

INTRODUCTION [17, 24]

Les entérobactéries sont des bacilles Gram négatif dont la plupart sont mobiles grâce à des flagelles disposés de manière péritriche. Leur culture est facilement réalisée sur les milieux usuels.

Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier.

Parmi la gamme très variée de bactéries telles que les entérobactéries, d'autres espèces ont été identifiées en particulier les bacilles Gram négatifs non fermentaires.

Ce sont des bactéries immobiles ou mobiles par leur ciliature polaire. Leur culture s'effectue très facilement sur les milieux usuels.

Ce groupe bactérien est très riche en individualité, il est composé d'une vingtaine de genres et de plusieurs dizaines d'espèces. Celles-ci sont souvent opportunistes et responsables d'infections nosocomiales.

L'importance des entérobactéries et des bacilles Gram négatifs non fermentaires, en pathologie humaine s'explique aussi bien par la variété des espèces qui le composent qu'à leur incidence au niveau de la santé des populations.

L'identification de ces espèces est de plus en plus facilitée au laboratoire par l'utilisation de nombreuses galeries d'identification dont :

- Les galeries classiques avec un nombre de caractères limités. Mais elles nécessitent souvent le recours à d'autres tests biochimiques complémentaires.
- Les galeries API sont très performantes mais leur coût est élevé.

C'est dans cette lancée que l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec a élaboré une technique d'identification reposant sur l'utilisation de mini galeries à savoir les microplaques CSB.

De nombreuses études effectuées dans ce laboratoire ont démontré l'efficacité de ces microméthodes dans l'identification bactérienne. En effet celles-ci sont simples, fiables, peu onéreuses et surtout accessibles aux structures de santé.

Seulement, l'identification n'était possible qu'après une incubation 24h de ces microplaques ce qui a constitué un handicap dans l'établissement d'un traitement efficace et rapide.

Ainsi notre souci actuel est de pouvoir délivrer des résultats fiables dans un délai aussi court que possible pour une bonne prise en charge des patients. C'est dans cette optique que nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Rechercher l'effet de l'inoculum sur l'identification des bactéries
- Etudier l'impact de la taille de l'inoculum sur le temps d'incubation des galeries Micro-CSB.

Pour atteindre ces objectifs, nous allons d'abord après un bref rappel des généralités, rechercher grâce à la technique de dénombrement sur boîte de pétri, l'inoculum adéquat, nous permettant ensuite d'obtenir un meilleur profil d'identification en un temps réduit.

I. LES ENTEROBACTERIES

1.1. Définition [9, 13, 26, 32]

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

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

1.2. Taxonomie

1.2.1. Historique [11, 12, 25]

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

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

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

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

En 1973, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés.

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

1.2.2. Habitat [3, 10]

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

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

1.2.3. Classification

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

Cette classification est résumée dans le tableau I :

Tableau I : Classification des espèces d'entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine [26]

Groupes	Familles	Genre	Espèces
GROUPE I	<i>Edwardsiellae</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>S. paratyphi</i> <i>S. enteritidis</i>
GROUPE II	<i>Escherichieae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella 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 oxymore</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>Y. pseudotuberculosis</i>

1.3 Les caractères bactériologiques

1.3.1 Les caractères morphologiques [5, 6, 10, 22, 24]

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

1.3.2. Les caractères culturaux [5, 10, 15, 27]

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

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

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

1.3.3. Les caractères biochimiques [21]

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

1.3.3.1. Production d'Hydrogène sulfuré (SH₂)

La production de SH₂ par les microorganismes est mise en évidence par incorporation du fer ou 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⁺ qui vient du sulfate de fer.

1.3.3.2. Recherche de l'uréase

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

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

1.3.3.3. Production d'indole

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une 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 pour donner un anneau rouge qui remonte en surface.

1.3.3.4. Recherche des décarboxylases

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

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

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

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

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

1.3.3.5. Recherche des désaminases oxydatives

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

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

1.3.3.6. Utilisation du Citrate de Simmons (CS)

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

1.3.3.7. Utilisation du malonate

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

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

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

1.3.3.8. Action de la Phényl Alanine Désaminase (PDA)

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

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

1.3.3.9. Milieu au Citrate de Christensen (CC)

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

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

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

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

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

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

1.3.3.11. Test à l'ONPG (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 du nitro-2-phénol et non de celui du β -galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas les lactoses.

