

Les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance s'explique aussi bien par la variété des espèces bactériennes qui les composent qu'à leur incidence au niveau de la santé des populations.

La fréquence, la gravité des infections dont elles sont responsables (septicémies, infections nosocomiales, méningites...), traduisent des difficultés de prise en charge liées entre autres à des difficultés d'identification et à leur résistance aux antibiotiques.

On les rencontre dans les prélèvements d'origine diverse, mais particulièrement dans les urines et les prélèvements sanguins qui constituent une part très importante des activités du laboratoire de Bactériologie.

La famille des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires compte actuellement plus de 100 espèces bactériennes. Mais dans les laboratoires ne sont isolées, avec une certaine fréquence, qu'une vingtaine d'espèces bactériennes qui peuvent présenter un intérêt médical, voire même être potentiellement pathogènes et qui doivent être identifiées correctement quels que soient les moyens techniques mis en œuvre.

Ainsi, la mise au point de méthodes d'identifications devient une nécessité.

Le but de notre travail a été d'élaborer un algorithme pour permettre aux structures de santé de suivre une démarche simple, rapide et cohérente pour une bonne identification des espèces d'entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

I – LES ENTEROBACTERIES

I – 1 – DEFINITION [13, 18, 40]

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend de nombreux genres bactériens répondant à la définition suivante :

- bacilles à Gram négatif
- immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche
- aérobies anaérobies facultatifs
- se développant aisément sur milieu ordinaire
- fermentant le glucose
- ne possédant pas d'oxydase
- possédant une catalase à l'exception de *Shigella dysenteria*
- réduisant les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi *Erwinia*).

Le contenu en G + C p. 100 de leur ADN est échelonné de 39 à 59 moles p. 100, ce qui permet de les différencier des *Pseudomonas* et des *Vibrionaceae* [17, 40].

I – 2 – TAXONOMIE

I – 2 – 1 – Historique [16, 17, 45]

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

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

Les travaux des équipes de DON BRENNER et de Patrick A.D. GRIMONT ont permis une véritable explosion de cette famille avec un très grand nombre de nouveaux genres et espèces décrits depuis une vingtaine d'années.

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

En 1973, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés. En 1985, FARMER et COLL décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

I – 2 – 2 – Habitat [11, 15]

Le nom d'entérobactéries a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux.

Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif des Entérobactéries pouvant proliférer en abondance dans l'environnement (sols et eaux) et participer aux grands cycles de dégradation des matières organiques.

I – 2 – 3 – Classification

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

On peut les classer dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquents en clinique humaine [48]

		Genre	Espèces
GROUPE I	<i>EDWARDSIELLEAE</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>SALMONNELLEAE</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
GROUPE II	<i>ESCHERICHIEAE</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>LEVINEAE</i>	<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>KLEBSIELLEAE</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	
GROUPE IV	<i>PROTEAE</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
GROUPE V	<i>YERSINIEAE</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

I – 3 – LES CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

I – 3 – 1 – Les caractères morphologiques [5, 7, 15, 40]

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique de type bacilles à Gram négatif de 2-3 μ de long sur 0,6 μ de large, généralement polymorphes.

Les espèces mobiles les plus nombreuses le sont grâce à une ciliature péritriche.

Certaines sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia Pestis*).

La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsiella*.

La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des *fimbriae* ou *pili* qui sont des facteurs d'adhésion.

I – 3 – 2 – Les caractères culturaux [5, 11, 15, 48]

Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose.

Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose.

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

Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes.

Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme.

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

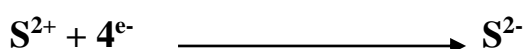
I – 3 – 3 – Les caractères biochimiques

C'est sur l'étude des caractères biochimiques que repose en pratique le diagnostic de genre et d'espèce qui ne doit être abordé qu'après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude [40].

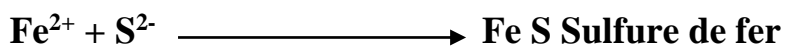
I – 3 – 3 – 1 – Production de SH₂ (Hydrogène sulfuré)

La production de SH₂ par les microorganismes est mise en évidence par incorporation du fer ou de plomb dans le milieu destiné à cette étude.

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



Ce soufre réduit va se combiner avec le fer ferreux Fe²⁺ selon la réaction :

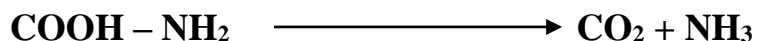


I – 3 – 3 – 2 – Recherche de l'uréase

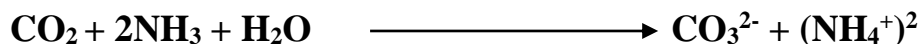
Toutes les bactéries hydrolysent l'urée



Seule une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



$\text{CO}_2 + \text{NH}_3$ se combinent et donnent du carbonate d'ammonium :

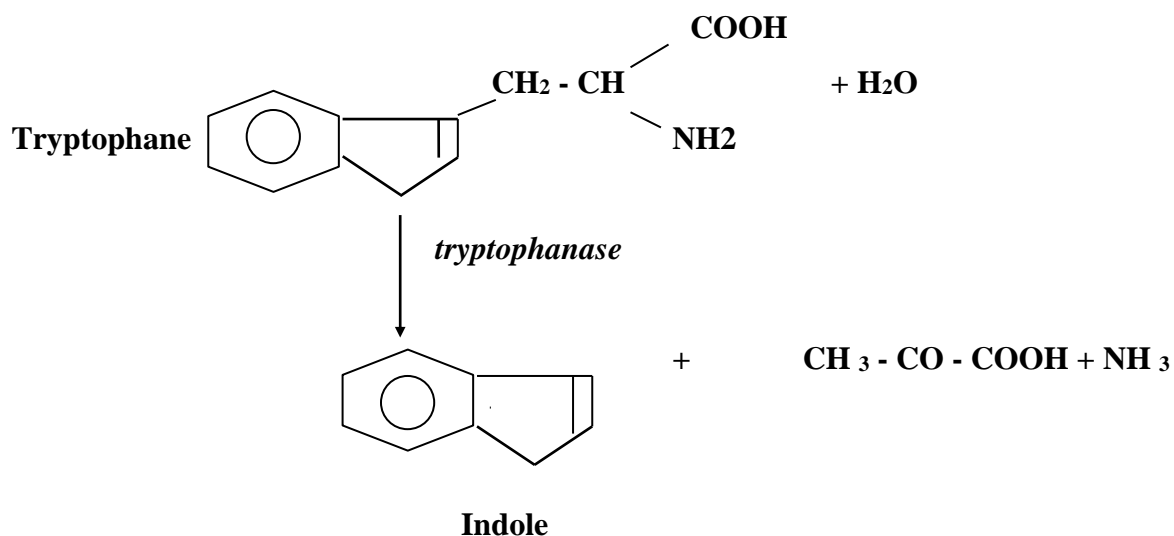


Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu, ce qui traduit le virage de l'indicateur coloré de l'orange au rose framboise ou dès fois au rouge violacé.

I – 3 – 3 – 3 – Production d'indole

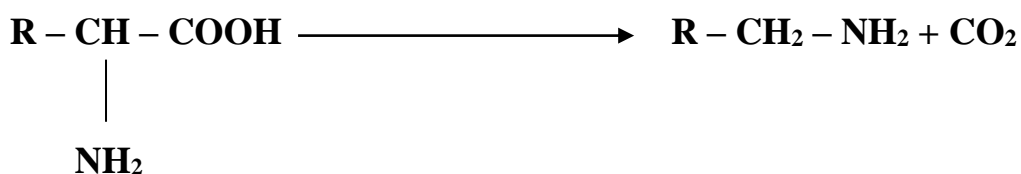
Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase. Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac.

L'indole est apolaire et réagit fortement avec le paradiméthylamino-benzaldéhyde en milieu acide et donne un anneau rouge qui remonte en surface.



I – 3 – 3 – 4 – Recherche des décarboxylases

Les décarboxylases (LDC, ODC, ADH) scindent les acides aminés, entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO₂ 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) et des conditions anaérobioses.

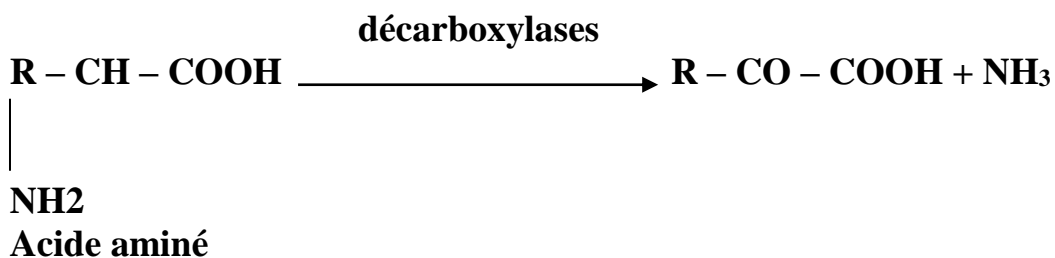
Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré (le rouge phénol) et bien entendu l'acide aminé.

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

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

I – 3 – 3 – 5 – Recherche des désaminases oxydatives

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

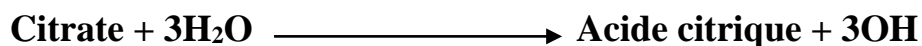


Les acides cétoniques formés ont la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe^{3+} , réaction utilisée pour la lecture.

I – 3 – 3 – 6 – Utilisation du Citrate de Simmons (CS)

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

Nous avons la réaction suivante :



I – 3 – 3 – 7 – Utilisation du malonate

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

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

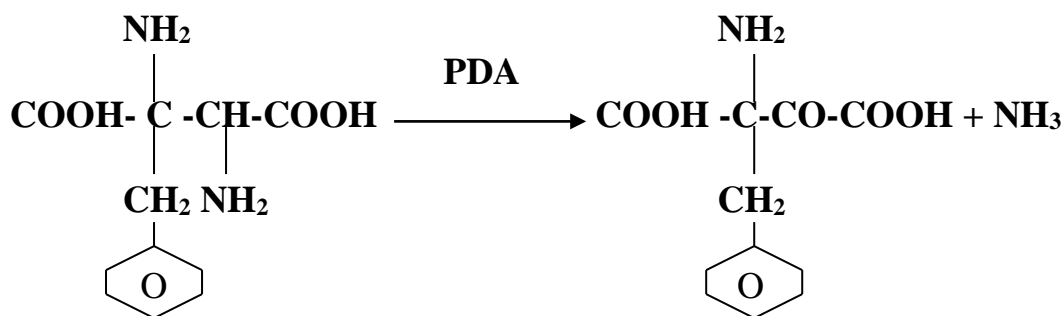
L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions OH^- alcalinisants suivant la réaction :



Acide malonique

I – 3 – 3 – 8 – Action de la Phényl Alanine Désaminase (PDA)

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



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

I – 3 – 3 – 9 – Milieu au Citrate de Christensen (CC)

A la différence 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).

I – 3 – 3 – 10 – Recherche de l'acétoïne ou Réaction Voges-Proskauer (VP)

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

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

I – 3 – 3 – 11 – Test à l'ONPG (Orthonitrophényl β -D-Galactopyranoside)

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

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

Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside ou le 2-naphtol- β -D-galactopyranoside.

Ceux-ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le β -naphtol.

I – 4 – ETUDE DES PRINCIPAUX GENRES

I – 4 – 1 – Escherichia [11, 40, 48]

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

❖ *Escherichia coli*

Hôte normal de l'intestin et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. La présence de colibacilles ou espèces voisines dans l'eau est un témoin de contamination fécale [3, 5].

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

- lactose +
- indole +
- citrate -
- acétoïne -
- H₂S- (souvent)

- gaz +
- uréase –

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

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

I – 4 – 2 – Shigella [11, 40]

Les shigelles sont des bactéries strictement humaines. Elles ne font pas partie de la flore intestinale normale. On ne les retrouve que chez les malades, les convalescents et les rares porteurs sains.

Elles sont responsables de l'historique « dysenterie bacillaire » qui décimait les armées en campagne.

Actuellement, elles sont la cause chez l'adulte de colites infectieuses et chez l'enfant de gastro-entérites sévères avec diarrhée mucopurulente et sanglante, fièvre et déshydratation.

La morphologie des shigelles est celle des entérobactéries. Elles sont toujours immobiles mais animées de mouvements pendulaires sur place. Cependant, la plupart des caractères biochimiques sont négatifs.

Les caractères antigéniques permettent de distinguer 4 espèces.

Tableau II : Les différents groupes antigéniques du genre *Shigella*

ESPECES	GROUPE	NOMBRE DE SEROTYPES
<i>Shigella dysenteriae</i>	A	10
<i>Shigella flexneri</i>	B	6
<i>Shigella boydii</i>	C	15
<i>Shigella sonnei</i>	D	1

I – 4 – 3 – *Klebsiella* [17, 31, 40]

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

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

❖ *Klebsiella pneumoniae*

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

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

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

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

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

Klebsiella pneumoniae est en général :

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

I – 4 – 4 – Proteus-Providencia [11, 48]

Au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*, le groupe *Proteus-Providencia* se distingue essentiellement par les deux caractères suivants :

- présence d'une tryptophane désaminase ;
- envahissement constant de la gélose nutritive.

