei* ou bacille de Whitmore découvert en 1912, agent de la mélioidose ou fausse morve [8] [11] [19] [29].

C'est un pathogène strictement mobile. Du point de vue cultural, les colonies lisses, dissociant rapidement en colonies rough ou muqueuses, sont pigmentées en crème jaune paille ou orangé vif. Il pousse à 37°C et 42°C sur gélose nutritive, sur gélose au sang mais sans hémolyse, sur EMB, Drigalski et Mac Conkey.

### **Burkholderia mallei**

*Burkholderia mallei* est un parasite obligatoire et pathogène strict immobile des solipèdes (cheval, âne, mulet). Cette bactérie peut être considérée comme un mutant déficient de *Burkholderia pseudomallei*. Ce bacille immobile a été découvert par Loeffler en 1882 [8] [11] [16] [32] et est responsable de la maladie de la morve du cheval qui est très rare.

**Tableau: 5** Caractères différentiels de *B. cepacia*, *B. pseudomallei*

	<b>Burkholderia cepacia</b>	<b>B. pseudomallei</b>
Réaction d'oxydase	+ / -	+
Ciliature	F >1	F >1
Pigment jaune	[-]	[+]
Croissance à 41°C	[-]	+
<b>Inclusion de PHB</b>	+	+
Clivage des diphénols	ortho	ortho
Assimilation en milieu M63		
Lactate	+	+
Acétamide	[+]	-
Arginine	+	+
<b>Glucose</b>	+	+
Maltose	[-]	+
<b>Mannitol, Inositol</b>	+	+
<u>Tréhalose</u>	v	+
Citrate de Simmons, Malonate	+	+
Dénitrification	-	+
Nitrate - réductase	v	+
LDC	[+]	-
ODC	v	-
ADH	-	+
Gélatinase	[+]	+
DNase	-	-
Tween - 80 - esterase	+	v
Amylase	-	v
H <sub>2</sub> S, TTR, TDA, indole	-	-
Esculine	v	v
Uréase	v	-
ONPG	v	-

### III.3. Stenotrophomonas

#### Stenotrophomonas maltophilia

L'espèce maltophilia , classé en 1960 dans le genre Xanthomonas en raison des données d'ordre génomique et phénotypique puis fut rangée dans le genre Stenotrophomonas.

C'est une bactérie ubiquiste.

Elle est responsable d'infections nosocomiales principalement chez les immunodéprimées.

Par sa fréquence, Stenotrophomonas maltophilia est la seconde espèce de Pseudomonades isolée en milieu hospitalier, après Pseudomonas aeruginosa [11]

C'est un bacille aérobie strict, assez fin, de longueur moyenne, un peu polymorphe, à ciliature polaire multitriche.

Les caractères biochimiques et nutritionnels sont rapportés dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Caractères biochimiques et nutritionnels de *Stenotrophomonas maltophilia* .

	<b>Stenotrophomonas maltophilia</b>
Réaction d'oxydase	- / + lent
Ciliature	F>1
Pigment	-ou jaune pâle
Croissance à 41°C	-
Inclusion de PHB	-
Clivage des diphénols	-
Auxotrophie	+ ( méthionine ou cystéine )
Assimilation en M63	( Supplément en méthionine )
Lactate	+
Acétamide	-
Arginine	-
Glucose	+
Maltose	+
Tréhalose	+
Mannitol	-
Inositol	-
	( Supplément en méthionine )
Citrate de Simmons	+
Malonate	+
Nitrate - réductase	v
Dénitrification	-
<b>LDC</b>	+
ODC	-
ADH	-
<b>GELATINASE</b>	+
DNase	+
Tween 80 esterase	+
Amylase	-
H <sub>2</sub> S, TDA, indole	-
TTR	[ + ]
Uréase	-
ONPG	v
<b>ESCULINE</b>	[+]

### **III.4. Shewanella**

#### **Shewanella putrefaciens ( Alteromonas putrefaciens )**

Cette espèce a été antérieurement dénommée *Pseudomonas putrefaciens* à cause de l'odeur putride de ses cultures ou *P. rubescens* du fait de la pigmentation saumonée de ses colonies. Elle a été exclue du genre *Pseudomonas* en raison de la teneur en bases des ADN de ses souches, le coefficient GC% compris entre 43 et 55 justifiait son rattachement au genre *Alteromonas* où elle occupait une position originale.

*Alteromonas putrefaciens* n'est pas un bacille halophile mais seulement halotolérant. Il se distingue des autres espèces d'*Alteromonas*:

- par son biotope
- par la particularité de son caractère aérobic strict (croissance discrète en anaérobiose )
- par la possession d'une thiosulfate - réductase très active ( H<sub>2</sub> S+)
- par l'absence d'amylase
- par les valeurs du coefficient GC % certains de ses souches ( phénon A) supérieur à 50, d'où son rattachement à un nouveau genre sous le nom d'espèce de *Shewanella putrefaciens*.
- *S. putrefaciens* se présente comme une bacille assez court ou de longueur moyenne, un peu polymorphe, très mobile grâce à un flagelle polaire monotriche.

Les caractères biochimiques et nutritionnels sont indiqués dans le tableau 7.



**Tableau 7:** Caractère biochimiques et nutritionnels de *Schewanella putrefaciens*

	<b>Schewanella putrefaciens</b>
Réaction d'oxydase	+
Ciliature	F=1
<b>pigmentation des colonies</b>	Rose saumon
Croissance en eau peptonée sans sel	+
Denitrification	-
Nitrate – reductase	+
<b>ODC</b>	+
LDC, ADH	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	++
Indole, TDA	-
Esculine	-
Uréase	[-]
TTR	+
<b>Gélatinase</b>	+
<b>Lipase</b>	+
<b>Lecithinase</b>	+
<b>Thiosulfate reductase</b>	+
Chitinase	V
DNase	-
Tween 80 esterase	+
Amylase	-
ONPG	-
CS	[-]
Malonate	-
Assimilation en M63	
Lactate	+
Acétamide	-
Arginine	-
Tréhalose	-
Mannitol	-
Inositol	-

### III- 5 Acinetobacter

Les membres du genre Acinetobacter ont subi de nombreux changements de leur taxonomie, ce qui a empêché leur étude adéquate [1] [6] [24] [25] [27] [31].