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

1.4. Etude des principaux genres

1.4.1. Escherichia [8, 17, 27]

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce *Escherichia coli*. Les souches immobiles et agazogènes anciennement décrites comme *Alkaescens 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 [1, 5]

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

- lactose +
- indole +
- citrate -
- acétoïne -
- H₂S -
- 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 : Entero-invasive *Escherichia coli*, encore appelé *Escherichia coli Shigella-like*, responsable de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale ;
- EHEC : Entero-haémorragic *Escherichia coli*, responsable de diarrhées sanglantes liées à la production de toxines ;
- EPEC : Entero-pathogen *Escherichia coli*, responsable de gastro-entérites infantiles.

1.4.2. *Klebsiella* [12, 18, 21]

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 responsable des pneumopathies aiguës, d'angines, d'otites, de cystites et d'affections rénales.

Ce sont des bactéries Gram négatif immobiles capsulées, 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 -.

1.4.3. *Salmonella* [7, 8, 27]

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

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

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

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

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

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

La plupart des salmonelles sont :

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

II. BACILLE A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRE :

ACINETOBACTER [4, 22]

2.1. Historique

En 1911 BEIJERINCK a décrit un germe isolé du sol, *Micrococcus calcoaceticus*.

En 1939 DE BORD publie un travail préliminaire en mettant en place un groupe de coccobacilles à Gram négatif proches des *Neisseria* qu'il classe dans la tribu des *Mimae* (*Mima polymorpha*).

En 1940 AUDUREAU décrit une espèce qu'il rapproche des *Moraxelles*, sans savoir leurs exigences nutritives, sous le nom de *Moraxella lwoffii*.

Le genre *Acinetobacter* a été décrit par BRISOU et PREVOT en 1954.

BAUMANN, DOUDOROFF et STANIER en 1968 ont proposé de réunir toutes ces variétés dans une seule espèce et un seul genre *Acinetobacter calcoaceticus*.

2.2. Classification

Dés 1940, AUDUREAU avait noté la ressemblance entre *B. anitratum* et les *Moraxella*. En décrivant *M. glucidolytica*, PIECHAUD proposa de scinder les *Moraxella* en deux groupes :

- *Moraxella* du groupe I : avec une oxydase
- *Moraxella* du groupe II : sans oxydase

Le sous-comité a proposé de séparer définitivement *Acinetobacter* de *Moraxella*. Ainsi *Acinetobacter* correspond aux *Moraxella* du groupe II de PIECHAUD.

Les *Moraxelles* constituent désormais le genre III de la famille des *Neisseriaceae*. Les *Acinetobacter*, proposés initialement en appendice de cette famille, en constituent maintenant le genre IV.

Une seule espèce est reconnue : *Acinetobacter calcoaceticus*.

Parmi les travaux qui ont permis de clarifier la position de *Acinetobacter*, il faut citer l'importante étude taxonomique que publia en 1967, MARGARET THORNLEY.

2.3. Habitat

Acinetobacter est une bactérie tout à fait ubiquitaire : elle existe sur le sol, dans les eaux douces et marines. Chez les animaux, elle est présente dans le tube digestif et à la surface des muqueuses ouvertes sur l'extérieur ; de même que chez l'homme. Son isolement est assez habituel à partir de l'expectoration et des prélèvements génitaux, où sa présence peut parfois poser des problèmes de diagnostic différentiel avec certaines espèces de *Neisseria*.

Etant donné sa répartition dans la nature, *Acinetobacter* est donc fréquemment un agent de contamination : aliments, produits biologiques, malades.

2.4. Caractères Bactériologiques

2.4.1. Les caractères morphologiques

Les espèces du genre *Acinetobacter* se présente sous forme de bacilles de longueur variable de 1µm (formes coccoïdes) à 3µm ou 5µm (en moyenne) jusqu'à des formes filamenteuses de plusieurs dizaines de µm. Leur diamètre est légèrement supérieur à 1µm.

Acinetobacter est à Gram négatif. Cette bactérie ne possède pas de flagelle elle est immobile.

2.4.2. Les caractères culturaux

Acinetobacter est aérobic strict. Il se développe facilement sur milieux nutritifs simples. En milieu liquide, le trouble est homogène, avec parfois une légère collerette en surface (souches muqueuses). Sur gélose nutritive, les colonies en 24h ont un diamètre de 2 à 3mm ; elles sont convexes, luisantes et blanchâtres. Sur gélose au sang les colonies sont plus volumineuses. Quelques souches se développent sans difficulté sur certains milieux sélectifs destinés à l'isolement des entérobactéries.

La température optimale de pousse est inférieure à 37°C. *Acinetobacter* n'est pas pigmenté et n'élabore pas de toxine.