Le groupe *Proteus-Providencia* est divisé en deux genres :

- le genre *Proteus* avec : *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* ;
- le genre *Providencia* : *Providencia stuartii*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri*.

Hôtes normaux du tube digestif de l'homme et des animaux, elles peuvent dans certains cas se montrer pathogènes et provoquer des infections très diverses : entérites, cystites, otites, méningites.

Ces infections sont de plus en plus fréquentes, *Proteus* étant résistant à la plupart des antibiotiques en particulier la colistine.

La morphologie est celle des entérobactéries mais le polymorphisme est très accentué (d'où le nom *Proteus*).

Il faut rappeler un phénomène caractéristique du groupe *Proteus-Providencia* : l'envahissement des milieux solides. Il consiste en un envahissement progressif de toute la surface du milieu par vagues concentriques partant du point d'inoculation.

I – 4 – 5 – Enterobacter [8, 11, 40]

Ce sont des entérobactéries VP + (production d'acétoïne) comprenant plusieurs espèces :

- *Enterobacter cloacae* est l'espèce type
- *Enterobacter aerogenes*
- *Enterobacter gergoviae*
- *Enterobacter agglomerans*
- *Enterobacter sakazakii*

Présents dans l'environnement, les *Enterobacter* sont également des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables, en milieu hospitalier surtout, d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses.

Ce sont de entérobactéries mobiles, capsulées ou non. Sur gélose, les colonies sont brillantes, opaques, souvent d'aspect assez gras.

Les principaux caractères biochimiques sont :

- gaz en glucose
- ONPG +
- Urée -
- Indole -
- ODC+.

I – 4 – 6 – Salmonella [8, 11, 48]

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

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

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

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

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

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

La plupart des salmonelles sont :

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

II – LES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES

II – 1 – DEFINITION

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation [55].

II – 2 – TAXONOMIE

II – 2 – 1 – Habitat

Environ 15 % de tous les bacilles Gram négatif se développant en aérobiose, isolés dans les laboratoires de Bactériologie Médicale, sont des non fermentaires. Deux espèces : *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* représentent jusqu'à 75 % de ces isolements.

Ces germes sont pour la plupart des pathogènes opportunistes dont l'habitat naturel est le milieu extérieur [25, 55].

II – 2 – 2 – Classification

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont à l'heure actuelle mieux classées grâce à de nombreuses études génétiques ADN-ADN ou ARN-ADN [55].

Nous pouvons distinguer un certain nombre de genres [57] :

- *Pseudomonas*
- *Burkholderia*
- *Ralstonia*

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

II – 3 – LES CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

II – 3 – 1 – Les caractères morphologiques [14, 44, 55]

Les bacilles à Gram négatif 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*).

Ils sont immobiles (*Acinetobacter*) ou mobiles.

On note la présence d'une capsule appelée *Slime* qui joue le rôle de facteur de virulence. L'observation microscopique attentive d'une culture jeune en milieu liquide permet de reconnaître le type de mobilité :

- Polaire : caractérisée par des bactéries traversant rapidement le champ microscopique de façon rectiligne sans mouvement de rotation.

- On peut avoir une mobilité polaire monotriche (*Pseudomonas aeruginosa*), une mobilité polaire multitriche (*Burkholderia cepaciae*).
- Péritriche dégénérée : bacilles mobiles par 4, 3, 2, ou même un seul flagelle mais à inertion non polaire (ciliature caractéristique de *Alcaligenes*).
- Péritriche : qui rappelle le mouvement d'une aiguille de boussole se déplaçant comme une toupie (caractéristique des *Enterobacteriaceae* mobiles).

II – 3 – 2 – Les caractères cultureux

En général, les bacilles à Gram négatif non fermentaires croissent sur 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 heures pour que les colonies soient repiquables.

Certaines de ces bactéries élaborent des pigments :

- la pyocyanine, pigment bleu-vert, est pathognomonique 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*.

II – 3 – 3 – Réaction d'oxydase

Elle est recherchée sur des cultures en milieu gélosé exempt de sucres fermentescibles ou de sang : TSA, gélose MH.

C'est une réaction qui peut se faire à l'aide de disques prêts à l'emploi du commerce, imprégnés de réactif et conservés à 4°C.

Ces disques sont immergés dans des tubes à hémolyse contenant de l'eau distillée ou de l'eau physiologique.

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

- *Pseudomonas aeruginosa* (test instantanément positif)
- *Burkholderia cepacia* (test positif après 20 à 30 s)
- *Acinetobacter* ou *Enterobacteriaceae* (test négatif)
- *Stenotrophomonas maltophilia* (test positif très tardivement).

II – 3 – 4 – Type respiratoire

Ce sont des germes aérobies stricts ou exigeants en oxygène. Elles respirent en aérobiose par phosphorylation oxydative.

Certaines espèces peuvent se multiplier au sein d'une gélose contenant des nitrates : c'est la dénitrification.

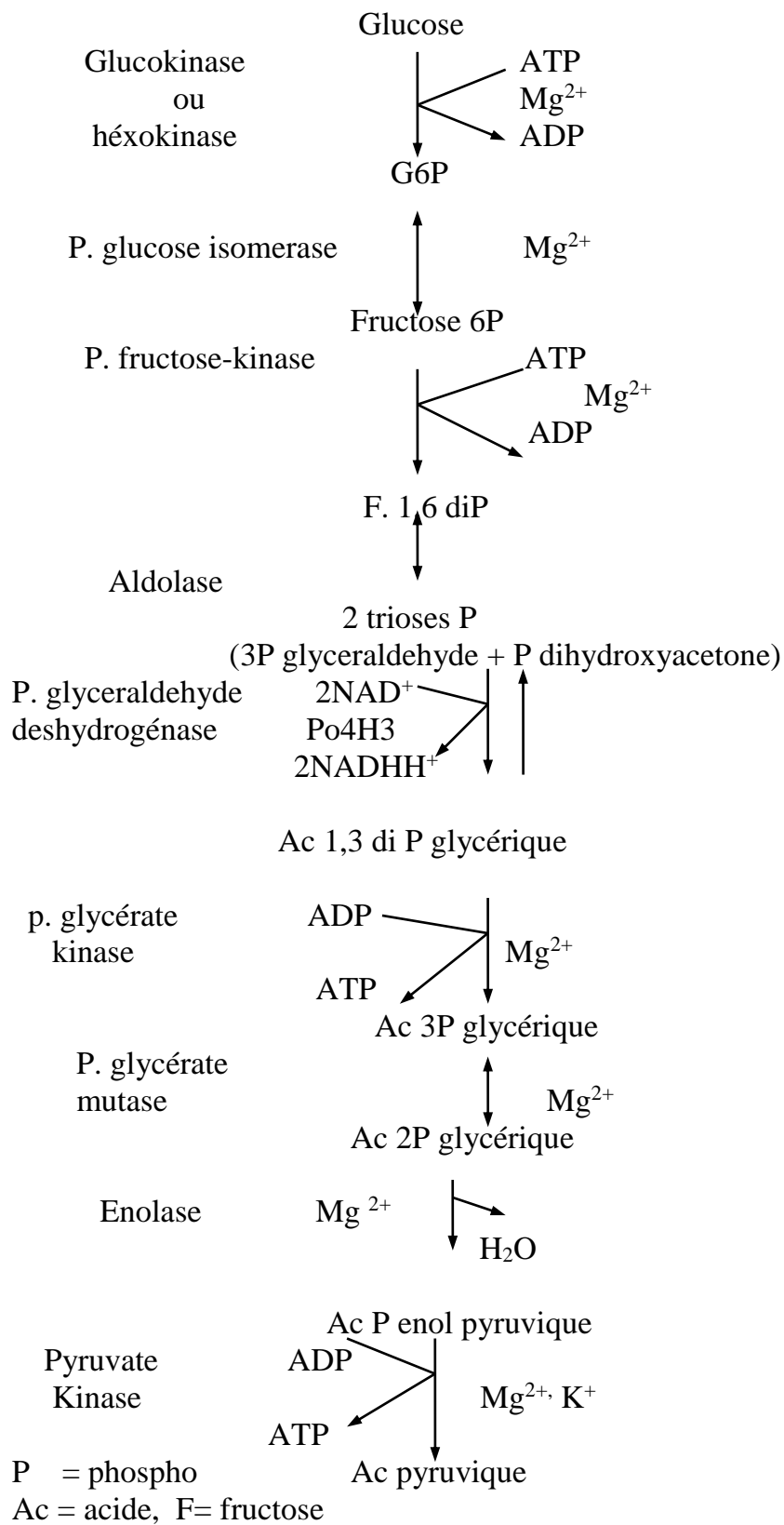
Ces germes ne fermentent jamais le glucose mais peuvent l'attaquer par voie oxydative ou bien être inactifs vis-à-vis de ce sucre [38].

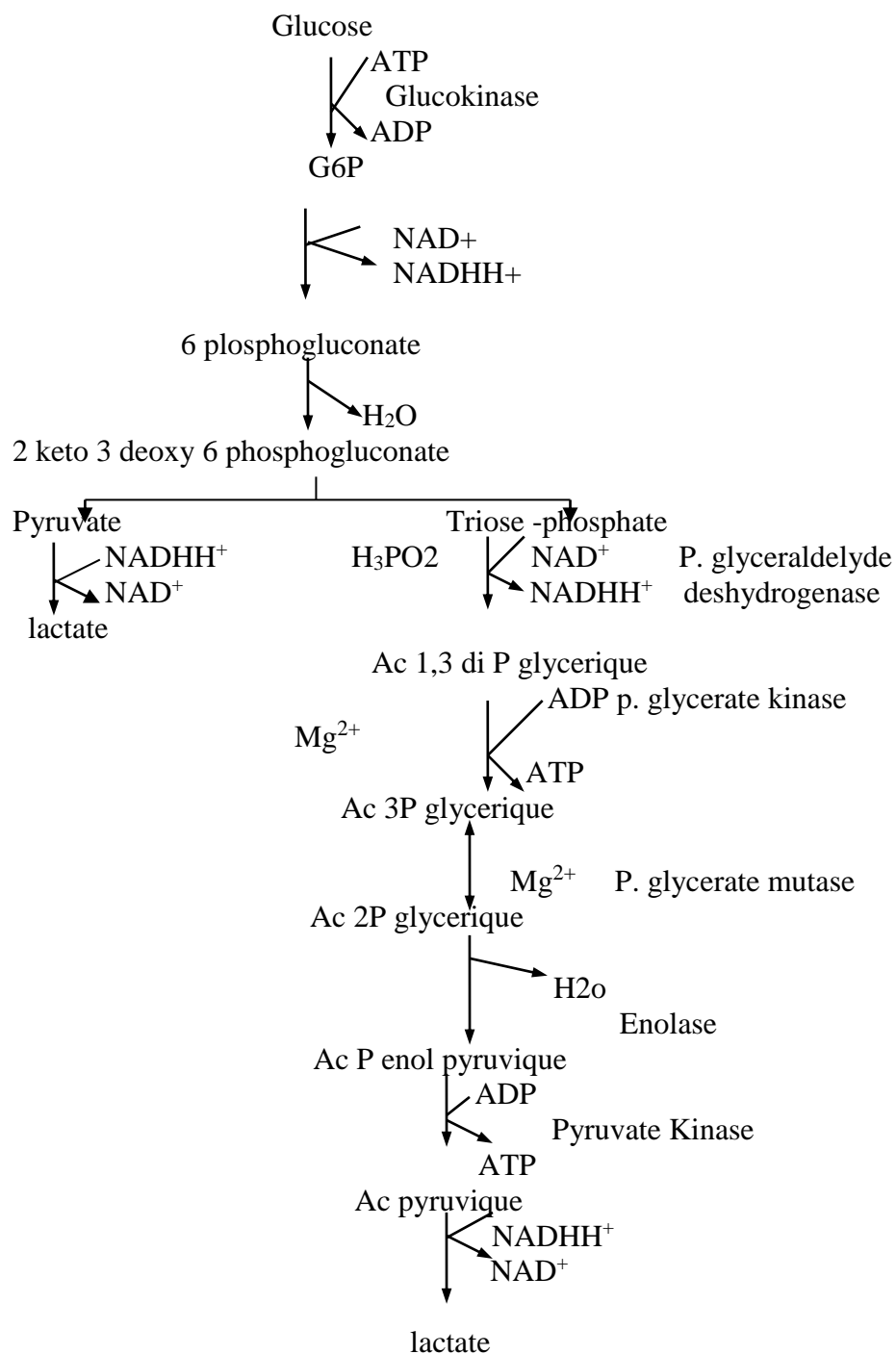
II – 3 – 5 – Les caractères biochimiques

II – 3 – 5 – 1 – Métabolisme glucidique

Comme voie métabolique, les bacilles à Gram négatif non fermentaires utilisent surtout la voie d'Etner Doudoroff mais peuvent également attaquer le glucose par la voie d'Emden Meyeroff [20].