Une étude taxonomique d'une collection importante de souches Acinetobacter basée sur les hybridations ADN-ADN, la stabilité thermique des hybrides, les caractères biochimiques, enzymatiques et nutritionnels, a permis à **P. Bouvet et Coll** [4] [11] [15] [20] [21] [28] d'individualiser plus d'une quinzaine d'espèce ou de genospecies, de définir les espèces *A. calcoaceticis* et *A. lwoffii* et d'en créer de nouvelles : *A. baumannii* (Exp . *A. glucidolytica* non liquefaciens, *A. calcoaceticus* var *anitratum* ), *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* , *A. junii*

#### Habitat

Les Acinetobacter sont des bactéries ubiquistes par excellence, mais on les rencontre également sur les revêtements cutanés de l'homme et des animaux. *A. johnsonii* fait partie de la flore cutanée normale.

#### Caractères morphologiques

La morphologie particulière des Acinetobacter permet presque à coup sûr d'orienter correctement leur identification.

L' examen au microscope optique de culture en milieux liquides peptonés simples, montre des diplobacilles à extrémités arrondies toujours immobiles, isolés ou en courtes chainettes accompagnés de formes cocci plus ou moins nombreux, plus rarement de formes allongées et massuées dites " formes souffrantes" dont la formation serait favorisée par l'agitation des cultures.

Certains Acinetobacter, colorés par la méthode de Gram, résiste parfois à la décoloration par l'alcool-acétone : les parties foncées qui correspondent aux inclusions métachromatiques , gardent le Gram ( Gram +) [11] [18].

#### Caractère culturaux

Les Acinetobacter croissent bien sur les milieux de culture de routine. Leur température optimale de croissance se situent entre 33 et 35°C [10] [13] [19] [23] [30] [31]

Sur gélose de Drigalski, les colonies d'Acinetobacter sont lactose négative, lisse à bord net. Sur TSA les colonies présentent le même aspect , la réaction d'oxydase est négative celle de la catalase est positive.

### Caractères biochimiques et nutritionnels [11]

Les principaux caractères des espèces d'Acinetobacter les plus fréquemment isolés sont rapportés dans le tableau 8

	<b>A. Calcoaceticus</b>	<b>A.baumannii</b>	<b>A.haemolyticus</b>	<b>A.junii</b>	<b>A.johnsonii</b>	<b>A.lwoffii</b>
Glucose (acidification)	+	[+]	-	-	-	-
γGT	+	+	-	-	-	-
β.xylosidase	-	[+]	v	-	-	[-]
<b>Bo 44° c</b>	-	+	-	-	-	-
<b>Bo 41° c</b>	-	+	-	[+]	-	-
<b>Bo 37° c</b>	+	+	+	+	-	+
Lactate (utilisation)	+	+	-	+	+	+
Citrate de Simmons	+	+	[+]	v	+	-
Malonate	+	+	-	-	-	-
Hemolyse	-	-	+	-	-	-
Gélatinase						

**Tableau 8** : Caractères principaux des Acinetobacter

En plus de ces caractères cités on peut y ajouter l'assimilation des 14 sources de carbone et d'énergie: DL lactate, DL-4 aminobutyrate, citrate, trans-aconitate, glutarate, aspartate, azélate,  $\beta$  alanine, L histidine, D - malate, malonate, histamine, L. phenyl alanine, phenyl - acetate [11].

### III-6 Flavobacterium

Flavobacterium sont des bacilles à gram négatif aérobies stricts assez courts (présence possible de bacilles plus longs, supérieurs à 5mm) toujours immobile. Les bactéries de l'environnement croissent entre 5 et 30°C, celles d'origine humaine jusqu'à 37°C.

Les bactéries cultivent sur gélose nutritive, gélose au sang, TSA.

Selon l'espèce les colonies peuvent être pigmentées ou apigmentées. La réaction d'oxydase est positive. Les flavobacterium exigent de facteurs de croissance comme par exemple des amino-acides, la thiamine, la biotine.

Nous pouvons citer un certain nombre d'espèce dont :

Flavobacterium odoratum

Flavobacterium multivorum ( Sphingobacterium multivorum )

Flavobacterium spiritivorum ( Sphingobacterium spiritivorum )

Flavobacterium breve

Les caractères biochimiques et nutritionnels de ces espèces sont rapportés dans le tableau 9.

Remarque: La production d'indole par certaines espèces a une grande valeur diagnostique [11].

### III-7 Chryseobacterium ( Ex Flavobacterium )

#### Chryseobacterium meningosepticum

Ce sont des bacilles gram négatif aérobies stricts courts, même très courts, fins avec une tendance au polymorphisme: les bacilles longs ou flexueux sont d'autant plus nombreux que les cultures sont plus âgées, ils sont immobiles et dépourvus de mobilité par glissement.

Ces caractères biochimiques et nutritionnels sont rapportés dans le tableau 9.

Chryseobacterium meningosepticum est l'espèce de Chryseobacterium qui revêt une importance particulière en bactériologie médicale. Elle peut être en effet l'agent étiologique de septicémies de méningites gravissimes en néo-natalogie d'où l'importance de son identification et du choix des antibiotiques à utiliser pour le traitement.

**Tableau 9** Caractères différentiels des principales espèces de *Flavobacterium*

	<b>Chryseobacterium meningosepticum</b>	<b>F. breve</b>	<b>F. odoratum</b>	<b>F. multivorum</b>
Croissance en Drigalski	Difficile	Difficile	Rapide	Difficile
Pigment jaune orange vif	+	-	v	-
Pigment jaune pâle	[-]	[+]	[+]	v
Odeur fruitée des cultures	-	v	+	-
Indole	+	+	-	-
Amylase	-	-	-	- / +
ONPG ( 15-60 mm )	+	-	-	+
ONPG ( 6-18 h )	-	-	-	-
Nitrate –réductase	-	-	-	[-]
Culture à 41°C	-	-	-	-
Uréase	-	-	[+]	[+]
Esculine	+	[-]	-	+
MEVAG				
glucose	+	+	-	+
Maltose	+	+	-	+
Mannitol	v	-	-	-
lactose	v	-	-	+
Tréhalose	[+]	-	-	+
Glycérol	[+]	[-]	-	[+]
Tween 80 estérase	[-]	-	v	[+]
DNase	+	+	[+]	v
Gélatinase	+	+	+	-