2.4.3. Les caractères biochimiques

Dans une batterie d'épreuves d'identification pour bacilles à Gram négatif, *Acinetobacter* montre beaucoup de réactions constamment négatives :

- indole (-)
- nitrate-réductase (-)
- H₂S (-)
- VP (-)
- RM (-)

Un certain nombre de caractères varient suivant les souches :

- **L'acidification à partir des sucres**

Les souches qui attaquent le glucose, acidifient ainsi le milieu à partir du xylose, de l'arabinose et du galactose. Le lactose est aussi attaqué mais par une voie ne produisant que peu d'acide ; aussi est-il nécessaire pour mettre en évidence cette attaque d'utiliser une concentration de lactose à 10% dans un milieu. L'attaque des sucres se fait toujours par voie oxydative en aérobiose. Le saccharose, le fructose, le mannitol ne sont jamais attaqués.

- **L'hydrolyse de la gélatine**

Environ 10% des souches non glucidolytiques et 25% des souches glucidolytiques hydrolysent la gélatine (le résultat est plus facilement observé si la culture est faite en aérobiose à la surface d'une gélose à la gélatine).

- **L'hémolyse au sang frais**

Certaines souches montrent une hémolyse intense, d'autres ne modifient pas le sang. La nature du sang ne semble pas avoir d'importance.

- **L'utilisation du citrate**

La majorité des souches utilisent le citrate comme seule source de carbone mais certaines se développent sans alcaliniser le milieu de Simmons.

- **Les autres sources de carbone**

On observe une utilisation très variable suivant les souches. Leur source d'énergie est également très variable.

- **L'uréase**

Certaines souches possèdent une uréase très active. Ce fut le cas de toutes les souches isolées en 1952 par LEMOIGNE et à partir d'échantillon de sol provenant de diverses régions de France.

- **Désaminase Décarboxylase : Absentes**

Enfin toutes les souches de *Acinetobacter* se développent sur un milieu minéral simple.

III. NUTRITION ET CROISSANCE BACTERIENNES [2]

3.1. Conditions nutritionnelles et environnementales

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

3.1.1. Besoins nutritifs de la cellule bactérienne

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

3.1.1.1. Les nutriments de base permettant de générer la biomasse

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

❖ L'eau

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

❖ **Macro-éléments**

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

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

❖ **Besoins en carbone**

Deux groupes de bactéries existent quand à l'assimilation du carbone :

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

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

❖ **Micro-éléments**

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

3.1.1.2. Les aliments énergétiques

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

3.1.2. Autres facteurs intervenant dans la croissance des bactéries

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

3.1.2.1. Le pH

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

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

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

3.1.2.2. La pression osmotique du milieu

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

3.1.2.3. La température

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

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

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

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

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

3.1.2.4. L'oxygène moléculaire

Certaines bactéries ont besoin d'oxygène libre pour leur métabolisme. Lors de leur métabolisme énergétique, la récupération de l'énergie par des chaînes de transport d'électron est liée à un accepteur final d'électrons qui est l'oxygène moléculaire. C'est la respiration des bactéries aérobies strictes. D'autres bactéries ne peuvent pas vivre en présence d'oxygène libre : elles sont anaérobies strictes. D'autres par contre peuvent survivre en présence ou en l'absence d'oxygène libre : ce sont les anaérobies-aérobies facultatives.

3.2. Croissance bactérienne

3.2.1. Définition [30]

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

3.2.2. La courbe et les phases de la croissance [17, 30]

Si un milieu liquide non renouvelé estensemencé avec des cellules bactériennes prélevées d'une culture déjà saturée et le nombre de cellules viables par millilitre déterminé régulièrement, une courbe du type de celle de la figure ci-dessous, est habituellement obtenue. La courbe peut être segmentée en 7 phases représentées par les chiffres 1 – 7.