Voie d'Embden Meyerhof





P = Phospho
Ac = Acide

Voie d'Etner Doudoroff

II – 3 – 5 – 2 – Attaque de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine rompt la liaison glucosidique et libère du glucose et de l'esculetine qui donne une coloration noire en présence de sels de fer.

II – 3 – 5 – 3 – Réduction des nitrates

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

Ces derniers, en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose en présence d'acide sulfanilique et d' α -naphtylamine (Réaction de GRIESS).

Cependant, pour la recherche des décarboxylases, de l'uréase, du citrate dans le milieu de Simmons et dans le milieu de Christensen, du malonate, de la phénylalanine désaminase, de l'hydrogène sulfuré, de l'indole, de la gélatine et de l'ONPG, il faut se référer aux caractères biochimiques des entérobactéries.

II – 4 – ETUDE DES PRINCIPAUX GENRES

II – 4 – 1 – Pseudomonas [11, 26, 55, 57]

Ce sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, oxydase positive, non fermentaires, mobiles par une ciliature polaire (quelques exceptions), respirant ou non les nitrates, oxydant ou non le glucose, accumulant ou non du polyb β -hydroxybutyrate (PHB).

Les espèces les plus fréquemment isolées en milieu médical sont : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*..

❖ *Pseudomonas aeruginosa*

Communément appelé bacille pyocyanique (mot grec : bacille agent du pus bleu), c'est la principale espèce du genre *Pseudomonas* de par sa fréquence et sa présence dans de nombreuses niches écologiques (eaux, végétaux, sols).

C'est un petit bacille fin, à Gram négatif, mobile grâce à une ciliature de type polaire monotriche en « vol de moucheron », oxydase positive.

La culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose au sang TSA, MH est caractérisée par une odeur aromatique et la production de pigments (pyocyanine, pyoverdine). Sur le milieu Kligler-Hajna, on observe le brunissement de la pente et l'aspect métallisé de la culture [13, 14, 15].

Pseudomonas 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 :

- cytotoxine nécrosante ;
- exotoxine protéique.

❖ *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*

Les premiers travaux relatifs à la taxonomie de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* étaient basés sur la caractérisation phénotypique des bactéries (tests métaboliques, composition des acides gras, profil protéique).

Ces études ont abouti à la subdivision de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* respectivement en 5 et 2 biovars .

La classification de la taxonomie de *Pseudomonas fluorescens* et de *Pseudomonas putida* requiert des recherches complémentaires qui assurent des méthodes phénotypiques récents et génotypiques [57].

II – 4 – 2 – Acinetobacter [42, 57]

Les *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquistes par excellence, mais on les rencontre également sur les revêtements cutanés de l'homme et des animaux.

Acinetobacter johnsonii fait partie de la flore cutanée normale.

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 en courtes chaînettes, accompagnés de formes de cocci plus ou moins nombreux, plus rarement de formes allongées et massues dites « formes souffrantes » dont la formation serait favorisée par l'agitation des cultures.

Les *Acinetobacter* croissent bien sur les milieux de culture de routine avec une température optimale de 33 à 35°C.

Sur gélose de Drigalski, les colonies d'*Acinetobacter* sont lactose négative, lisse, à bordure nette.

Sur TSA, les colonies présentent le même aspect, avec une réaction d'oxydase négative et une réaction de catalase positive.

II – 4 – 3 – Burkholderia [11, 14, 27, 40]

Ce sont des bacilles Gram négatif droits, mobiles, grâce à un ou plusieurs flagelles polaires ou immobiles (*Burkholderia mallei*) aérobies stricts, catalase positive, oxydase variable selon les espèces et accumulant généralement des granulés de PHB.

Cependant, on distingue :

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

❖ *Burkholderia cepacia*

Anciennement appelé *Pseudomonas kingii* et *Pseudomonas multirovans*, *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, mobile grâce à une ciliature de type polaire multitriche mais ses mouvements ressemblent souvent à ceux d'une bactérie à ciliature péritriche comme les entérobactéries.

❖ *Burkholderia pseudomallei*

Burkholderia pseudomallei ou bacille de Whitmore, découvert en 1912, est l'agent de la mélioïdose ou fausse morve.

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 orange vif.

Il pousse à 37°C et 42°C sur gélose nutritive, sur gélose au sang mais sans hémolyse, sur EMB, sur Drigalski et Mac Conkey.

❖ *Burkholderia mallei*

C'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 est responsable de la maladie de la morve du cheval qui est très rare.

II – 4 – 4 – *Stenotrophomonas* [11, 45]

Stenotrophomonas maltophilia : c'est une bactérie ubiquiste et est responsable d'infections nosocomiales, principalement chez les immunodéprimés.

Par sa fréquence, *Stenotrophomonas maltophilia* est la seconde espèce de *Pseudomonas* isolée en milieu hospitalier après *Pseudomonas aeruginosa*.

C'est un bacille aérobie strict, assez fin, de longueur moyenne, polymorphe avec une ciliature polaire multitrèche.

II – 4 – 5 – Flavobacterium [11, 40, 55]

Ce sont des bacilles Gram négatif, aérobies stricts, immobiles, oxydase positive, pouvant ou non être pigmentés en diverses teintes de jaune.

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

Ces bactéries exigent des facteurs de croissance comme par exemple : des amino-acides, la thiamine, la biotine.

Nous pouvons citer un certain nombre d'espèces dont :

- *Flavobacterium odoratum*
- *Flavobacterium multivorum*
- *Flavobacterium spiritivorum*
- *Flavobacterium breve*

Remarque : la production d'indole par certaines espèces a une grande valeur.

II – 4 – 6 – Chryseobacterium (Ex *Flavobacterium*) [40, 55]

❖ *Chryseobacterium meningosepticum*

Chryseobacterium meningosepticum, anciennement appelé *Flavobacterium 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 néonatalogie, d'où l'importance de son identification et du choix de l'antibiotique à utiliser pour le traitement.

Ce sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, oxydase positive, courts, avec une tendance au polymorphisme.

II – 4 – 7 – Alcaligenes [11, 40, 55]

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 dégénérée. Les cultures présentent une réaction d'oxydase positive, le PHB est accumulé comme réserve intracellulaire.

❖ *Alcaligenes faecalis*

Les colonies d'*Alcaligenes faecalis* sur le milieu de Drigalski sont lactose négative, mates, entourées d'une colorette claire, d'où un aspect en « bouton de culotte ».

I – MATERIEL ET REACTIFS

I – 1 – CADRE D’ETUDE

Ce travail a été effectué à l’Unité de Recherche et de Bio-Technologie Microbienne du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l’Hôpital Aristide Le Dantec.

I – 2 – MATERIEL

I – 2 – 1 – Matériel pour la préparation des milieux

- Agitateur magnétique
- Balance de précision
- pH mètre
- Seringue
- Filtre millipore
- Micropipettes de 100 et 200 µl
- Embouts stériles
- Flacons en verre avec bouchon à vis de 5-100 et 200 µl
- Tubes stériles à bouchon de 2,5 et 5 ml
- Erlen-meyer
- Bain-marie
- Autoclave

I – 2 – 2 – Matériel d’isolement

- Anse de platine
- Boîte de pétri

- Bec bunsen
- Etuve à 37°C
- Autoclave

I – 2 – 3 – Matériel pour l'identification

I – 2 – 3 – 1 - Matériel de paillasse

- Microplaques de 20 ou 96 puits
- Micropipettes de 100 µl
- Embouts stériles de 200 et 1000 µl (max)
- Becher rempli d'eau de javel (hypochlorite de Na)
- Papier buvard
- Plateau (inoxydable de préférence)
- Etalon de Mac Farland d'échelle 2
- Anse de platine
- Emballage plastique
- Lame porte-objet

I – 2 – 3 – 2 - Matériel de laboratoire

- Bec bunsen
- Etuve
- Four à micro-ondes
- Agitateur magnétique
- Hygromètre
- Appareil de scellage
- Dessiccateur sous vide à air renouvelé
- Microscope optique

I – 2 – 4 – Matériel pour la conservation des souches

- Cryotubes avec billes
- Tubes stériles à vis
- Tubes nunc
- Portoirs
- Ecouvillons

I – 3 - REACTIFS

I – 3 – 1 - Réactifs pour l' enrichissement et l' isolement

- BTS : Bouillon Trypticase Soja
- Gélose Müller Hinton (MH)
- Gélose Trypticase Soja
- Gélose Mac Conkey
- BT : Bouillon au Thioglycolate

I – 3 – 2 – Réactifs pour l'identification

I – 3 – 2 – 1 – Substrats pour l'identification

- Glucides : glucose, mannitol, lactose, sorbitol, rhamnose, saccharose, inositol, adonitol, dulcitol
- Bleu de bromothymol, peptone trypsique, peptone bactériologique, rouge de phénol
- Chlorure de sodium
- Soude
- Bouillon nutritif

- L tryptophane, L arginine, L phénylalanine, L lysine, L ornithine
- Phosphate monopotassique et dipotassique
- Citrate trisodique, malonate de sodium
- Urée
- Alcool 95°C
- Extrait de levure
- Sulfate d'ammonium
- Sulfate de magnésium
- Phosphate d'ammonium
- Thiosulfate de sodium
- Nitrate de potassium
- Bromocrésol pourpre
- Disque ONPG
- Gélatine
- Citrate de fer ammoniacal
- Esculine
- Extrait de viande
- Acétate de Pb

I – 3 – 2 – 2 – Réactifs de révélation

- Créatinine à 1 %
- Alpha naphthol
- Acide sulfanilique à 8 g / l
- Acide alpha naphthylamine à 5 g / l
- Soude à 40 %
- Perchlorure de fer
- Kovacs
- Potasse à 10 %

I – 3 – 3 – Réactifs pour la conservation des souches

- Bouillon cœur-cerveille + glycérol
- Lait écrémé + glycérol
- Eau peptonée + glycérol
- Gélose MH (Müller Hinton)
- Billes en tubes

II – CONSTITUTION DES DIFFERENTS MILIEUX

II – 1 – MILIEUX D'ENRICHISSEMENT ET D'ISOLEMENT

II – 1 – 1 – Bouillon Trypticase Soja

C'est le milieu de régénération des souches conservées à -20°C ou à -70°C.

- **Formule**

Trypticase Soja	0,3 g
Eau distillée	100 ml

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Laisser refroidir puis répartir dans des tubes à vis.

II – 1 – 2 – Milieu Mac Conkey

L'utilisation de ce milieu est recommandé pour isoler et dénombrer les entérobactéries dans les eaux, le lait, les matières alimentaires, les urines et pour rechercher *Salmonella* et *Shigella*.

Le cristal violet contenu dans ce milieu inhibe la croissance des bactéries à Gram positif.

- **Formule**

Peptone bactériologique	20 g
Sels biliaires	1,5 g
Chlorure	5 g
Lactose	10 g
Rouge neutre	0,03 g
Crystal violet	0,001 g
Agar	15 g
pH	7,1

- **Préparation**

Verser 51,5 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Ramener à 50°C puis couler en boîtes de pétri ; après solidification, laisser sécher à l'étuve à 37°C (couvercle entrouvert).

- **Utilisation**

Ensemencement en surface de manière à obtenir des colonies bien isolées.

Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

Pour effectuer des numérations d'entérobactéries, l'inoculum non dilué de 1/10 est versé sous un volume de 10 ml dans les boîtes de pétri.

Le milieu Mac Conkey, liquéfié et ramené à 45°C, sera ensuite versé dans la boîte et mélangé à l'inoculum.

- **Lecture**

Colonie « lactose négative » incolore.

Colonies « lactose positive » rouge brique, entourées d'un halo opaque de sels biliaires précipités. La conservation se fait à 4°C.

II – 2 – CONSTITUTION DES MILIEUX D'IDENTIFICATION

II – 2 – 1 – Sucres

Tableau III : Préparation des sucres

Glucides		Stérilisation	Température et Durée
Lactose	10 %	Tyndalisation ou filtration	60°C 30 minutes x 3j
Glucose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Mannitol	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Saccharose	10 %	Tyndalisation ou filtration	60°C 30 minutes x 3j
Sorbitol	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Rhamnose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Adonitol	5 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Dulcitol	2 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Inositol	5 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Xylose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes

II – 2 – 2 – MEVAG (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides)

➤ Préparation de l'eau peptonée

• Formule

Peptone tryptique	1,5 g
NaCl	0,5 g
Eau distillée	100 ml

Le milieu a été ajusté à pH 7,4 puis autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

➤ **Préparation du bleu de bromothymol**

• **Formule**

Bleu de bromothymol	0,2 g
Soude 0,1 N	5 ml
Eau distillée	95 ml

On ajoute de l'eau distillée pour avoir 100 ml. Stérilisation par autoclavage à 110°C pendant 10 minutes. Pour préparer le MEVAG complet, on ajoute 1 à 4 ml de bleu de bromothymol à 100 ml d'eau peptonée.

II – 2 – 3 – Milieu de CLARKS et LUBS (Voges Proskauer)

• **Formule**

Peptone tryptique	7 g
Phosphate dipotassique	5 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1000 ml

Le milieu est ajusté à pH 7 puis on autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

II – 2 – 4 – Milieu de recherche des décarboxylases

• **Formule**

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

Le milieu est ajusté à pH 6,3-6,4 et autoclavé à 120°C pendant 15 minutes.