### III – 8 Alcaligenes

Le genre *Alcaligenes* comprend de nombreuses espèces de bacilles à gram négatif aérobies stricts, courts et trapus, généralement isolés, ayant parfois la morphologie de coccobacilles, mobiles au moyen d'une ciliature de type péritriche dégénéré (1 à 8 flagelles à insertion non polaire) poussant à 30°C sur les milieux ordinaires. Les cultures présentent une réaction d'oxydase positive. Le PHB est accumulé comme réserve intracellulaire. Les espèces isolées chez l'homme ne sont pas pigmentées. Leur identification pose des problèmes de diagnostic différentiel car elles présentent de nombreux caractères négatifs :

- absence de décarboxylases (LDC, ODC, ADH)
- forte alcalinisation des milieux correspondants
- absence d'exoenzymes: gélatinase -, DNase-, Tween 80 estérase -, amylase -, ONPG -
- Indole -, H<sub>2</sub>S -, esculine -

#### ***Alcaligenes faecalis***

Les *A. faecalis* sont des bacilles gram négatif aérobies stricts courts, leur mobilité de type péritriche dégénéré se manifeste par des mouvements désordonnés en lignes brisées, qui parfois simulent une ciliature de type polaire multitriche.

Les colonies d'*A. faecalis* sur le milieu de Digalski sont lactose négative, mates et entourées d'une collerette claire, d'où un aspect en "bouton de culotte"

Les cultures de la variété odorans dégagent en général une odeur fruitée agréable.

Les caractères biochimiques des principales espèces d'*Alcaligenes* sont rapportés dans le tableau 10

**Tableau 10:** Caractères différentiels des espèces et sous - espèces d'Alcaligenes et d'Ochromobactrum anthropi

	A. faecalis	A. faecalis var. Odorans	A. Denitrificans subsp		A. piechaudii	Ochrobactrum anthropi
			Subsp denitrificans	xylosoxidans		
TTR	+	+	+	+	+	+
M 63 lactate, acétate	+	+	+	+	+	+
Nitrate reductase	v	-	+	+	+	+
Respiration des nitrates	-	-	+	+	-	+
Nitrite reductase	-	+	+	+	-	[+]
Respiration des nitrites	-	+	+	+	-	[+]
MEVAG ou M63 xylose, glucose	-	-	-	+	-	+
Urease	-	-	v	-	-	+
M63 arginine, maltose Théalose inositol, mannitol	-	-	-	-	-	(+ou [+])
M63 acétamide	-	+	[-]	v	-	-
Malonate	-	+	-	-	-	-
Citrate de Simmons	[+]	+	+	+	+	+
TDA	-	+	-	-	-	-
L.phenylalanine	-	[-]	-	-	-	+
Culture à 41°C	v	v	-	+	-	[-]

## METHODOLOGIE

### A/ Mise au point de la microméthode

#### I – Echantillonnage

Nous avons utilisé trois catégories de souches :

- les souches de référence
- les prélèvements du service de réanimation
- les prélèvements du laboratoire de Bactériologie et Virologie de HALD
- 

#### II – Matériels et réactifs

##### II-1 Matériels

Agitateur magnétique

- Balance de précision
- pH mètre
- Seringue
- Filtres de 0,2 µl de diamètre
- Micropipette
- Embouts stériles
- Flacons en verre avec bouchon à vis de 50, 100 et 150 ml
- Tubes stériles
- Cryotubes
- Erlen Meyer
- Papier emballage
- Mortier

##### II-2- Réactifs

- glucides : glucose, mannitol, lactose, sorbitol
- bleu de bromothymol, peptone tryptique, rouge de phénol.
- chlorure de sodium
- soude
- bouillon nutritif
- L tryptophane, L arginine, L phényl alanine
- phosphate monopotassique et dipotassique
- citrate trisodique, malonate de sodium
- urée
- alcool 95°



- extrait de levure
- sulfate d'ammonium
- sulfate de magnésium
- phosphate d'ammonium
- thiosulfate de sodium
- nitrate de potassium
- extrait de levure
- bromocrésol pourpre
- disque ONPG
- gélatine
- citrate de fer ammoniacal
- esculine
- extrait de viande

### III- Préparation des milieux

#### III-1 Milieu oxydative fermentative

C'est le milieu de base pour l'étude de l'assimilation des sucres par les bacilles à Gram (-) non fermentaires. Sa composition est la suivante :

Peptone ou tryptone	2g
Phosphate dipotassique	0,3g
NaCl	5g
Bleu de bromothymol	0,03g
Eau distillée	1000ml

Ces différents composants furent mélangés et ajustés à pH 7,1; puis divisés en plusieurs parties à volume égal. Une partie pour chaque carbohydrate.

Par exemple : pour faire OF glucose, OF lactose, OF sorbitol, OF mannitol et OF xylose, diviser le milieu de base OF en 5 parties chacune de 200ml.

Les solutions obtenues furent autoclavées à 121°C pendant 15mn.

#### III-2 Milieux de recherche des décarboxylases

- Formule :
 

extrait de levure	0,6g
Glucose	0,2g
NaCl	1g
Rouge phénol	0,03g
Acide aminé (L arginine, L lysine, L ornithine)	1g
Eau distillée	100ml

Ajuster le pH à 6,3 - 6,4 et mettre à l'autoclave à 120°C pendant 15min.

**NB** : Ici nous n'étudierons que l'ADH donc l'acide aminé ajouté sera L arginine.

### III -3 Milieu à l'ONPG

Les disques d'ONPG furent immergées dans une solution de lactose à 10% puis le milieu obtenu fut vortexé pour favoriser l'élution des disques.