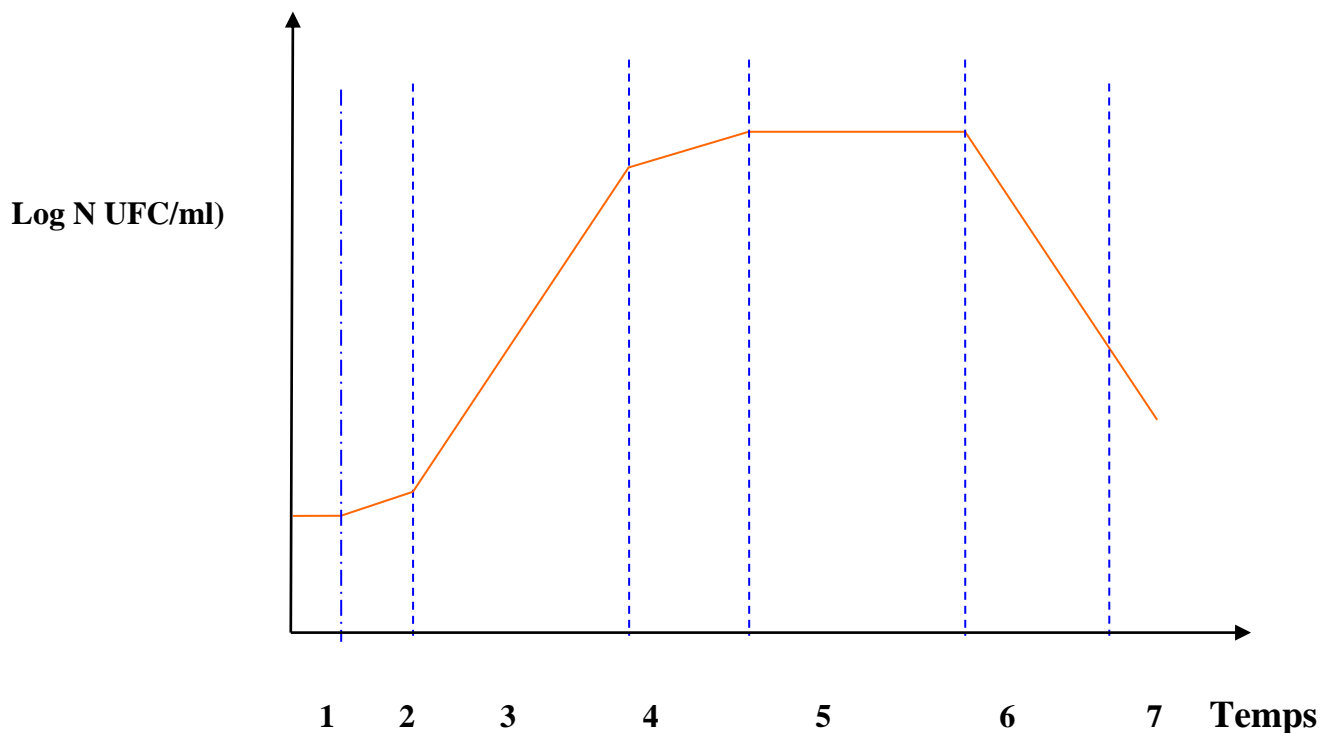


Figure 1 : Les 7 phases de la cinétique de croissance d'une population bactérienne d'après Buchanan (1919) [17, 30].

- **La phase de latence (1) [30]**

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

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

- **La phase d'accélération (2) [30, 31]**

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

- **La phase exponentielle (3) [19, 30, 31]**

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

- **La phase de ralentissement (4) [16, 30, 31]**

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

μ : taux de croissance

- **La phase stationnaire (5) [16, 30]**

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

- **La phase de décroissance (6) [30, 31]**

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

- **La phase de mortalité logarithmique (7) [30]**

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

3.2.3. Techniques de mesure de la croissance bactérienne [19, 31]

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

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

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

- les méthodes de numération,
- les méthodes quantitatives.

➤ **Méthode de numération** [16, 19, 20, 31]

Deux méthodes principales peuvent être utilisées :

- Numération totale : elle consiste à dénombrer au microscope ou avec des compteurs spéciaux les individus viables ou non.

Les cellules mortes ne peuvent pas être distinguées de celles en vie. Seules les suspensions denses peuvent être comptées (>10 cellules par ml), mais des échantillons peuvent être concentrés par centrifugation ou filtration pour augmenter la sensibilité ;

- Numération des cellules viables : on compte les colonies bactériennes apparues sur ou dans un milieu de culture gélosé convenable, inoculé par une aliquote d'une suspension bactérienne homogène et suffisamment diluée.

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

➤ **Méthodes quantitatives [16, 19, 20, 31]**

Plusieurs méthodes sont envisageables, parmi lesquelles :

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

3.2.4. Conditions de croissance des familles bactériennes étudiées [17, 28]

3.2.4.1. Les entérobactéries

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

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

3.2.4.2. Bacilles Gram négatif non fermentaires

Bactéries psychrophiles, c'est-à-dire se développant à 0°C, alcalinophiles et qui supportent assez bien les variations de la pression osmotique.

Elles sont aérobies strictes avec un métabolisme oxydatif.

IV. QUELQUES PARAMETRES DE VALIDATION [34]

4.1. Corrélation et droite de régression

4.1.1. Notion de corrélation

La corrélation consiste à mesurer le degré d'association existant entre deux caractères. Pour calculer le coefficient de corrélation entre 2 variables, cela revient à résumer la liaison qui existe entre les variables à l'aide d'une droite. On parle alors d'un ajustement linéaire.