NB : ajouter l'acide aminé à 4 % quand c'est sous la forme DL.

II – 2 – 5 – Milieu de recherche de l'uréase

• Formule

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

La stérilisation se fait par filtration.

II – 2 – 6 – Milieu pour la mise en évidence de la gélatine

➤ Préparation de la gélatine

Gélatine	15 g
Eau distillée	100 ml

La solution est chauffée au bain-marie bouillant jusqu'à la dissolution complète, refroidie à 45°C. Ensuite, on ajoute en mélangeant activement 4 g de charbon de bois en poudre fine.

Le moulage se fait dans les moules de 0,5 cm sur une surface horizontale puis porté une demi 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 0,5 cm de côté qui sont rincés dans de l'eau courante pendant 24-48 heures pour éliminer le formol.

Les cubes lavés sont introduits dans des flacons contenant de l'eau distillée pour être tyndalisés 1 heure à 60°C, 3 jours de suite.

II – 2 – 7 – Milieu au Citrate de Simmons

- **Formule**

Sulfate de Mg	0,04 g
Phosphate mono ammonique	0,02 g
Phosphate dipotassique	0,2 g
Citrate trisodique	0,4 g
NaCl	1 g
Bleu de bromothymol	0,016 g
Eau distillée	100 ml

La dissolution se fait à chaud, le pH est ajusté à 7 et la stérilisation se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

II – 2 – 8 – Milieu au Citrate de Christensen

- **Formule**

Extrait de levure	0,1 g
Citrate de Na	0,16 g
Glucose	0,04 g
Chlorhydrate de L cystéine	0,02 g
Phosphate monopotassique	0,2 g
NaCl	1 g
Rouge phénol	0,004 g
Eau distillée	100 ml

Le pH est ajusté à 6,5 et la stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

II – 2 – 9 – Milieu pour la recherche de H₂S et de l'indole (SI)

• Formule

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

On ajuste le pH à 7 et l'autoclavage se fait à 120°C pendant 15 minutes.

II – 2 – 10 - Milieu au malonate et à la phénylalanine désaminase (MAL-PDA)

• Formule

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

Le pH est ajusté à 6,9 et l'autoclavage se fait à 115°C pendant 10 minutes.

II – 2 – 11 – Milieu à l'ONPG (β galactosidase)

Dix disques d'ONPG furent immergés dans 5 ml d'eau distillée, puis le milieu obtenu fut vortexé pour favoriser l'élution des disques.

II – 2 – 12 – Milieu pour la mise en évidence de l'attaque de l'esculine

- Formule

Peptone	2 g
Citrate de fer ammoniacal	0,2 g
Esculine	0,2 g

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

II – 2 – 13 – Milieu pour la recherche de la nitrate réductase

Il s'agit d'un bouillon nutritif nitraté.

- Formule

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

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

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

II – 3 – CONTROLE DE QUALITE DES MILIEUX LIQUIDES

Après avoir préparé les milieux, il était nécessaire de s'assurer de la stérilité et de l'efficacité des différents milieux.

II – 3 – 1 – 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 – 3 – 2 – 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.

Tableau IV : Contrôle d'efficacité des substrats des microplaques CSB entérobactéries et bacilles à Gram négatif non fermentaires

Substrats	Témoins positifs	Témoins négatifs
LDC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i>
ODC	<i>Enterobacter cloaceae</i>	<i>Klebsiella</i>
ADH	<i>Enterobacter cloaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>
UREE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
VP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
GEL	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
CS	<i>Klebsiella</i>	<i>Escherichia coli</i>
CC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
H ₂ S	<i>Salmonella Thyphi</i>	<i>Escherichia coli</i>
IND	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MAL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
PDA	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>
ONPG	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigelli flexneri</i>
NIT	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus conhii</i>
ESC	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus A</i>
LAC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
GLU	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
MAN	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SAC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SOR	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
RHAM	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ADO	<i>Enterobacter cloaceae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
DUL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
INO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
XYL	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

II – 4 – DESHYDRATATION DES MILIEUX

➤ Préparation

Les milieux déshydratés ont été préparés après avoir obtenu et contrôlé la stérilité et l'efficacité des milieux liquides.

➤ Distribution des milieux

Nous avons réparti les milieux liquides préalablement préparés dans les puits des microplaques, à raison de 100 µl par substrats (milieux).

Nous avons fait la distribution selon le dispositif suivant :

Tableau V : Disposition de la microplaque des entérobactéries

LDC	ODC	ADH	UREE	VP
GEL	CS	CC	H ₂ S / IND	MAL / PDA
ONPG	LAC	GLU	MAN	SAC
SOR	RHA	ADO	DUL	INO

Tableau VI : Disposition de la microplaque des bacilles à Gram négatif non fermentaires

NIT	UREE	MAL / PDA	ADH	CS
CC	ESC	GEL	H ₂ S / IND	ONPG
GLU	LAC	SOR	MAN	XYL

➤ **Déshydratation des milieux**

Après répartition dans les microcupules, nous avons déshydraté les milieux liquides au four à micro-ondes en présence d'un dessiccateur.

La température est de 37°C pendant 48 heures.

II – 5 – CONTROLE DE QUALITE DES MILIEUX DESHYDRATES

Une fois qu'un lot de milieux déshydratés a été préparé, il est nécessaire de s'assurer de la stérilité et de l'efficacité de ces lots de milieux.

II – 5 – 1 – Contrôle de stérilité

Il est basé sur la mise en évidence de l'absence de souillures des milieux préalablement déshydratés.

Pour les entérobactéries, les cupules renfermant des milieux allant de LDC à ONPG ont été inoculés avec de l'eau physiologique stérile et ceux de LAC à INO avec le MEVAG Entérobactéries.

Pour les bacilles à Gram négatif non fermentaires, les cupules renfermant les substrats de NIT à ONPG ont été inoculés avec de l'eau physiologique et ceux allant de GLU à XYL avec le MEVAG Entérobactéries.

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

LDC Eau physiologique stérile	ODC Eau physiologique stérile	AD Eau physiologique stérile H	UREE Eau physiologique stérile	VP Eau physiologique stérile
GEL Eau physiologique stérile	CS Eau physiologique stérile	CC Eau physiologique stérile	H ₂ S / IND Eau physiologique stérile	MAL / PDA Eau physiologique stérile
ONPG Eau Physiologique stérile	LAC MEVAG	GLU MEVAG	MAN MEVAG	SAC MEVAG
SOR MEVAG	RHAM MEVAG	ADO MEVAG	DUL MEVAG	INO MEVAG

Tableau VIII : Plan de contrôle de stérilité des microplaques CSB Bacilles à Gram négatifs non fermentaires (BGN NF)

NIT Eau physiologique	UREE Eau physiologique	MAL / PDA Eau physiologique stérile	ADH Eau physiologique stérile	CS Eau physiologique stérile
CC Eau physiologique stérile	ESC Eau physiologique stérile	GEL Eau physiologique stérile	H ₂ S / IND Eau physiologique stérile	ONPG Eau physiologique stérile
GLU MEVAG	LAC MEVAC	SOR MEVAC	MAN MEVAG	XYL MEVAG

II – 5 – 2 – Contrôle d'efficacité (cf. contrôle d'efficacité des milieux liquides)

III – LES REACTIFS DE REVELATION

- Soude à 40 % (ou KOH 10 %)
- Alpha naphtol
 - Naphtol 6 g
 - Ethanol 100 ml
- Perchlorure de Fer au 1/3
 - Perchlorure de fer officinal 10 ml
 - Eau distillée 20 ml
- Réactifs de Kovacs
 - P-diméthylamino-benzaldéhyde 5 g
 - Alcool amylique 75 ml
 - HCl pur 25 ml

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.

- Acide sulfanilique à 8 g / l
 - Acide sulfanique 0,8 g
 - Ethanol 100 ml
- Alpha-naphtylamine à 5 g / l
 - Alpha-naphtylamine 0,5 g
 - Ethanol 100 ml

IV – METHODOLOGIE

IV – 1 – LES SOUCHES ETUDIEES

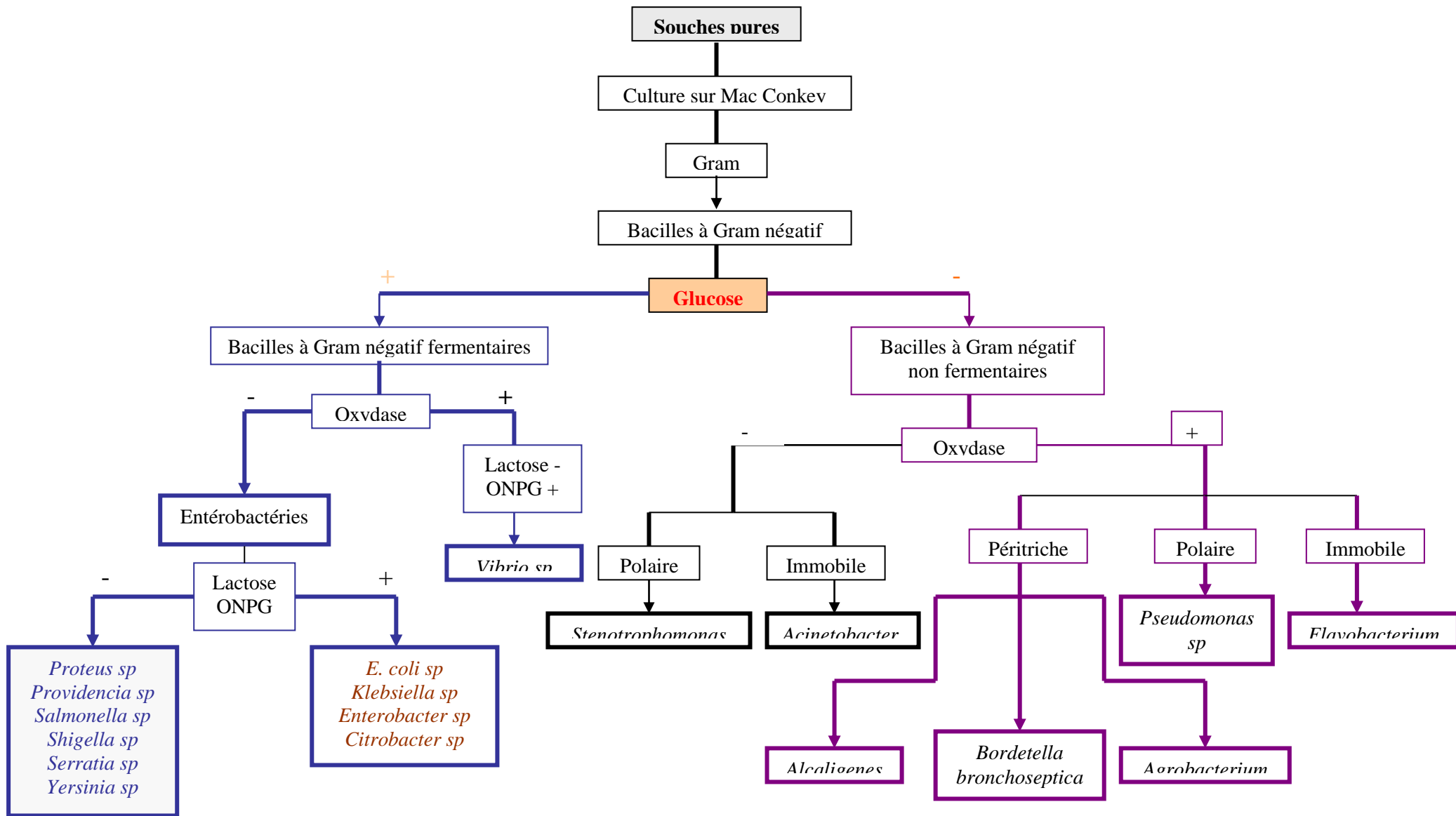
L'évaluation a porté sur des souches déjà identifiées par des méthodes conventionnelles. Nous avons eu à identifier 39 souches d'entérobactéries et 4 souches de bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Tableau IX : Répartition des souches d'entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