### III-4 Milieu pour la recherche de l'uréase

- Formule : L tryptophane 0,6g  
 Phosphate monopotassique 0,2g  
 Phosphate dipotassique 0,2g  
 NaCl 1g  
 Urée 4g  
 Alcool 95° 2ml  
 Rouge phénol ( ou 0,5ml de solution à 1%) 0,05g

Stériliser par filtration

### III-5 Milieu pour la mise en évidence de la gélatinase

- Préparation de la gélatine  
 Gélatine 15g  
 Eau distillée 100ml

Chauffer au bain-marie bouillant jusqu'à la dissolution complète. Laisser refroidir à 45°C et ajouter en mélangeant, activement 4g de charbon de bois en poudre fine.

Couler dans les moules de 0,5cm. Laisser solidifier sur une surface horizontale puis porter pendant 1/2 heure à la glacière. Démouler et faire séjourner les plaques pendant 24 heures dans la solution de formol suivante.

- Formol de commerce à 40% 1 volume  
 Eau distillée 69 volumes

Découper ensuite en petits fragments de 0,5cm de côté qui sont rincés avec de l'eau courante pendant 24-48 heures pour éliminer le formol.

Introduire les cubes lavés dans des flacons contenant de l'eau distillée.

Tyndaliser 1 heure à 60°C, 3 jours de suite.

### III-6 Milieu au citrate de SIMMONS

- Formule : Sulfate de Mg 0,04g  
 Phosphate mono ammonique 0,02g  
 Phosphate dipotassique 0,2g

Citrate trisodique	0,4g
NaCl	1g
Bleu de bromothymol	0,016g
Eau distillée	100ml

Dissoudre à chaud. Ajuster le pH à 7 et mettre à l'autoclave à 120°C pendant 20min.

### III-7 Milieu au citrate de CHRISTENSEN

- Formule :
 

Extrait de levure	0,1g
Citrate de sodium	0,16g
Glucose	0,04g
Chlorhydrate de L cystéine	0,02g
Phosphate monopotassique	0,2g
NaCl	1g
Rouge phénol (0,4ml de solution à 1%)	0,004g
Eau distillée	100ml

Ajuster le pH à 6,5 et mettre à l'autoclave à 120°C pendant 15min

### III-8 Milieu pour la recherche de H<sub>2</sub>S et de l'indole

- Formule :
 

Peptone de Caséine (ou tryptone)	6g
Peptone de viande	1,78g
Tryptophane	0,9g
Citrate ferrique ammoniacal	0,06g
Thiosulfate de Na	0,06g

Ajuster l'autoclave à 120°C pendant 15min

### III-9 Milieu au malonate et a la phenylalanine (MAL-PDA)

- Formule :
 

Extrait de levure	0,2g
Sulfate d'ammonium	0,4g
Phosphate dipotassique	0,16g
Phosphate monopotassique	0,08g
NaCl	0,4g
Malonate de sodium	0,6g
L- Phénylalanine	0,2g
Bleu de bromothymol	0,005g

Ajuster à pH 6,9 et mettre à l'autoclave à 115°C pendant 10min

### III-10 Milieu pour la mise en évidence de l'attaque de l'esculine

Formule :

peptone	2g
citrate de fer ammoniacal	0,2g
esculine	0,2g

Ajuster à pH 7,4 puis mettre à l'autoclave à 110°C pendant 30mn

### III-11 Milieu pour la recherche de la nitrate réductase

Il s'agit d'un bouillon nutritif nitraté.

Le bouillon nutritif a la formule suivante :

Peptone	0,5g
Extrait de viande	0,3g
Eau distillée	100ml

Ajuster à pH 7 et ajouter 2g de nitrate de sodium. Dissoudre et mettre à l'autoclave à 121°C pendant 15mn.

NB : avec du bouillon nutritif déshydraté, il s'agit de dissoudre 1,6g de milieu sec dans 100ml d'eau pour préparer le bouillon.

### IV- Réactifs de révélation

- Acide sulfanilique à 8g/l GRIESS

Acide sulfanilique	0,8g
Ethanol	100ml

- Apha-naphtylamine à 5g/ GRIESS II

$\alpha$ naphtylamine	0,5g
Ethanol	100ml

- Perchlorure de Fer au 1/3

Perchlorure de Fer officinal	10ml
Eau distillée	20ml

- Réactifs de Kovacs

p-diméthylamino-benzaldéhyde	5g
Alcool amylique	75ml
Hcl pur	25ml

**NB:** dissoudre l'aldéhyde dans de l'alcool au bain-marie à 60°C.

Refroidir et ajouter l'acide goutte à goutte en maintenant le récipient dans la glace.

Conserver à 4°C en flacon ombré.

## **V- Préparation de l'inoculum**

Les souches conservées étaient enrichies dans du BGT pendant 4h puis ensemencées dans du GSC. Après 24h d'incubation à partir des colonies bien isolées la suspension bactérienne était préparée en les délayant dans de l'eau distillée stérile.

La turbidité de la suspension était ajustée à l'échelle 0,5 de l'étalon de Mac Farland.

Cette suspension homogénéisée était alors prête à l'emploi.

## **VI - Ensemencement et incubation**

Les milieux préparés étaient distribués dans leurs cupules correspondantes. Puis dans chaque cupule était ajoutée la suspension bactérienne.

Les milieux et la suspension bactérienne furent ajoutés dans les mêmes proportions : 25µl de chaque.

La microplaque fut incubée à 37°C pendant 24h sur un support humide pour éviter la déshydratation.

## **B/ Méthode**

### **I- Tests pré-identification**

Il consistait à faire:

- l'état frais
- le Gram
- l'oxydase
- le type de respiration

A partir du BGT on faisait l'état frais et le Gram.

A partir des colonies bien isolées sur le GSC on étudiait la réaction à l'oxydase.

Pour connaître les types de respiration nous disposions de deux tubes contenant du glucose et la suspension bactérienne, l'un était ouvert l'autre fermé.

Si on observe : - des bacilles, coccobacilles ou diplobacilles

- Gram (-)
- Aérobie stricte
- Oxydase + ou -

Nous pouvons conclure que ce sont des bacilles à Gram (-) aérobies strictes.

## II - La microméthode

### II-1 Principe

La technique consiste à ensemencer des microplaques constitués de cupules renfermant des substrats déshydratés destinés à la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation des substrats carbonés.

Les cupules étaient ensemencées avec un inoculum qui reconstitue le milieu.

Après incubation, la lecture des réactions était effectuée à partir d'un tableau :

- soit directement (virage de l'indicateur coloré utilisé),
- soit après addition de réactifs de révélation.