Pour calculer les caractéristiques de cette droite, il faut faire en sorte que l'erreur que l'on commette en représentant la liaison entre nos variables par une droite, soit la plus petite possible. Le critère formel le plus souvent utilisé, mais pas le seul possible, est de minimiser la somme de toutes les erreurs effectivement commises au carré. On parle alors d'ajustement selon la méthode des moindres carrés ordinaires. La droite résultant de cet ajustement s'appelle une droite de régression. Plus la qualité globale de représentation de la liaison entre nos variables par cette droite est bonne, et plus le coefficient de corrélation linéaire associé l'est également. Il existe une équivalence formelle entre les deux concepts.

$$r = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{N\sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N\sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

4.1.2. Droite de régression

Dans les cas où le diagramme de dispersion montre l'existence d'une relation linéaire, on désire déterminer la droite qui décrira le mieux cette relation.

Cependant, le choix de cette droite dépend d'un critère qu'il faudra fixer.

Le critère mathématique est celui des moindres carrés. Selon ce critère, on cherche à minimiser la somme des carrés des écarts entre les valeurs estimées et les valeurs observées de la variable dépendante.

En formule la droite de régression sera donnée par :

$$y' = ax + b$$

Avec :

x = la valeur de la variable indépendante

y' = la valeur estimée de la variable indépendante

a = l'ordonnée à l'origine

b = la pente

4.2. Limite de détection

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée, avec une probabilité connue, d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est égale à k fois l'écart type de précision, mesuré sur le blanc. Si le nombre de valeur = 30, la valeur de 3 est retenue pour k.

$$LD = S \times k$$

LD = limite de détection

S = écart-type

K = facteur dépendant du nombre de mesures effectuées

4.3. Précisions

C'est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart-type ou par le coefficient de variation calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un certain nombre d'échantillons identiques sur le même lot homogène du produit à analyser.

I. CADRE D'ETUDE

Ce travail a été effectué à l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec et au laboratoire de bactériologie-virologie fondamentale et appliquée de l'UCAD II.

II. MATERIELS ET REACTIFS

2.1. Matériels

2.1.1. Souches bactériennes

Une souche de référence et des souches de contrôle ont été sélectionnées, en effet celles-ci ont déjà été identifiées et conservées à -20°C. Il s'agissait pour

-La souche de référence de :

- *Escherichia coli* : *E.coli* ATCC 25922

-Les souches de contrôle d' :

- Une souche de *Klebsiella pneumoniae*
- Une souche de *Salmonella Paratyphi A*
- Une souche de *Acinetobacter*

2.1.2 Matériel pour l'enrichissement et l'isolement

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

2.1.3. Matériel pour l'identification

- Autoclave
- Balance de précision
- Bain marie
- Epprouvettes
- Erlenmeyer
- Filtres millipores
- Flacon en verre avec bouchon rodé
- Tubes à essai stériles
- Bec bunsen
- Etuve
- Four à micro-ondes
- Agitateur magnétique
- Dessiccateur sous vide à air renouvelé
- -Microscope optique
- Micropipettes
- Embouts stériles
- Plateau (inoxydable de préférence)
- Anse de platine
- Becher rempli d'eau de javel
- Emballage en plastique
- Lames porte-objet
- Lamelles
- Papier buvard
- Microplaques

2.1.4 Matériel pour la conservation des souches

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

2.2. Réactifs

2.2.1. Réactifs pour l'enrichissement et l'isolement

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

2.2.2. Réactifs pour l'identification

- Acétate de plomb
- Alcool 95°C
- Bleu de bromothymol
- Bromocresol pourpre
- Citrate de fer ammoniacal
- Citrate trisodique
- Disque ONPG
- Extrait de levure
- Extrait de viande
- Glucides: glu, lact, mannitol, sorbitol, saccharose, inositol, rhamnose
- Gélatine

- Bouillon nutritif
- L-tryptophane, L-arginine , L-phenyl alanine , L-lysine, ornithine
- NaCl
- NaOH
- Peptone triptyque

2.2.3. Réactifs de révélation

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

III. CONTROLE DE QUALITE DES TESTS EFFECTUES

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

3.1. Contrôle de qualité des milieux d'enrichissement et d'isolement

3.1.1. Contrôle de stérilité

3.1.1.1. Milieux liquides

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

Les milieux ont été considérés stériles en l'absence de trouble et de virage de l'indicateur coloré

3.1.1.2. Milieux solides

Chaque boîte contenant la gélose préparée a été placée à l'étuve à 37°C pendant 24h à 48h.

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

3.1.2. Contrôle d'efficacité

Chaque lot de milieux préparés a été testé avec une souche de référence de « l'American Type Culture Collection » (ATCC).

Des souches de profil bien connu ont été choisies au hasard. L'ensemencement de ces souches effectué sur les milieux préparés a montré que le profil des milieux pour les souches choisies était identique.