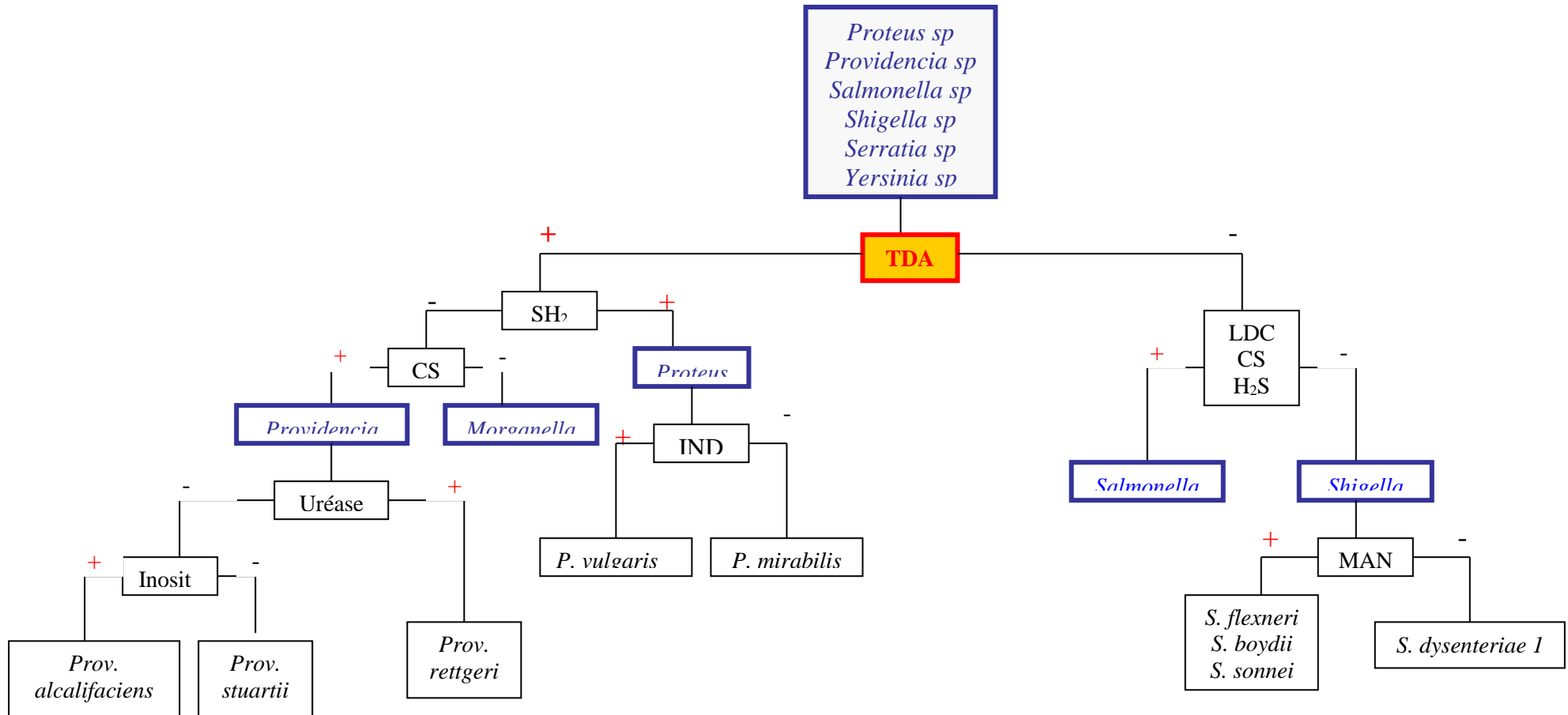
Famille	Espèces	Nombre de souches
Entérobactéries	<i>Escherichia Coli</i>	21
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	05
	<i>Shigella flexneri</i>	01
	<i>Salmonella Thyphi</i>	01
	<i>Proteus mirabilis</i>	01
	<i>Proteus vulgaris</i>	01
	<i>Enterobacter cloaceae</i>	02
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	01
	<i>Citrobacter koseri</i>	02
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	02
	<i>Providencia stuartii</i>	02
	Bacilles à Gram négatif non fermentaires	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		01
<i>Flavobacterium</i>		01
<i>Acinetobacter</i>		01
TOTAL		43

IV – 2 - ALGORITHMES D'IDENTIFICATION

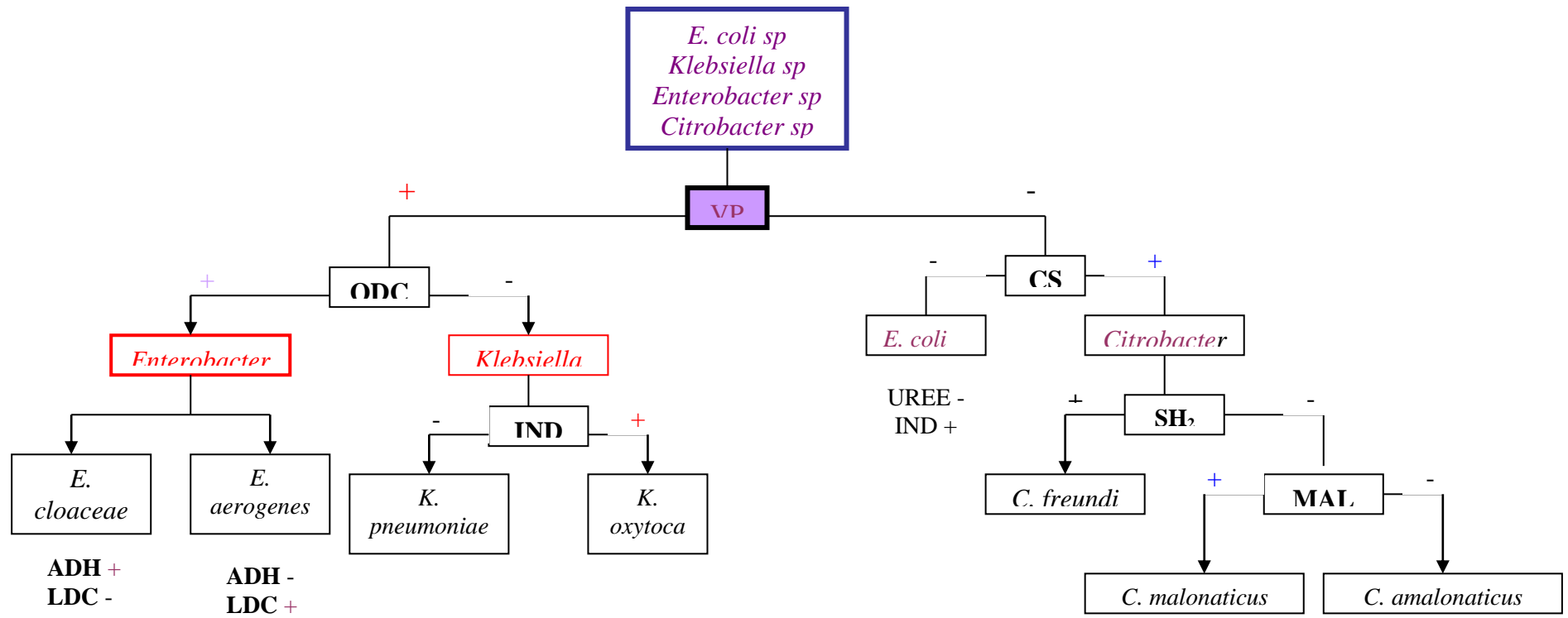
Algorithme d'identification des principaux genres de bacilles à Gram négatif



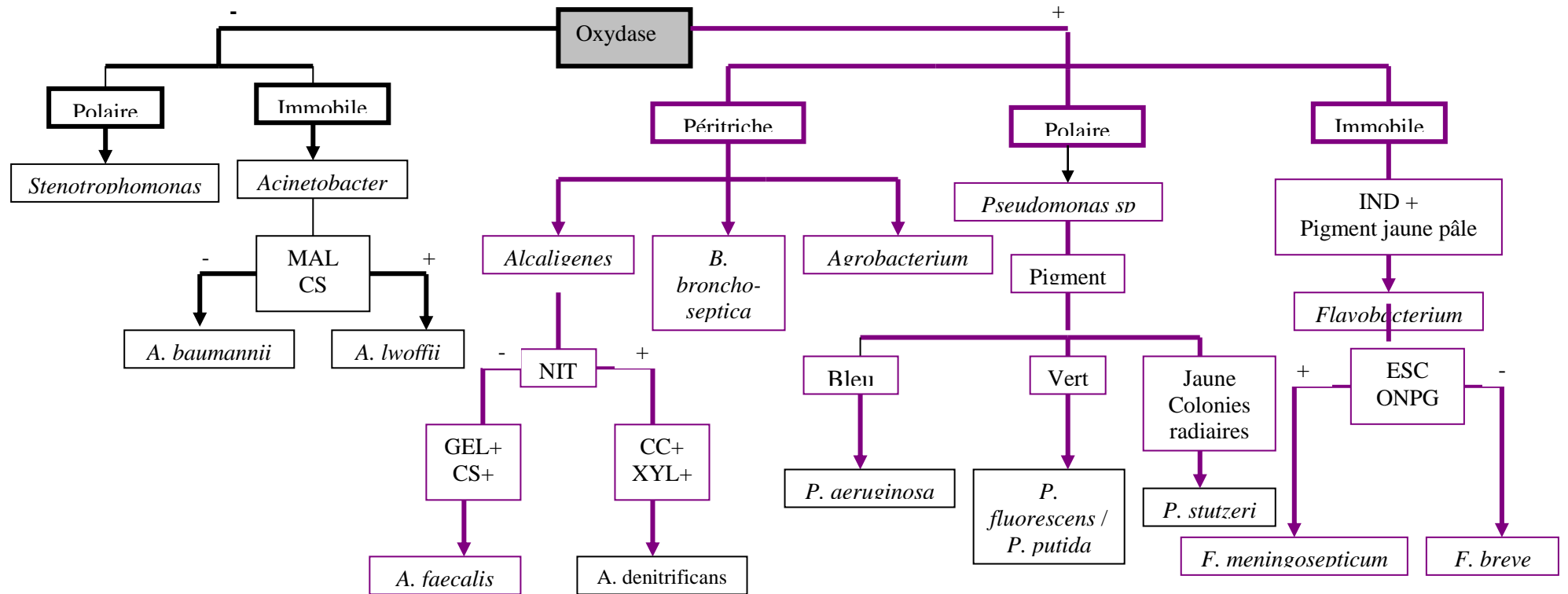
Algorithme d'identification des entérobactéries lactose négative



Algorithme d'identification des entérobactéries lactose positive



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



IV – 3 – IDENTIFICATION DES SOUCHES BACTERIENNES

Il s'agissait de suivre les différentes étapes décrites dans l'algorithme pour identifier les souches précédemment citées.

IV – 3 – 1 – Isolement

En vue des colonies des germes à identifier, les souches conservées à – 20°C ou à -70°C ont été régénérées dans un bouillon d'enrichissement (BTS), puis ensemencées sur la gélose Mac Conkey. L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

IV – 3 – 2 – Identification

IV – 3 – 2 – 1 – Tests préliminaires

IV – 3 – 2 – 1 – 1 - Examen macroscopique

Après ensemencement sur la gélose Mac Conkey et incubation à l'étuve à 37°C en 24 heures, certaines bacilles à Gram négatif se présentent comme suit :

- *Escherichia coli* se présente sous forme de grosses colonies sèches, lactose positive, à contour irrégulier.
- *Klebsiella pneumoniae* : grosses colonies muqueuses, lactose positive, ressemblant à des gouttes de miel.
- *Proteus* : envahit la gélose par ondes successives et concentriques.
- Les *Enterobacter* donnent des colonies lactose positive, légèrement bombées et muqueuses.

- Les *Pseudomonas* donnent des colonies lactose négative, « œuf sur le plat » avec des pigments (bleu-vert pour *Pseudomonas aeruginosa*) et possèdent une odeur caractéristique (acacia ou seringa).
- *Flavobacterium* : produit des pigments allant du jaune pâle au jaune orangé.
- Les colonies d'*Acinetobacter* sont lactose négative, lisses à bordures nettes.

IV – 3 – 2 – 1 – 2 – Examen microscopique

❖ Etat frais

• Principe

L'examen direct à l'état frais permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur groupement, leur abondance et d'observer leur mobilité.

• Technique

L'examen direct se réalise en déposant sur une lame porte-objet une goutte de suspension bactérienne.

Cette lame est recouverte d'une lame-couvre-objet et la préparation est examinée au grossissement x 10 puis x 40.

• Résultat

L'observation microscopique à l'état frais permet de reconnaître le type de mobilité.

Les entérobactéries se présentent sous forme de bacilles immobiles ou mobiles péritriches.

La ciliature polaire de type monotriche est caractéristique de *pseudomonas aeruginosa*.

La ciliature péritriche de type dégénérée est caractéristique des Alcaligenes.

Les *Acinetobacter* sont toujours immobiles.

❖ Coloration de Gram

• Principe

C'est la coloration de base en Bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure.

Elle est l'un des caractères essentiels de la classification des bactéries.

Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- la différence de composition chimique de bactéries
- la différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool.

• Technique

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consistent à :

- fixer le frottis
- recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane)
- rejeter le colorant puis laver à l'eau
- recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute
- rejeter le lugol puis laver à l'eau
- décolorer à l'alcool 95°
- rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir quelques secondes
- rejeter la fuchsine, laver abondamment, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres.

• Résultat

A la coloration de Gram, on voit des bacilles ou diplobacilles à Gram négatif colorés en rose.

IV – 3 – 2 – 1 – 3 – Test de catalase

- **Principe**

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.

- **Technique**

A partir des colonies prélevées avec soin sur la gélose, nous avons réalisé un frottis sur lequel on dépose quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène.

- **Résultat**

La présence de catalase se matérialise par une production de bulles. Les *Entérobactéries* sont toutes des catalases positives, à l'exception de *Shigella dysenteria*.