### Constituants de la galerie

Tests	Substrats
NIT	Nitrate de potassium
UREE	urée
MAL	Malonate
PDA	Phénylalanine
ONPG	O. nitrophényl $\beta$ -D galacto-pyranoside
ADH	Arginine
GEL	Gélatine
ESC	Esculine
CS	Citrate de Simmons
CC	Citrate de Christensen
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
IND	Indole
GLU	Glucose
LAC	Lactose
SOR	Sorbitol
MAN	Mannitol
XYL	Xylose

## **II-2 Ensemencement**

Il consistait à répartir 100µl de suspension bactérienne d'opacité 0,5 de l'échelle Mac Farland dans les microplaques déshydratées.

## **II-3 Incubation**

Elle se faisait à 37°C pendant 24 à 48heures

## **II-4 Lecture**

Notre étude avait donné lieu à des réactions colorées dont la lecture se faisait directement ou éventuellement après addition d'un ou de plusieurs réactifs de révélation.

## Tableau de lecture

Tests	Réactifs à ajouter	Interprétation	
		Positif	Négatif
NIT	1 goutte d'acide sulfanilique 1 goutte d' $\alpha$ -naphtylamine poudre de zinc	Rose	Incolore
UREE		Rouge violacé	Jaune
MAL		Bleu	Jaune vert
PDA	1 goutte de $FeCl_3$	Vert	Jaune
ADH		Violet	Jaune
CS		Bleu	Vert
CC		Rose	Jaune clair
ESC		Nuage noir	Jaune
GEL		Diffusion du pigment	Pas de diffusion
H <sub>2</sub> S		Précipité noir	Incolore
IND	1 goutte de Kovacs	Anneau rouge	Anneau jaune
ONPG		Jaune	Incolore
GLU		Jaune	Bleu vert
LAC		Jaune	Bleu vert
SOR		Jaune	Bleu vert
MAN		Jaune	Bleu vert
XYL		jaune	Bleu vert

### C- Contrôle de qualité

Lorsqu'un lot de milieux était préparé, il était nécessaire de s'assurer de la stérilité et de l'efficacité des différents milieux.

#### I - 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, de virage de l'indicateur coloré et en l'absence de coloration.

#### II - Contrôle d'efficacité

Chaque lot de milieu préparé était testé avec une souche de référence de l'American type culture collection (ATCC)

Le milieu considéré comme stérile doit 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.

**Exemples :**

TESTS	TEMOINS POSITIFS	TEMOINS NEGATIFS
ADH	<i>Salmonella sp</i>	<i>Escherichia coli</i>
UREE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
GEL	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
CS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella</i>
CC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
SH <sub>2</sub>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
IND	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>
MAL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
PDA	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Shigella flexneri</i>
ONPG	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Lactose	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas</i>
Glucose	<i>Escherichia coli</i>	<i>aeruginosa</i>
Mannitol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Sorbitol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
		<i>Shigella flexneri</i>

**D - Paramètres d'évaluation**

**I- Etude de la reproductibilité**

Elle consistait en l'identification des mêmes souches de référence pour chaque lot de milieux préparés. Ces souches devaient présenter le même profil biochimique lors de l'identification par trois lots différents pour que la méthode soit considérée comme reproductible.

## **II- Etude de la stabilité dans le temps**

A partir du moment où les milieux étaient considérés comme stérile, efficace et reproductible, il s'agissait de déterminer le temps au bout duquel ils restaient efficaces en donnant de bons résultats avec les témoins positifs et négatifs. Il s'agissait également de déterminer les conditions optimales de conditionnement et de conservation des plaques dans lesquelles les milieux ont été déshydratés.

Pour en arriver à la conclusion de la stabilité, il existait différents paramètres à étudier :

- Le conditionnement dans du Téflon ou dans du plastique hermétiquement fermé.
- La température de conservation qui pourrait être de +4° C.

## **III- Evaluation du temps de réalisation**

Pour rendre la méthode performante, il fallait qu'elle soit facilement réalisable ce qui permet un gain de temps lors de la manipulation.

Ainsi, la durée de la réalisation d'un test a été déterminée en chronométrant le temps mis par trois membres du personnel du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec.

## **E - Etude comparative avec la méthode classique**

Cette méthode utilise différents milieux

- Milieu de Kliger – Hajna qui permet la recherche de l'utilisation du Glucose, du Lactose mais également la production d'H<sub>2</sub>S
- Milieu Mannitol – Mobility
- Milieu a l'ADH
- Milieu Urée Indole
- Gelose APP
- ONPG

## RESULTATS

### I . Mise au point de la microméthode

Le tableau XI présente les résultats de l'identification de 33 souches de bacilles à gram négatif non fermentaires ( BGNF ).

90, 91%des souches ont été correctement identifiées.

9,09 % sont incorrectement identifiées

Il s'agissait :

- Pseudomonas fluorescens 1
- Pseudomonas putida 1
- Acinetobacter radioresistens 1

Espèces	Correctement	Incorrectement
Pseudomonas aeruginosa	6	0
Pseudomonas fluorescens	3	1
Pseudomonas putida	2	1
Pseudomonas mendocina	1	0
Burkholderia cepacia	1	0
Stenotrophomonas maltophilia	2	0
Acinetobacter radioresistens	3	1
Alcaligenes xylosoxidans	3	0
Flavobacterium odoratum	2	0
Flavobacterium breve	3	0
Sphingobacterium multivorum	2	0
Chryseobacterium meningosepticum	2	0
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>3</b>
<b>Pourcentage</b>	<b>90,91%</b>	<b>9,09 %</b>

**Tableau XI\_:** Résultat de l'identification des 33 souches de BGNF

## II : Etude comparative

11 bacilles à gram négatif non fermentaires (BGNF ) ont 'été testés par la méthode classique ; leur répartition est fournie par le tableau XII

BGNF	Nombre de souches
Pseudomonas putida	1
Stenotrophomonas maltophilia	2
Pseudomonas fluorescens	1
Pseudomonas aeruginosa	2
Flavobacterium breve	1
Flavobacterium odoratum	2
Sphingobacterium multivorans	1
Chryseobacterium meningosepticum	1
<b>Total</b>	<b>11</b>

**Tableau XII** : Echantillonnage des 11 souches de BGNF testées par la méthode classique

Nous avons obtenu une concordance dans le diagnostic de genre et d'espèce pour près de 63,64 % .