3.2. Contrôle de qualité des galeries d'identification déshydratées

100µl de milieu ont été distribués dans chaque puit. La déshydratation a été faite en présence d'un dessiccateur ou dans un four à micro-ondes.

3.2.1. Contrôle de stérilité

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

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

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

Après 24 à 48h d'incubation et après révélation de certains tests, le lot a été considéré stérile en l'absence de virage de l'indicateur et de réaction positive pour les tests révélés.

Tableau II : Plan de contrôle de stérilité des microplaques CSB

Entérobactéries

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

Tableau III : Plan de contrôle de stérilité des microplaques CSB

Bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGN NF)

ADH Eau physiologique stérile	ONPG Eau physiologique stérile	CC Eau physiologique stérile	CS Eau physiologique stérile
ESC Eau physiologique stérile	GEL Eau physiologique stérile	H2S / IND Eau physiologique stérile	MAL / PDA Eau physiologique stérile
NIT Eau physiologique stérile	TDC Eau physiologique stérile	URE Eau physiologique stérile	GLU MEVAG
LAC MEVAG	MAN MEVAG	SOR MEVAG	XYL MEVAG

3.2.2. Contrôle d'efficacité

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

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

- Technique

Deux plaques ont été prévues pour chaque galerie (contrôle positif et négatif)

Une suspension bactérienne a été préparée à partir d'une culture de 24h sur milieu solide.

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 Typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>
IND	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MAL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
PDA	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>
ONPG	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigelli flexneri</i>
LAC	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
GLU	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
MAN	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SOR	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
XYL	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

3.2.3. Contrôle des appareils

- L'étuve

La température était toujours maintenue à 37°C

- Le densitomètre

3.2.4. Contrôle des paramètres dynamiques

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

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

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

IV. METHODES

4.1. Isolement et identification

4.1.1. Isolement

En vue d'obtenir des colonies des germes à identifier, les souches conservées à -20°C ont été régénérées dans un bouillon d'enrichissement puis ensemencées sur la gélose CLED. L'incubation a été faite à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

4.1.2. Identification

4.1.2.1. Examen macroscopique

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

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

Les souches de *Salmonella* quant à elles ont montré des colonies lisses de type S à bord régulier.

Les souches de *Acinetobacter* ont développé sur le milieu MH des colonies lisses à bordures nettes.

4.1.2.2. Examen microscopique

➤ Coloration de Gram

- Principe

La coloration de Gram est la coloration de base de la bactériologie ; elle consiste à mettre en évidence les caractères morphologiques propres à une bactérie. Elle permet ainsi de distinguer les bactéries à gram négatif des bactéries à Gram positif.

- Technique

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent.

Il s'agit de :

- Fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen,
- Recouvrir le frottis de la solution de violet de gentiane, laisser agir une minute,
- Laver la lame au lugol puis de la recouvrir de lugol, laisser agir 30 secondes,
- Rejeter le lugol puis laver à l'eau,

- Décolorer à l'alcool à 95°C ,
- Rincer la lame à l'eau courante et la recouvrir de solution de fuchsine avant de laver abondamment,
- Egoutter et lire au microscope optique à l'objectif 100 avec une goutte d'huile à immersion.

- Résultat

Des bacilles colorés en rose ont été observés.

4.1.2.3. La réaction à l'oxydase

- Principe

Cette réaction est recherchée sur des cultures en milieux gélosés exempts de sucres fermentés cibles ou de sang. Les bactéries possédant des oxydases donnent en présence de sucre, des métabolites qui se combinent avec le réactif utilisé pour donner une coloration variable selon la bactérie.

- Technique

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

- Résultat

La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée. Les résultats obtenus étaient les suivants :

Les entérobactéries comme *Escherchia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Salmonella paratyphi A* étaient dépourvues d'oxydase négative, c'est-à-dire qu'il n'y a pas eu de coloration.

La souche d'*Acinetobacter* s'est également révélé oxydase négative

4.1.2.4. Mini galerie d'identification

✓ Milieu mannitol-mobilité

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

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

• Résultat

La fermentation du mannitol a été matérialisée par un virage du milieu au jaune.

Les bacilles mobiles ont diffusé à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble du milieu ; nous avons l'exemple des bacilles comme *E. coli* ou encore *S. paratyphi A*.

Les bacilles immobiles ont uniquement poussé le long de la strie d'ensemencement ; nous avons pris comme exemple *K. pneumoniae*.

✓ Milieu kliger hajna

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

Sur ce milieu on peut rechercher les 6 caractères suivants :

- La fermentation du lactose : le milieu vire du rouge au jaune,
- La fermentation du glucose,
- La production de gaz,
- La production d'hydrogène sulfuré,
- La présence de lysine décarboxylase.