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont, en général, catalase positive telles que *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*.

IV – 3 – 2 – 1 – 4 – Réaction des oxydases

- **Principe**

Cette réaction est recherchée sur des cultures en milieu gélosé exempt de sucres fermentescibles ou de sang. Les bactéries possédant des oxydases en présence de sucres donnent des métabolites qui se combinent avec le réactif utilisé pour donner une coloration variable selon la bactérie.

- **Technique**

La réaction des oxydases se fait à l'aide de disques de commerce prêts à l'emploi, imprégnés d'eau distillée sur lequel on dépose une colonie.

- **Résultat**

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violet à l'endroit où on a déposé la colonie, soit immédiatement, soit quelques secondes après.

En fonction du délai d'apparition de la coloration, on a :

- Entérobactéries (test négatif)
- *Acinetobacter* (test négatif)
- *Pseudomonas aeruginosa* (test positif après 20 à 30 secondes).

IV – 3 – 2 – 1 – 5 – Détermination du type respiratoire

- **Principe**

Le principe est basé sur la croissance des bactéries dans des tubes contenant du glucose en anaérobiose et en aérobiose.

- **Technique**

La détermination du type respiratoire se déroule sur deux tubes contenant du glucose et de la suspension bactérienne, l'un ouvert, l'autre fermé.

- **Résultat**

Les entérobactéries poussent dans les deux tubes, ce qui fait d'eux des aérobies anaérobies facultatives.

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires ne se développent que dans le tube ouvert, c'est-à-dire en présence d'oxygène. Ce sont des aérobies stricts.

IV – 3 – 2 – 2 – Les méthodes classiques d'identification

IV – 3 – 2 – 2 – 1 – Le milieu Kligler-Hajna (KH)

C'est un milieu coulé en pente et en culot. Il renferme du lactose, du glucose, du thiosulfate et des ions ferreux. L'indicateur de pH est le rouge de phénol.

C'est un milieu au niveau duquel on recherche 4 caractères :

- La fermentation du glucose qui se traduit par virage au jaune du milieu qui était rouge à l'origine (culot) ;
- La fermentation du lactose sur la pente qui se traduit également par virage au jaune ;
- La présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air ;
- La production de SH_2 qui se traduit par une coloration noire.

IV – 3 – 2 – 2 – 2 – Le milieu Citrate de Simmons

Ce milieu coulé en tubes est utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes.

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

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

IV – 3 – 2 – 2 – 3 – Le milieu Mannitol-mobilité

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

Elle est ensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une anse de platine.

La fermentation du mannitol se matérialise par un virage du milieu au jaune. Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble du milieu alors que les bacilles immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement.

IV – 3 – 2 – 2 – 4 – Le milieu Urée-Indole

C'est un milieu liquide au niveau duquel on recherche trois caractères :

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

IV – 3 – 2 – 3 – Identification par la Microméthode CSB

Il s'agit d'une méthode miniaturisée permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation des sucres et de la croissance en milieu hostile.

La galerie Micro CSB entérobactéries et bacilles à Gram négatif non fermentaires permet de réaliser respectivement 22 et 17 tests biochimiques et de faire les diagnostics d'espèces de la plupart des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

IV – 3 – 2 – 3 – 1 – Principe

La technique consiste à ensemencer des microplaques constituées de cupules renfermant des substrats 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

IV – 3 – 2 – 3 – 2 – Préparation de l'inoculum

La suspension bactérienne doit avoir une turbidité égale à 0,5 sur l'échelle Mac Farland dans 1,5 ml d'eau distillée avec des colonies de 18 à 24 heures sur milieu solide.

IV – 3 – 2 – 3 – 3 – Ensemencement et incubation

Pour les entérobactéries

- Distribuer 100 µl d'inoculum bactérien par microcupule de LDC à ONPG, puis le reste de l'inoculum est mélangé et homogénéisé avec 1 ml de MEVAG Entérobactérie ; Avec cette dernière préparation ainsi obtenue, on distribue 100 µl dans les cupules allant de LAC à INO.

Pour les BGN NF

- Distribuer 100 µl d'inoculum bactérien par microcupule de NIT à ONPG, puis le reste est mélangé et homogénéisé avec 1 ml de MEVAG *Entérobactéries*.

Avec cette dernière préparation, on distribue 100 µl dans les cupules allant de GLU à XYL.

- Recouvrir les puits destinés à la recherche des décarboxylases d'uréase et des sucres avec 2 gouttes de paraffine afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire aux réactions.
- Incuber 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.
- Lire après 4 heures, puis après 18 heures d'incubation

IV – 3 – 2 – 3 – 4 – Lecture et Interprétation

La lecture repose sur le changement de la coloration initiale des différents milieux.

Cette lecture se fait soit directement, soit après l'addition de réactifs de révélation (voir tableaux X et XI).

Tableau X : Tableau de lecture des entérobactéries

Tests	Substrats	Réactions/ Enzymes	Réactifs de révélation	Résultats positifs	Résultats négatifs
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase		Rouge	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rouge	Jaune
ADH	Arginine	Arginine décarboxylase		Rouge	Jaune
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orange
VP	Glucose Pyruvate	Production d'acétoïne	VP1 + VP2	Rose-rouge	Incolore
GEL	Gélatine	Gélatine		Diffusion du charbon	Inchangé
CS	Citrate de Sodium	Utilisation du citrate		Bleu	Vert
CC	Citrate de sodium	Utilisation du citrate		Rose	Jaune claire
H2S	Sulfate de sodium	Production d'H2S		Noir	Incolore
IND	Tryptophane	Tryptophanase	1 goutte de Kovacs	Anneau rouge	Anneau incolore
MAL	Malonate de sodium	Utilisation du malonate		Bleu	Jaune vert
PDA	Phénylalanine	Phénylalanine désaminase	1 goutte de perchlorure fer	Vert	Jaune
ONPG	ONPG	β -galactosidase		Jaune	Incolore
LAC GLU MAN SAC SOR RHA ADO DUL INO	Lactose Glucose Mannitol Saccharose Sorbitol Rhamnose Adonitol Dulcitol Inositol	Fermentation		Jaune	Bleu

Tableau XI : Tableau de lecture des bacilles à Gram négatif non fermentaires

Tests	Réactifs à ajouter	Interprétation	
		Positif	Négatif
NIT	1 goutte d'acide sulfanilique 1 goutte d' α -naphtylamine \pm 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 ₂ 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

Tableau XII : Caractères d'identification des entérobactéries les plus fréquemment rencontrées dans les infections humaines

LDC	ODC	ADH	URE	VP	GEL	CS	CC	H ₂ S	IND	MAL	PDA	βGAL	LAC	GLU	MAN	SAC	SOR	RHA	ADO	DUL	INO	Espèces
-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	d	+	+	-	+	+	-	-	-	C. amalonaticus
-	-	-	-	-	-	d	+	+	-	-	-	+	d	+	+	d	+	+	d	-	-	Citrobacter freundii
-	+	d	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	d	+	+	-	+	+	d	-	-	Citrobacter koseri
+	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	d	+	+	d	+	+	-	-	-	Escherichia coli
+	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	+	d	+	+	d	+	+	-	-	-	E. coli/A. dispar
+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	Edwardsiella tarda
+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Enterobacter Aerogenes
-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Enterobacter cloacea
d	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	d	+	+	+	-	+	-	-	-	Enterobacter gergoviae
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	+	-	-	d	-	-	-	Hafnia alvei
+	+	-	+	d	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	nt	+	+	K. ornithinolytica
+	-	-	d	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	nt	+	+	K. oxytoa
d	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	d	d	nt	d	d	Klebsiella ozonae
+	-	-	d	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	Klebsiella pneumoniae
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d	d	d	nt	+	+	K. rhinoscleromatis
-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Morganella morgani
-	d	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	Pantoea agglomerans
-	+	-	+	-	+	d	d	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Proteus mirabilis
-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	Proteus vulgaris
-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	nt	-	-	Prov. alcalifaciens
-	-	-	+	-	-	d	d	-	+	-	+	-	-	+	+	d	-	d	+	+	+	Providencia rettgeri
-	-	-	d	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	Providencia stuartii
+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	Salmonella typhi
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	nt	-	-	Salmonella paratyphi
+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	d	-	-	Serratia liquefaciens
+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	d	-	d	Serratia marcescens
-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d	-	+	+	-	-	-	-	d	d	Shigella boydii
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	d	-	S. dysenteriae A1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	d	-	S. dysenteriae A2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	d	-	Shigella flexneri
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Shigella sonnei

Caractères négatifs (-) si 0-25 % des souches l'expriment

Caractères positifs (+) si 71-90 % des souches l'expriment

Caractères variables (d) si 26-70 % des souches l'expriment

Tableau XIII : Caractères d'identification biochimique des espèces de bacilles à Gram négatif non fermentaires le plus fréquemment rencontrées en clinique humaine

NIT	ESC	ADH	UREE	GEL	CS	CC	H ₂ S	IND	MAL	PDA	ONPG	GLU	LAC	XYL	SOR	MAN	Espèces
+	-	+	+	+	[+]	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>
+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
+	[-]	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	[+]	+	-	-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>
+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>Burkholderia cepacia</i>
-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
-	-	-	[+]	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Flavobacterium odoratum</i>
-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>Flavobacterium breve</i>
-	[+]	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
-	-	-	-	[+]	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Alcaligenes faecalis</i>
+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	<i>Alcaligenes denitrificans</i>

+ : Positive

- : négative

[+] : Majorité positive

[-] : Majorité négative

1 – IDENTIFICATION

Après identification des différentes souches d'entérobactéries et de bacilles Gram négatif non fermentaires par les tests de Gram, d'oxydase, de catalase et de la galerie classique, les résultats de la microgalerie CSB des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires sont représentés dans les tableaux suivants (tableaux XIV et XV):

Tableau XIV : RESULTATS DES SOUCHES D'ENTEROBACTERIES TESTEES PAR LA MICROMETHODE**CSB**

Substrats Espèces	LDC	ODC	ADH	UREE	VP	GEL	CS	CC	H ₂ S	IND	MAL	PDA	ONPG	LAC	GLU	MAN	SAC	SOR	RHAM	ADO	DUL	INO	Quantité
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	20
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	5
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	1
<i>Salmonella thyphi</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	1
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	[+]	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	[+]	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	1
<i>Enterobacter cloacea</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	1
<i>Enterobacter aerugenes</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1
<i>Citrobacter koseri</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	2
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	2
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	2

+ : positif

[+] : fortement positive

- : négatif

**Tableau XV : RESULTATS DES SOUCHES DE BACILLES GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES TESTEES
PAR LA MICROMETHODE CSB**

Substrats Espèces	NIT	UREE	MAL	PDA	ADH	CS	CC	ESC	GEL	H2S	IND	ONPG	GLU	LAC	SOR	MAN	XYL	Quantité
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	1
<i>Flavobacterium</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Acinetobacter</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	1

+ : positive

- : négative

2 – MISE AU POINT DE L'ALGORITHME

Les caractères majeurs qui ont été retenus lors de l'identification sont des caractères susceptibles de permettre une bonne identification.

Cependant, ces caractères varient en fonction des espèces étudiées :

- Isolement sur la gélose Mac Conkey
- Les réactions d'oxydase et de catalase
- La recherche des décarboxylases (ADH, ODC, LDC)
- La recherche d'uréase
- La production d'acétoïne (VP)
- L'utilisation du citrate dans le milieu de Simmons
- La production d'indole, de phénylalanine désaminase
- La recherche de β -galactosidase (ONPG)
- La mobilité des germes.

3 – VALIDATION DE L'ALGORITHME D'IDENTIFICATION [49]

Après avoir élaboré un algorithme et identifié les différentes souches dont nous disposons, il est important de s'assurer de la validité de cet algorithme.

Cette validation va porter sur l'identification de souches supposées inconnues.

Cette identification sera basée sur la mesure de similitude entre leur profil et ceux des espèces identifiables à l'aide de données recueillies (tables diagnostiques). Cependant, nous avons utilisé les résultats de la galerie API 20E et API 20NE comme références [2, 3].

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

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

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

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

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

- Si la réponse de la souche pour un test est positif, on retient f
- Si la réponse de la souche pour un test est négatif, on retient 1 – f.

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

C'est ainsi que nous allons exploiter les résultats de quelques souches pour essayer de valider notre algorithme en terme de probabilité.

3 – 1 – Identification d'*Escherichia coli*

L'étude que nous avons effectué sur l'identification des 25 souches d'*Escherichia coli* nous a permis de distinguer 2 types différents :

- 20 souches ont donné : indole +, mobilité +
- 1 souche a donné : indole -, mobilité -.

Ainsi, nous allons voir si ces résultats permettent de valider l'algorithme.