Les discordances portant sur le diagnostic n'ont pas été observées.

Les discordances qui s'élèvent à 18,18% s'expliquaient par une différence dans le diagnostic d'espèce au sein du même genre.

Nous avons également obtenu des cas où l'espèce bactérienne n'a pas été précisée par la méthode classique (sp.) à un taux de 18,18%.

Le tableau XIII présente les résultats de l'étude comparative de l'identification des 11 souches de BGNF à l'aide de la microméthode et la méthode classique.

	Concordance	Discordance		sp.	Total
		Germe bactérienne	Espèce bactérienne		
Nombre de souche	7	0	2	2	11
%	63,64	0	18,18	18,18	100

**Tableau XIII** : résultat de l'étude comparative de l'identification des 11 souches BGNF à l'aide de la microméthode et de la méthode classique.

Sur les 17 caractères de la microméthode, seuls 11 étaient testés par la méthode classique.

Nous avons ensuite exprimé le pourcentage de concordance des caractères étudiés par la méthode classique et la microméthode pour chaque espèce parmi les 11 souches testées.

## **II - 1 – Pseudomonas**

Le tableau XIV présente le pourcentage de concordance des caractères étudiés par la méthode classique et par la microméthode pour le germe Pseudomonas

Pour Pseudomonas aeruginosa, tous les caractères étaient à une concordance de 100% sauf pour l'urée. La concordance de l'urée était à 50%.

Pour Pseudomonas putida, tous les caractères étaient à 100% de concordance.

Pour Pseudomonas fluorescens, on notait une discordance au niveau de la nitrate réductase.

### **II-2. Stenotrophomonas maltophilia**

Le tableau XV présente le pourcentage de concordance des caractères étudiés par la méthode classique et la microméthode par Stenotrophomonas maltophilia. On a observé une concordance de 50% pour la nitrate – réductase et l'indole. Pour les autres caractères la concordance était à 100%.

### **II. 3. Flavobactérium**

Le tableau XVI présente le pourcentage de concordance des caractères étudiés par la méthode classique et la microméthode pour les Flavobactérium.

Pour F. breve on a observé une discordance pour l'indole, tous les autres caractères avaient une concordance de 100%.

Pour F. multivorum ( sphingobactérium multivorum ) la discordance se situe au niveau de l'urée et de la nitrate réductase, par contre tous les autres caractères concordent à 100%.

### **II. 4. Chryseobacterium meningosepticum**

Le tableau XVII présente le pourcentage de concordance des caractères étudiés par la microméthode et la méthode classique pour C. meningosepticum

Tous les caractères concordent à 100% sauf pour l'urée, l'indole et le glucose où on a observé une discordance.

**Tableau XIV** : Pourcentage de concordance des caractères étudiés par la microméthode et la méthode classique pour le genre *Pseudomonas*

	<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b><i>P. putida</i></b>	<b><i>P. fluorescens</i></b>
ADH	100	100	100
UREE	50	100	100
CS	100	100	100
NIT	100	100	0
PDA	100	100	100
SH <sub>2</sub>	100	100	100
IND	100	100	100
ONPG	100	100	100
GLU	100	100	100
LAC	100	100	100
MAN	100	100	100

**Tableau XV** : Pourcentage de concordance des caractères étudiés par la microméthode et la méthode classique pour *Stenotrophomonas maltophilia*

	<b>Stenotrophomonas maltophilia</b>
ADH	100
UREE	100
CS	100
NIT	50
PDA	100
SH <sub>2</sub>	100
IND	50
ONPG	100
GLU	100
LAC	100
MAN	100

**TABLEAU XVI** : pourcentage de concordance des caractères étudiés par la méthode classique et la microméthode pour le genre *Flavobacterium*

	<b>F. BREVE</b>	<b>F. ODORATUM</b>	<b>F. MULTIVORUM</b>
ADH	100	100	100
UREE	100	50	0
CS	100	100	100
NIT	100	100	0
PAD	100	100	100
SH2	100	100	100
IND	0	100	100
ONPG	100	100	100
GLU	100	100	100
LAC	100	100	100
MAN	100	100	100



**Tableau XVII :** Pourcentage de concordance des caractères étudiés par la microméthode et la méthode classique pour *Chryseobacterium meningosepticum*

	<b>CHRYSEOBACTERIUM MENINGOSEPTICUM</b>
ADH	100
UREE	0
CS	100
NIT	100
PDA	100
SH <sub>2</sub>	100
IND	0
ONPG	100
GLU	0
LAC	100
MAN	100

### III - Paramètres d'évaluation

#### III. 1 . Contrôle de qualité

Un contrôle de qualité a été effectué

La formule de **Bayes**

$$P ( t_i / R ) = P ( R / t_i ) / P ( R / t_i )$$

a été utilisée pour valider les tests

$P ( t_i / R )$  = probabilité pour qu'un microorganisme présente le test R appartienne au taxon t.

$P ( t_i / R )$  = probabilité que les membres du taxon t présentent le test R .

Le profil biochimique obtenu avec une souche de référence de *Pseudomonas aeruginosa* est donné par le tableau XIX

A D H	U R E E	C S	C C	E S C	G E L	N I T	M A L	P D A	H <sub>2</sub> S	I N D	O N P G	G L U	L A C	S O R	M A N	X Y L
+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+

**Tableau XIX** : profil biochimique de *P. aeruginosa* ATCC 27 853

#### III .2 – Reproductibilité

La souche de référence testée avec des personnes différentes avait donné le même résultat.

#### III. 3 - Répétabilité

La souche de référence testée plusieurs fois avait donné le même résultat.

#### III. 4 Fiabilité

Sur 11 souches de BGNF, testées par la méthode classique, nous avons 7 qui concordent avec la microméthode.