• Résultat

Les souches de *E. coli* fermentaient le glucose ainsi que le lactose, elles produisent du gaz mais pas du sulfure d'hydrogène H₂S.

Les souches de *K. pneumoniae* ont fermenté le glucose mais pas le lactose, par contre elles ont produit du gaz et du H₂S.

Les souches de *S. typhi* A fermentaient le glucose ainsi que le lactose, mais n'ont produit ni du gaz ni du H₂S.

Quant à la souche d'*Acinetobacter*, elle n'a rien fermenté et n'a pas produit de gaz ni de H₂S.

✓ Milieu du citrate de simmons

Ce milieu est coulé en tube 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.

• Résultat

Les souches de *E.coli* n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, de même que la souche de *S. paratyphi* A. Les souches de *K.pneumoniae* et de *Acinetobacter* utilisent le citrate comme seule source de carbone.

✓ Le milieu Urée-Indole

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

- la production d'uréase qui se matérialise par le changement de la coloration jaune en rose, du fait de l'alcalinisation du milieu ;

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

4.2. Recherche de l'effet inoculum et de l'effet du temps d'incubation des galeries Micro-CSB sur l'identification des bactéries Gram négatif

4.2.1. Recherche de l'effet inoculum sur l'identification

Après identification des bactéries sur lesquelles a porté notre étude, une colonie isolée sur le milieu CLED a été prélevée à l'aide d'une anse de platine puisensemencée dans 10ml de bouillon thioglycolate.

Après homogénéisation, une suspension a été obtenue et celle-ci a été considérée comme un échantillon de volume $V_0 = 10\text{ml}$ et de concentration C_0 à l'instant $t=0 \text{ min}$ (T_0)

A partir de ce moment, un prélèvement a été effectué toutes les 20 à 30 min et ceci pendant 2 à 3 heures. Durant les deux premières demi-heures 100 μl ont été prélevés uniquement pour le dénombrement bactérien. Alors que pour les demi heures restantes 1,5ml de la suspension ont été prélevés servant aussi bien pour l'ensemencement des galeries Micro-CSB Entérobactérie que pour le dénombrement bactérien.

4.2.1.1. Le dénombrement bactérien

•Principe

La technique de mesure de la croissance d'une population bactérienne par dénombrement sur boîtes de pétri consiste à ensemer à des intervalles de temps réguliers des boîtes de pétri par des dilutions appropriées d'un échantillon de la suspension bactérienne : la dilution est calculée pour obtenir

entre 30 et 300 colonies sur chaque boîte, ces deux bornes étant considérées comme donnant le moins d'erreurs sur le dénombrement final. Cette étape est suivie d'une culture de 24 à 48h à 37°C au terme de laquelle les colonies sont dénombrées.

- Technique

Une dilution en série a été effectuée à chaque espace de temps, ainsi donc 100µl de suspension ont été prélevés et dilués à une concentration convenable dans 900µl d'eau physiologique. Les derniers 100µl ont été déposés sur une gélose MH, puis dispersés grâce à un étaleur stérile. Les boîtes ont été placées à l'étuve pendant 24h à 37°C.

Dans un souci de minimiser les erreurs de dénombrement, nous avons décidé d'ensemencer à chaque point de prélèvement deux boîtes.

Après incubation nous avons pu dénombrer les colonies viables obtenues au niveau des deux boîtes.

- Expression des résultats

Les résultats ont été obtenus en faisant la moyenne du dénombrement des deux boîtes de pétri. Ils sont exprimés en UFC/ml.

4.2.1.2. Recherche de l'effet du temps d'incubation des galeries Micro-CSB sur l'identification des bactéries

- Principe

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

Les galeries Micro-CSB des entérobactéries et les bacilles Gram négatif non fermentaires permettent de réaliser respectivement 16 tests biochimiques et de faire le diagnostic d'espèce de la plupart des entérobactéries ainsi que des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

- Technique

Les inocula qui ont été obtenus aux différents intervalles de temps ont ensuite été ensemencés dans les galeries Micro-CSB Entérobactérie et BGNNF.

- Inoculation des microplaques Entérobactéries

Il fallait :

- distribuer 100µl d'inoculum bactérien par micro cupule de ADH à URE,
- mélanger 100µl de la suspension bactérienne à 1ml de MEVAG Entérobactéries,
- ensemencer les cupules de GLU à XYL avec 100µl de MEVAG ainsi inoculé,
- recouvrir les puits destinés à la recherche des décarboxylases, d'ADH, d'uréase et des sucres avec 2 gouttes de paraffine afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire à ces réactions,
- incuber les galeries à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau,
- faire la lecture toutes les 4 heures pendant 12 heures,
- faire une dernière lecture à 24 heures et s'il y a lieu ajouter des réactifs de révélation,
- noter toutes les modifications observées lors de ces lectures.