Espèces Caractères	<i>E. coli</i> 1	<i>E. coli</i> 2	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. vulneris</i>	Espèce X ₁ (<i>E. coli</i> probable)	Espèce X ₂ (<i>E. coli</i> probable)
McC	100	100	100	100	+	+
Oxydase	0	0	0	0	-	-
Catalase	100	100	100	100	+	+
ONPG	90	26	96	100	+	+
LDC	74	45	99	50	+	+
ODC	70	20	100	0	-	-
ADH	1	1	1	30	-	-
CS	0	0	1	0	-	-
UREE	3	1	0	0	-	-
H ₂ S	1	1	0	0	-	-
IND	89	50	99	0	+	-
GLU	99	99	100	100	+	+
MAN	98	90	99	100	+	+
MOB	95	5	93	100	+	-

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X₁ appartient à *E. coli* 1 = 0,15
- X₁ appartient à *E. coli* 2 = 2.10⁻³
- X₁ appartient à *E. fergusonii* = 0
- X₁ appartient à *E. vulneris* = 0

La probabilité relative pour que :

- X₁ appartient à *E. coli* 1 = 98,6 %
- X₁ appartient à *E. coli* 2 = 1,31 %

La probabilité absolue pour que :

- X_2 appartient à *E. coli* 1 = 10^{-3}
- X_2 appartient à *E. coli* 2 = 38.10^{-3}
- X_2 appartient à *E. fergusonii* = 0
- X_2 appartient à *E. vulneris* = 0

La probabilité relative pour que :

- X_2 appartient à *E. coli* 1 = 2,5 %
- X_2 appartient à *E. coli* 2 = 97,4 %

Ainsi, nous pouvons dire que l'algorithme a permis une bonne identification des souches d'*Escherichia coli* avec des probabilités d'appartenance de 98,6 % pour l'un et 97,4 % pour l'autre, malgré l'existence de différents variants.

3 – 2 – Identification de *Citrobacter koseri*

Espèces Caractères	<i>C. braakii</i>	<i>C. koseri / amalonaticus</i>	<i>C. koseri / farmeri</i>	<i>C. youngae</i>	Espèce X (<i>C. koseri</i> probable)
McC	100	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	0	-
Catalase	100	100	100	100	+
ONPG	50	99	99	100	+
ADH	45	75	20	50	+
ODC	99	100	100	1	+
CS	75	97	25	80	+
H ₂ S	81	0	0	80	-
UREE	1	1	1	0	-
GLU	100	100	100	100	+
MAN	100	100	100	100	+
SOR	100	99	99	95	+
IND	4	99	99	1	+

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *C. braakii* = 126.10^{-5}
- X appartienne à *C. koseri / amalonaticus* = 69.10^{-2}
- X appartienne à *C. koseri / farmeri* = $4,8.10^{-2}$
- X appartienne à *C. youngae* = $7,6.10^{-6}$

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *C. braakii* = 0,16 %
- X appartienne à *C. koseri / amalonaticus* = 93,4 %
- X appartienne à *C. koseri / farmeri* = 6,4 %
- X appartienne à *C. youngae* = 0,001 %

La probabilité relative pour que la souche X appartienne à l'espèce *Citrobacter koseri / amalonaticus* est de 93,4 % > 90 %, donc l'algorithme a permis de faire une bonne identification de la souche de *Citrobacter koseri*.

3 – 3 – Identification de *Proteus vulgaris*

Espèces Caractères	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. penneri</i>	<i>P. vulgaris</i>	Espèce X (<i>P. vulgaris</i> probable)
McC	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	-
Catalase	100	100	100	+
ONPG	1	1	1	-
H ₂ S	75	20	83	+
IND	1	0	92	+
PDA	98	99	99	+
UREE	99	100	99	+
VP	1	0	0	-
CS	50	1	12	-
ODC	99	0	0	-
GEL	82	50	74	+
GLU	98	99	99	+

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Proteus mirabilis* = $2,8 \cdot 10^{-5}$
- X appartienne à *Proteus vulgaris* = 0,47
- X appartienne à *Proteus penneri* = 0

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Proteus mirabilis* = 0,006 %
- X appartienne à *Proteus vulgaris* = 99,99 %

La probabilité relative pour que la souche de X appartienne à l'espèce *Proteus vulgaris* est de 99,99 % signifiant une excellente identification de la souche.

3 – 4 – Identification de *Klebsiella Pneumoniae*

Espèces Caractères	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae ssp ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae ssp rhinoscleromatis</i>	Espèce X (<i>K. pneumoniae probable</i>)
McC	100	100	100	100	+
Oxydase	0	0	0	0	-
Catalase	100	100	100	100	+
ONPG	99	94	99	1	+
ADH	0	18	0	0	-
LDC	80	25	73	0	+
ODC	0	1	0	0	-
CS	89	18	86	0	+
UREE	78	1	75	0	-
IND	99	0	0	0	-
VP	80	1	90	0	+
GLU	100	99	100	99	+
MAN	100	96	99	100	+

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartienne à *Klebsiella oxytoca* = $1,2 \cdot 10^{-3}$
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae* = $3,2 \cdot 10^{-4}$
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* = 0,13
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis* = 0

La probabilité relative pour que :

- X appartienne à *Klebsiella oxytoca* = 0,9 %
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae* = 0,24 %
- X appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* = 96 %

La probabilité relative pour que la souche X étudiée appartienne à *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* est de 96 % > 90 % traduisant une bonne identification de l'espèce.

3 – 5 – Identification de *Pseudomonas aeruginosa*

Espèces Caractères	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens / putida</i>	Non fermentaire ssp	Espèce X (<i>P. aeruginosa</i> probable)
McC	100	96	85	+
Oxydase	97	99	93	+
Catalase	0	0	0	-
ONPG	0	0	1	-
ADH	89	75	1	+
CS	92	92	37	+
UREE	25	0	1	-
GEL	75	27	9	+
GLU	50	25	9	+
NIT	56	0	35	+
MOB	97	100	99	+

+ = (f)

- = (1-f)

La probabilité absolue pour que :

- X appartient à l'espèce *P. aeruginosa* = 0,121
- X appartient à l'espèce *P. fluorescens / putida* = 0
- X appartient à non fermentaire ssp = 8.10^{-6}

La probabilité relative pour que :

- X appartient à l'espèce *P. aeruginosa* = 99,99 %
- X appartient à non fermentaire ssp = 0,006 %

La probabilité relative pour que X appartienne à *Pseudomonas aeruginosa* a été de 99,99 %. Cette approche aboutit à une excellente identification de la souche bactérienne.

Dans notre algorithme, plusieurs phases dans l'identification peuvent être distinguées depuis la gélose d'isolement jusqu'à l'impression des résultats.

Cependant, les caractères retenus étaient ceux qui étaient susceptibles de permettre une bonne identification ou qui étaient indispensables à cette identification.

Il sera donc intéressant de jauger les capacités de notre travail en le comparant avec d'autres méthodes décrites dans la littérature.

1 – IDENTIFICATION

L'algorithme nous a permis d'identifier d'abord la famille, ensuite le genre 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.

Après l'identification des familles, vient celle des genres bactériens qui nous a été rendue facile grâce aux tests de catalase et d'oxydase.

Cependant, chez les non fermentaires en plus des tests d'oxydase et de catalase, nous avons effectué l'examen à l'état frais qui nous a permis de distinguer les principaux genres par leur mobilité caractéristique.

C'est dans cette perspective que Diop R. [14] a établi un algorithme d'identification des principaux genres de bacilles Gram négatif non fermentaires.

Cependant, c'est sur l'étude des caractères biochimiques que repose le diagnostic d'espèce.

C'est ainsi que Ndir I. [44] établit un algorithme d'identification des entérobactéries basé sur les caractères biochimiques.

En outre, nous avons utilisé la galerie classique et la microgalerie CSB pour l'étude de ces caractères biochimiques.

- Selon Pilet C., Bourdon J.L. et Coll. [48], l'identification des entérobactéries commence par la détermination de la famille, ensuite du genre (oxydase, catalase) et enfin des différentes espèces par la galerie classique. Cependant, ils ont eu recours à des galeries prêtes à l'emploi si la galerie classique est insuffisante pour l'identification.

Cette démarche rejoint notre approche dans le processus d'identification de ces espèces.

- D'après le schéma d'identification des bacilles à Gram négatif établi par Johnson Mary T., Ph D. [33], le test à l'oxydase a été le premier caractère de différenciation entre *Pseudomonas aeruginosa* et les autres entérobactéries.

Cependant, cette démarche peut être à l'origine de confusion ou de source d'erreur dans l'identification des bacilles à Gram négatif, car *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas la seule espèce de bacilles à Gram négatif oxydase positive car nous avons *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Vibrio*. [14].

D'où l'intérêt de procéder en première intention à la recherche de la fermentation du glucose.

Ce qui remet en question la qualité de cet algorithme qui s'avère insuffisant pour une bonne identification des Entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires [33].

2 – L'ETUDE DE CERTAINS CARACTERES

❖ Au cours de notre étude, nous avons choisi d'isoler les souches sur la gélose Mac Conkey. Ainsi, dans la plupart des souches étudiées, la réponse sur Mac Conkey a été correcte de l'ordre de 100 %.

Cette réponse s'explique entre autres par les différents éléments chimiques qui la composent, à savoir le lactose, le cristal violet et les sels biliaries.

Le cristal violet et les sels biliaries inhibent la croissance des bactéries Gram positif mais également facilitent la multiplication des bacilles à Gram négatif.

Quant au lactose, il permet d'emblée de faire un diagnostic présomptif des différents germes de bacilles à Gram négatif par la fermentation ou non du lactose.

Lorsqu'il y a fermentation du lactose, les colonies deviennent rouges et quand il n'y a pas de fermentation, on observe des colonies de couleur blanche [46].

En outre, on peut dire que la gélose Mac Conkey reste le milieu adéquat pour l'isolement des bacilles à Gram négatif.

Cependant, nous observons des limites dans la mesure où le Mac Conkey ne permet pas d'isoler certains bacilles à Gram négatif, du fait de leur exigence en facteurs de croissance.

Parmi ces bactéries, nous avons : *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Campulobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*.

❖ Il a été décrit dans la littérature que la plupart des souches d'*Escherichia coli* sont indole positive. Ainsi, notre étude nous a permis de distinguer des souches d'*Escherichia coli* avec deux profils biochimiques différents.

Néanmoins, ces deux types d'*Escherichia coli* ont été bien identifiées par l'algorithme avec des probabilités relatives de 98,6 et 97,4 %.

Nous pouvons donc dire que ces caractères différentiels sont des caractères mineurs dans la mesure où ils n'interfèrent pas dans l'identification de ces souches d'*Escherichia coli*.

❖ Avec toutes les souches de *Proteus* étudiées, nous constatons une réponse à l'urée fortement positive.

Ce phénomène s'explique par le fait que les souches de *Proteus* possèdent une uréase très active qui entraîne la formation d'ions ammonium.

Ces ions ammonium vont alcaliniser le milieu et entraîner le virage de l'indicateur du rouge au rose framboise.

Par contre, avec les souches de *Klebsiella pneumoniae*, nous notons une positivité de la réaction au delà de 24 heures.

Cela s'explique par le fait que les klebsielles ont une activité uréasique faible.

Cependant, les discordances liées à la recherche de l'uréase peuvent être levées par une incubation plus longue ou un ensemencement dense de la souche bactérienne.

❖ Les souches de *Pseudomonas* ont donné une réaction fortement positive par rapport au test d'oxydase. Cela est dû au fait qu'elles possèdent un cytochrome oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du cytochrome C par l'oxygène moléculaire.

Ce cytochrome oxydase intervient dans la chaîne respiratoire des *Pseudomonas*. Ainsi, le cytochrome oxydase oxyde le cytochrome C qui va, à son tour, oxyder le dichlorure de N-N-diméthyl-1-2-phénylènediamine, substrat qui prend une coloration violet foncé [21].

❖ Les méthodes que nous avons utilisées ne nous ont pas permis de rechercher la nitrate réductase chez les entérobactéries mais nous avons pu le rechercher chez les non fermentaires.

La recherche de la nitrate réductase se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces nitrites, en milieu acide, donnent une coloration rose en présence d'alpha-naphtylamine et d'acide sulfanilique.

Certaines bactéries réduisent le nitrate en nitrite (cas de la nitrate réductase assimilatrice B). D'autres (*Pseudomonas*) réduisent le nitrate jusqu'au stade d'azote (cas de la nitrate réductase A).

Dans ce dernier cas, la réaction doit être complétée par l'épreuve de Zobell qui consiste à ajouter un peu de poudre de zinc comme catalyseur minéral de la transformation des nitrates en nitrites.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que l'algorithme a permis une bonne identification de la plupart des espèces d'entérobactéries et de bacilles à Gram négatif non fermentaires, ayant un intérêt médical.

Cependant, cet algorithme présente certaines limites car il ne permet pas l'identification de certains bacilles à Gram négatif exigeants comme *Campulobacter*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*.

Les infections humaines à entérobactéries et à bacilles Gram négatif non fermentaires occupent une place importante en pathologie infectieuse en raison de leur fréquence et de leur gravité, tant à l'hôpital que dans les populations.

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

C'est dans cette initiative que nous avons entrepris d'élaborer un algorithme pour permettre aux structures de santé de suivre une démarche simple, cohérente et fiable pour une bonne identification de ces différentes espèces d'entérobactéries et de bacilles à Gram négatif non fermentaires.