#### III. 5 - Stabilité

Elle est d'environ 2 semaines à 4°C

#### III. 6 – Rapidité

La moyenne du temps de réalisation d'un test est de 5 mn

## DISCUSSION

### **I - Mise au point de la micro méthode:**

Nous avons étudié 33 souches de BGNF:

- 90,91% ont été bien identifiées
- 9,09 % n'ont pas été correctement identifiées

Une étude des BGNF faite par **A.Ruppel, G.Geis** et **W.Opferkuch** [3] par le système Vitek NFC –card a donné des valeurs voisines.

Sur 93 souches

- 95 % ont été correctement identifiées
- 5 % n'ont pas été identifiées

**M. Desmonceaux, J.L Balzer, S.Ceguès, R. Cogue, R. Cuziat, M. Guichard** [22] ont étudié à l'aide d'une méthode rapide d'identification le Vitek II système, 564 souches de BGNF:

- 96,8 % ont été correctement identifiées
- 1,8 % ont été mal identifiées
- 1,4 % n'ont pas été identifiées.

Les souches qui n'étaient pas bien identifiées, concernaient des espèces du genre *Pseudomonas* et une espèce d'*Acinetobacter*.

- *P. fluorescens*
- *P. Putida*
- *Acinetobacter radioresistens*.

En effet, il se pose un problème de diagnostique différentiel entre les *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* [11] [12]. L'addition d'un nouveau caractère qui est l'acétamide permet de lever l'équivoque.

L'acétamide n'est positif que pour *P. aeruginosa* [11].

Dès lors la gélatinase permettait de différencier *P. fluorescens* et *P. putida*. Elle est positive pour *P. fluorescens* et négative pour *P. putida*.

Quant à l'*Acinetobacter*, il apparaissait au microscope à l'immersion comme étant des bacilles à Gram +. Ceci s'explique par le fait que certains *Acinetobacter* résistent parfois à la décoloration par l'alcool - acétone lors de la coloration par la méthode de Gram [11].

## **II ) Etude comparative :**

Les identifications réalisées par la microméthode concordaient dans environ 63,64 % des cas avec les résultats de la méthode classique prise comme référence.

Nous n'avons pas observé de discordance concernant le genre bactérien.

Les 18,18 % de discordances concernaient l'espèce bactérienne : *Pseudomonas putida* et *P. fluorescens* ont été identifiées comme étant *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode classique. Il s'est posé un problème de diagnostic différentiel entre *P. putida*, *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* [11] [12].

D'une manière générale, les discordances observées au cours de notre étude comparative avec la méthode classique concernaient des cas d'instabilité des caractères suivants:

- l'urée
- la nitrate- réductase
- l'indole

## **III - Paramètres d'évaluation**

### **III- 1 - Le temps d'incubation**

Notre microméthode nécessite un temps d'incubation de 24 h – 48 h .

Pour la galerie Api 20 NE, le temps d'incubation est de 24 à 48 h [2], de même pour la galerie Api NFT, la galerie Api 20 E, oxi / Ferm, Uni – N / F Tek, UniScept 20 E [17].

### **III- 2 - La température de conservation**

Les milieux constitutifs de la microméthode étaient conservés à une température de 4°C .

Cette température est de 2 à 8°C pour les galeries Api 20 E, Api NFT, crystal E / NF [17].

### **III- 3 - La reproductibilité**

Certains souches testées par des personnes différentes avaient donné le même profil biochimique.

### **III- 4 - La Répétabilité**

Un lot de souches a été testé plusieurs fois. Du point de vue identification, elle a été la même pour toutes les souches mais sur le plan de la concordance des caractères, on avait noté certaines variations. Ces variations portaient sur l'urée et la nitrate réductase mais cela n'empêchait pas d'identifier les mêmes BGNF.

## CONCLUSION

La microméthode mise au point permet une bonne identification des BGNF avec un taux de 90,91%.

Le pourcentage de concordance avec la méthode classique était de 63,64%.

La microméthode était constituée de

- 17 réactions biochimiques : ADH, urée, esculine, gélatine, nitrate, CS, CC, malonate, PDA, SH<sub>2</sub>, indole, ONPG, glucose, lactose, sorbitol, mannitol, xylose
- 1 réaction préliminaire : l'oxydase

Par contre, la méthode classique n'utilise que 11 réactions parmi les 17.

Une identification précise par la méthode classique requiert 2 à 3 jours depuis l'isolement de la souche bactérienne jusqu'à l'identification complète. Grâce à notre microméthode ce délai est limité à un jour au bout duquel, l'espèce est identifiée.

Les limites de notre microméthode résident d'une part sur le problème de diagnostic différentiel entre les *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* [11] [12] et d'autre part sur la stabilité de l'urée, de la nitrate-réductase et l'indole.

Cependant certaines modifications devront être apportées dans le cadre d'études ultérieures :

- L'utilisation d'un métabolite intermédiaire tel que le pyruvate au lieu du glucose pourrait permettre de réduire les délais de lecture.
- La sensibilité aux antibiotiques devrait être étudiée en même temps que l'identification, car outre son intérêt en clinique médicale, elle peut concourir quelquefois à l'identification des BGNF [11].
- L'augmentation de la densité de l'inoculum permettrait de renforcer la performance concernant la réduction du temps d'incubation et donc du délai de lecture tout en maintenant la spécificité à un taux élevé.
- La stabilité de l'urée, de l'indole et de la nitrate-réductase doit être étudié.
- L'addition d'un nouveau caractère acétamide.
- L'augmentation du nombre d'hydrates de carbone pour l'étude de l'assimilation des sucres.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1-ALLEN KD ,GREEN HT. hospital outbreaks of multiresistant *Acinetobacter anitratus* :an airborne mode of spread ? . J Hosp Infect 1987 ; 9 :110-119.
- 2-APPELBAUM P.C .,LEATHER D.J.  
Evaluation of the Rapid System for identification of Gram-negative,Non fermenting rods.J.Clin.Microbiol 20,1984,730-734.
- 3-A .RUPPEL, G GEIS ,W.OPFERKUCH .Department of Medical Microbiology ,Rurh -Universität Bochum, Universitäts str. 150, 44801 Bochum Germany .  
Clinical Microbiology and Infection, volume 3, supplement 2, 1997, 54.
- 4-BERGOGNE- BEREZIN E ,VIEU F, JOLY ML et al. Epidémiologie d'*Acinetobacter calcoaceticus*.Nouv Press Med 1980 ;138 :569-578
- 5-BERRIATUA (E.),MIGUEL-VIRTO (C .) URIBARREN (P.) ,JUSTE (R.),LAEVENS (S.), VANDAMME (P.)  
et GOVAN (J.R.W) : Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection . *J . Clin. Microbiol.*,2001, 39, 990-994
- 6-BOUVET PJM , GRIMONT PAD . Identification and bityping of clinical isolates of *Acinetobacter* .  
Ann Inst Pasteur Microbiol 1987 ; 138 :569-578 .
- 7-BRETT (P.J. ),DESHAZER (D .), and WOODS (D.E.) :*Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species.  
*Int. J. Syst. Bacterio .*,1998, 48, 317-320
- 8-CLAUDINE SCHUSTER, Pseudomonas et apparentés, 2000. 1-6.
- 9-COENYE (T .), HOLMES (B.),KERSTERS (K.),GOVAN(J.R.W.) and VANDAMME(P.) :  
*Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al.1960) Gillis et al. 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami et al.  
1994 are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913 ) Yabuuchi et al. 1993 and *Burkholderia plantarii* (Azegami et al. 1987) Urakami et al. 1994,respectively . *Int. J .Syst. Bacterio.*,1999, 49, 37-42.

10-CORBELLA X , PUJOL M ,AYATS J et al . Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis 1996 ;23 :329-334.

11-C .RICHARD , M . KIREDJIAN

Methode de laboratoire pour l'identification des bacilles à Gram négatif non aérobies

stricts : *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucella, Bordetella* .Inst Pasteur, 2<sup>ème</sup> édition 1995, 2, 22-26.

12-EMMANUEL BOSSIS ,PHILIPPE LEMANCEAU,XAVIER LATOUR,LOUIS GARDAN.

The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* :current status and need for revision.

Agronomie, 2000, 51-63.

13-GERNER-SMIDT P.Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex.

J Clin Microbiol 1992 ;30 :2680-2685.

14-GILLIS (T.) ,VAN (T.V.),BARDIN (R.),GOOR (M.) HEBBAR (P.)WILLEMS (A.),SEGERS (P.), KERSTERS(K.),

HEULIN (T.) et FERNANDEZ (M.P.) :Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended

description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp . nov.

For N<sub>2</sub>-fixing isolates

from rice in Vietnam.Int . J . Syst.Bacteriol.,1995 ,45, 274-289.

15-GO ES , URBAN C , BURNS J et al.Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections

sensitive only to polymixin and sulbactam.Lanced 1994 ;344 :1329-1332 .

16-HENRY (D.A.) MAHENTHIRALINGAM (E.),VANDAMME (P.), COENYE (T.) et SPEERT (D.P.) :

Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex .

J Clin. Microbiol.,2001, 39, 1073-1078.

17-J.MICHAEL MILLER and CAROLINE M. O'HARA.Substrate Utilisation Systems for the identification of Bacteria and yeasts. A.S.M 1998, 6<sup>ème</sup> édition, 10, 103-109.

18-LOTHORLARY O ,FAGON JY, HOI AB et al. Nosocomial acquisition of multiresistant



*Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. Clin Infect Dis 1995 ; 20 :790-796.

19-MARCOS MA , VILA J ,JIMENEZ DE ANTA MT.Epidemiologia de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*. Enferm Infect Microbiol Clin 1993 ; 11:29-33.

20-MARCOS MA , VILA J ,JIMENEZ DE ANTA MT .Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* .J Med Microbiol 1995 ; 42 :328-335.

21-MARQUES MB ,BROOKINGS ES , MOSER SA et al. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. Antimicrob Agents Chemother 1997 ;41 :881-885.

22-M.DESMONCEAUX , J. L BALZER, S CEGNES ,R. COGNE ,R.CUZIAT,M GUICHARD.bioMérieux,France. Rapid identification of Gram negative rods with the Vitek II Syst. Clinical Microbiology and Infection, volume 3, supplement 2, 1997, 53-54.

23-PATON R ,MILES RS,HOOD J et al. ARI I :b-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrobial Agents 1993 ; 2 :81-88

24-PATTERSON JE , VECCHIO J, PANTELICK EL et al. Association of contaminated gloves with transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var . anitratus in an intensive care unit. Am J Med 1991 ; 91 :479-483.

25-SATO K ,NAKAE T.Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implementation in antibiotic resistance.J Clin Microbiol 1991 ;28 :35-45.

26-SECONDS (C.), MARTY (N.),DOURNES(J.L.) et CHABANON (G.) :*Burkholderia cepacia* dans tous ses états. Méd. Infect., 1998, 28 (spécial), 72-78.

27-SCERPELLA EG, WANGER AR, ARMITIGE L et al.Nosocomial outbreak caused by a multiresistant clone

of *Acinetobacter baumannii*: results of the case-control and molecular epidemiologic investigations.

Infect Control Hosp Epidemiol 1995 ; 16 :92-97 .

28-TANKOVIC J , LEGRAND P ,DE GATINES G et al. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter* by phenotypic and genotypic typing methods. J Clin Microbiol 1994 ;32 :2677-2681.

29-VANDAMME (P.), HOLMES (B.), VANCANNEYT (M .) ,COENYE (T .),HOSTE (B .),COOPMAN (R.)

REVETS (H.), LAUWERS (S.),GILLIS (M.), KERSTERS (K.),and GOVAN (J.R.W.) :Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp.

nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1997, 47 ,1188-1200.

30-VILA J , MARCOS MA ,JIMENEZ DE ANTA MT.A comparative study of different PCR-based DNA

fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A.baumannii* complex .J Med Microbiol 1996 ; 44 : 482-489.

31-VILA J ,RUIZ J , GONI P et al. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of

*Acinetobacter baumannii* .J Antimicrob Chemother 1997 ; 39 : 757-762.

32-YABUUCHI (E.),KOSAKO (Y.),OYAIZU (H.), YANO (I.),HOTTA (H.),HASHIMOTO (Y.),

EZAKI(T.) :Proposal of *Burkholderia* gen. Nov.and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas*

homology group II to the new genus,with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981)

co mb. nov. Microbiol.Immunol., 1992, 36, 1251-1275.