L'algorithme que nous avons établi a permis de suivre un procédé d'identification à trois niveaux :

- famille (par le Gram et la fermentation du glucose)
- genre (par la catalase, l'oxydase et la fermentation du lactose)
- espèce (par les caractères biochimiques).

Au cours de notre étude, nous avons choisi d'isoler les souches sur la gélose Mac Conkey. En effet, la gélose Mac Conkey est un milieu sélectif des bacilles à Gram négatif du fait de la présence du violet de cristal qui inhibe la croissance des bacilles à Gram positif.

Nous avons eu à identifier 43 souches d'entérobactéries et 4 souches de bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Ainsi, pour une meilleure appréciation de la qualité de cet algorithme, il nous a semblé intéressant de le valider par la notion de probabilité relative de quelques souches étudiées par rapport aux espèces correspondantes, en prenant comme références les résultats de la galerie API.

Cependant, nous avons identifié 21 souches d'*Escherichia coli* et les résultats nous ont permis de distinguer 2 profils biochimiques différents avec des probabilités relatives de 98,6 % et de 97,4 %.

L'algorithme a permis également l'identification des souches de *Citrobacter koseri*, de *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* et de *Pseudomonas aeruginosa* avec respectivement des probabilités relatives de 93,4 % ; 99,99 % ; 96 % et 99,99 %.

Ces résultats traduisent l'existence d'un algorithme de qualité, sensible et spécifique des principales espèces d'entérobactéries et de bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Cependant, notre algorithme présente certaines limites car ne permettant pas l'identification des bacilles à Gram négatif exigeants tels que *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*.

En effet, il n'y a pas de démarche universelle, la finalité étant de diagnostiquer de manière la plus fiable une souche bactérienne.

En conclusion, notre algorithme d'identification des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires est parmi les meilleurs de par sa fiabilité, sa spécificité et sa sensibilité.

- 1. ALMEIDA J., REIS A., CARRONDO M.**
Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*.
Biotechnol. Bioenz. 1995 ; 46 ; 476-484.
- 2. API 20 NE**
Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux
Bio Merieux S.A. France, 2002.
- 3. API 20 E**
Système d'identification des entérobactéries
Bio Merieux S.A. France, 2002.
- 4. 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.
- 5. BAKHOUM I.**
Contrôle de qualité et validation de différents microméthodes d'identification bactérienne.
Thèse Pharm., 2004. n° 8.
- 6. BBL crystal E/NF ID**
Système d'identification des entérobactéries / non fermentants
Becton Dickinson France S.A, 1999 : 13-22.

7. **BOSSERT I. D., YOUNG L.Y.**
Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium.
Applied and environmental Microbiology 1986, 52 (5) : 1117-1122.

8. **BRENNER D.J.**
Introduction to the family *Enterobacteriaceae*
In : Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schelegel H.G.
Eds the prokaryotes Springer-Verlag K.G. Berlin, 1981 : 1105-1127

9. **BROCK THOMAS D. and MADIGAN MICHAEL T.**
The Biology of Microorganisms Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
KELLY, Susan G. and Frederick J. Post
Microbiology Techniques Star Publishing co. Belmont C.A. 1991

10. **BUCHANAN R.E., GIBBONS N.E.**
Bergey's manual of determinative bacteriology,
8th ed The Williams and Wilkins co., Baltimore 1974.

11. **CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G.,
VARGUES R.**
Bactériologie Médicale : Techniques usuelles.
SIMEP SA, Paris, 1987 : 121-137 ; 146-155

12. **COLY I.**
Microméthodes d'identification biochimique des bactéries
DEA, Chimie et biochimie, 1999.

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

Bactériologie clinique

Edition marketing, Paris, 1998 ; 144-145.

14. DIOP R.

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

Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 75.

15. DRAME B.

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

Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 86.

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

Identification of the *Enterobacteriaceae*

Ed Burgess, Minneapolis, 3rd ed, 1977

17. FARMER

Enterobacteriaceae : Introduction and identification

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

7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1999, 442-458

18. FARMER

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

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

- 19. FERRON A.**
Bactériologie médicale
Editions C et R, Paris 1994, 15th ed
- 20. FINEGOLD S.M. and BARON E.J.**
Diagnostic Microbiology
Bailey and Scott's 7th ed, Saint Louis, Toronto Princeton, 1986
- 21. FLANDROIS J. P., CHOMARAT M.**
Bactériologie Médicale, Pratique
MEDSI/ Mc Graw HILL, Paris 1988
- 22. FOURQUET R.**
Un milieu Ornithine décarboxylase Mobilité Indole Tryptophane
désaminase d'utilisation systématique dans le diagnostic de bactéries à
Gram négatif
Arch. Inst. Pasteur. Madagascar. 1973, 42 : 49-60
- 23. FRENEY J., HERVE C., DESMONCEAUX M., ALLARD F.,
BOEUF GRAS J. M., MONGET D. and FLEURETTE J.**
Description and evaluation of semi-automated ATB 32 E for identification
method for identification of *Enterobacteriaceae*
J. Clin Microbiol, 1991, 29, : 138-141.
- 24. FRENEY.J**
Précis de Bactériologie clinique
ESKA, 2000, 40, 806

- 25. GASSAMA A., BOYE C.S., NDIR I., KAIRE O., COLY I., SOW A.I., MACONDO E., DIOP-DIOP M., MBOUP S.**
Microméthodes d'identification des Entérobactéries
Dakar Médical, 1999, 44, 1, 69-75
- 26. GIRALDI G. L.**
Pseudomonas in LENNETTE E.H.
Manual of clinical microbiology
ASM 4è ed, Washington 1985
- 27. HENRY D.A., MAHENTHIRALINGAM E., VANDAMM P., COENYE T. and SPEER D.P.**
Phenotypic methods for determining genovar status of *Burkholderia cepacia* complex.
J. Clin. Microbiol, 2001, 39, 1073-1078
- 28. HICKMAN F.W. and FARMER J. J.**
Salmonella thyphi : identification, antibiograms, serology and bacteriophage typing
Ann J. Med Technolo, 1978 , 44 : 1149-1159
- 29. HOLMES B. COSTAS M. GAMNER M. ON S. L. W. and STEVENS M.**
Evaluation of biology system for identification of some gram negative bacteria of clinical importance
J. Clin Microbiol 1994 ; 32 : 197-1975
- 30. JACQUES C.**
Systèmes automatiques d'identification bactérienne
Précis de bactériologie clinique 2000, 6, 147.

- 31. JANDA J.M. and ABBOTT S. L.**
Historical perspectives on the family *Enterobacteriaceae*.
In the *Enterobacteriaceae*
Lippincott Raven Publishers, Philadelphia 1998, 1-7.
- 32. JANDA M., MILLER and CAROLINE M O'HARA**
Substrate utilization systems for the identification of bacteria and yeasts.
ASM. 6th ed, 1998, 10: 103-109.
- 33. JOHNSON MARY T., Ph D.**
A Simplified Branching flow Diagram
In: Identification of the *Enterobacteriaceae*
Syst., Microbiol, 2004: 1-4
- 34. JOYCE L.F., DOWNES K., STOCKMAN and ANDREW J.H.**
Comparison of five methods, Including the PDM. Epsilon test
(E. test) for Antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas*
aeruginosa
Journal of clinical Microbiol, 1998, 30, 2709-2713
- 35. KAUFFMANN F.**
The bacteriology of *Enterobacteriaceae*
The Williams and Wilkins co, Baltimore, 1966.
- 36. KNAPP J. S., CLARK V.L.**
Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction
Infect Immun 1984, 46, 176-181

- 37. Knowles R.**
Denitrification,
Microbiol 1982 Revue 46 (1) 43-70.
- 38. LAFFINEUR KIM and coll.**
Biochemical and susceptibility tests useful for identification of non
fermenting Gram negative rods
J. Clin. Microbiol ; 2002, 40 : 1085-1087
- 39. LARCHIER C.**
Recherches des enzymes respiratoires :
Tests enzymatiques : 2004. 1-3
- 40. LE MINOR L., VERON N.**
Bactériologie Médicale
Flam Med. Science, Paris, 1989 : 333-318 ; 773-823
- 41. MARCHAL N., BOURDON J. L., RICHARD L.**
Milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des
bactéries
Doins éditeurs, Paris 1987.
- 42. MARCOS M.A., VILA J., JIMENEZ DE ANTA M.T.**
Epidemiologia de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*, En ferm
Infecte Microbiol. Clin 1993, 11, 29-33

- 43. MILLER J.M. and RHODEN DJ.**
Preliminary evaluation of a carbon source utilization method for bacterial identification
J. Clin Microbiol 1991, 29 ; 1 143-1 147.
- 44. NDIR I.**
Mise au point d'une microméthode d'identification des entérobactéries
Thèse Pharm. Dakar, 1996, n° 05
- 45. NIANG O.**
Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires
Thèse Pharm., Dakar 2003, n° 60
- 46. PALLERONI N.J.**
Pseudomonas in KRIEG N.R., Holt J.G.,
Bergey's Manual of systematic Bacteriology (vol. 1)
Williams and Wilkins, Baltimore 1984.
- 47. PARKER M.J.**
Pseudomonas in PERKER MT
Topley and Wilson's principals of bacteriology, virology and immunity
Edward Arnold Londres, 1983, 7th ed vol. 2
- 48. PILET C., BOURDON J.L., TOMA B., MARCHAL N., BALBASTRE C.**
Les entérobactéries
Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne
Doins Paris 2^e ed 1979: 109-187.

49. PINA G., RAYNAUD D.

Critères de choix d'une méthode d'identification
DES Bactériologie-virologie 2003 : 1-27.

50. REYNAUD A.E., COUDE DUFORESTO B., COURTIEU A.L.

Etude comparative de diverses galeries API pour l'identification de
bactéries à Gram négatif
Ann Biol Clin 1988, 46, 259-262.

51. RICHARD C.

Intérêt des cultures sur les milieux entretenant des sucres fermentescibles
pour la mise en évidence de l'uréase de *Klebsiella*
Ann Microbiol, Inst. Pasteur, 1975, 126 B : 201-208.

52. RICHARD C.

Enzymes utiles au diagnostic des bactéries Gram négatif
Ann. biol., 1978 ; 36 : 407-424.

53. RICHARD C.

Solutions à quelques problèmes de diagnostic différentiels dans la famille
des entérobactéries
Techn. Biol., 1981 ; 4, 219-226

54. RICHARD C.

Enterobacteriaceae : genres et espèces
Annale de biol. clin 1988, 46, 781-785

- 55. RICHARD C., KEREDJIAN M.**
Méthodes de Laboratoire pour l'identification des bacilles à Gram négatif
aérobies stricts : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*,
Acinetobacter, *Brucella*, *Bordetella*.
Inst. Pasteur, 2^e édition. 1995 ; 2, 22-26.
- 56. RUPPEL, GEIS G., OPFERKUCH W.**
Department of Medical Microbiology
Rurch – Universät Bochum Universäts str.
150, 44801 Bochum Germany
Clinical Microbiology and infection vol. 3, supplement 2, 1997, 54
- 57. SCHUSTER C.**
Pseudomonas et apparentés
Syst. Microbiol : 2001 : 1-6.
- 58. SKERMAN VBD**
A guide to the identification of the genera of bacteria.
The Williams and Wilkins co, Baltimore MD. 1967, 218-220.
- 59. SKERMAN VBD, MC GOWAN V.**
Smeath PHA Approved list of bacterial names
Int. J. syst. Bacteriol, 1980, 30, 225-430
- 60. SWING J., DEVOS P., VAN DER MOOSTER M., DE LEY J.**
Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus
Xanthomonas as *Xanthomonas maltophilia* Hugh 1981 Comb. Nov.
Int. J. syst. Bacteriol. 1983, 33, 409-413.

- 61. TERRIER C., HANSEN N., RENAUD F., FRENEY J.**
Les bacilles à gram négatif non fermentaires autres que *Pseudomonas*
Lyon pharmaceutique [Lyon. Pharm.] 1990 vol. 41, 2 : 125-136
- 62. TIEDJE J.M.**
Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction ammonium.
In biology of anaerobic microorganism
John Willey and sons USA, 1988
- 63. VANDAMME P., HOLMES B., VANCANNEY T.M., COENYE T.,
HOSTA B., COOPMAN R., REVETS H., LAUWERS S., GILLIS M.,
KERSTERS K.**
Occurrence of multiple genovs of *Burkholderia cepaciae* in cystic fibrosis
patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1997, 47, 1188-1200.
- 64. VERON M.**
Pseudomonas in Le Minor L., Veron M.
Bactériologie médicale Flam., Paris, 1982
- 65. YABUUCHI E., KOSAKO Y., OYAIZY H., YANO I., HOTTA H.,
HASHIMOTO Y., EZAKI T.**
Proposal of *Burkholderia* gen Novand transfer of seven species of the
Pseudomonas.
Homology group II to the new genus, with the species *Burkholderia*
(Palleroni and Holmes 1981) Comb.
Microbiology immunol. 1992, 36, 1251-1275.