➤ Les bacilles Gram négatif non fermentaires

Il fallait :

- distribuer 100µl d'inoculum bactérien par micro cupule de ADH à URE,
- verser le reste de la suspension bactérienne dans 1ml de MEVAG Entérobactéries,
- ensemercer les cupules de GLU à XYL avec 100µl de MEVAG ainsi inoculé,
- 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 à ces réactifs,
- incuber les galeries à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau,
- faire la lecture toutes les 4 heures pendant 12 heures, puis à 24 h
- noter toutes les modifications observées lors de ces lectures.

- Lecture et interprétation

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

La lecture des caractères était effectuée grâce à une fiche de lecture (cf. tableau IV et V)

Tableau V : Tableau de lecture de l'entérobactérie

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

Tableau VI : Tableau de lecture des bacilles à Gram négatif non fermentaire

Tests	Réactifs à ajouter	Interprétation	
		Positif	Négatif
NIT	1 goutte d'acide sulfanilique 1 goutte d'α-naphtylamine ± poudre de zinc	Rose	Incolore
UREE		Rouge violacé	Jaune
MAL		Bleu	Jaune vert
PDA	1 goutte de FeCl ₃	Vert	Jaune
ADH		Violet	Jaune
CS		Bleu	Vert
CC		Rose	Jaune clair
ESC		Nuage noir	Jaune
GEL		Diffusion du pigment	Pas de diffusion
H 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

I. EFFET DE L'INOCULUM SUR L'IDENTIFICATION BACTERIENNE EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION

1.1. Escherichia coli

1.1.1. Résultats du dénombrement

Le tableau ci-dessous montre les résultats du dénombrement de *Escherichia coli*

Tableau VII : Dénombrement de *Escherichia coli*

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

L'inoculum a été préparé avec du bouillon thioglycolate, ensuite incubé à l'étuve à 37°C. Pour un début de croissance, seule la première phase d'incubation n'a duré que 30 minutes. Les autres phases d'incubation ont duré 20 minutes, suffisant pour un bon suivi de la croissance de cette souche. Un accroissement de la concentration bactérienne est observé tout au long de ces 2h10min de manipulation. Lequel accroissement s'est effectué de manière timide jusqu'au bout de 80 minutes.

1.1.2. Conditions d'interprétation

L'identification d'une bactérie est régie par un certain nombre de critères qui permettent de catégoriser leur interprétation en cinq groupes selon le pourcentage de positivité des galeries testées.

Ainsi nous avons :

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

1.1.3. Résultats des galeries Micro-CSB

Les plaques ont été incubées à l'étuve à 37°C après les avoir ensemencées avec l'inoculum obtenu. Les deux premiers inocula correspondant respectivement aux temps $T_0 = 0\text{min}$ et à $T_1 = 30\text{min}$ n'ont pas été utilisés pour l'ensemencement des plaques du fait de leur faible concentration. Les résultats obtenus ont été inscrits dans les tableaux suivants :

- Résultats des galeries Micro-CSB obtenus à la 4^{ème}, à la 8^{ème}, à la 12^{ème} et à 24heures d'incubation en fonction de l'inoculum

Tableau VIII : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques (*Escherichia coli*)

Inocula(UFC/ml)	5,5 10 ⁶				6,85 10 ⁶				7,65 10 ⁶				Caractères d'identification de <i>E.coli</i> [4,14, 23]
	4	8	12	24	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures													
Tests biochimiques													
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ONPG	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i		+	i	i	i	+	i	i	i	+	+
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ODC	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
MAN	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
SOR	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	d
XYL	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d
Concordance des caractères (%)	60	80	86	100	60	86	86	100	66	86	93	100	100

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

Tableau IX : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques (*Escherichia coli*)

Inocula (UFC/ml)	1,75 10 ⁷				1,4 10 ⁸				Caractères d'identification de <i>E.coli</i> [4,14, 23]
	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures									
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ONPG	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	i	i	i	-	i	i	i	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	+	i	i	i	+	+
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ODC	-	+	+	+	-	+	+	+	d
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	-	+	+	+	-	+	+	+	+
SOR	-	-	+	+	-	-	+	+	d
XYL	-	+	+	+	-	+	+	+	d
Concordance des caractères (%)	66	86	93	100	73	86	93	100	100

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

Les résultats des tests pour la mise en évidence de l'indole, de la réaction de Voges-Proskauer et de la phényl alanine désaminase n'ont pu être déterminés qu'au bout de 24h pour cause, leur révélation a nécessité l'addition de réactifs.

Les pourcentages de concordance des caractères biochimiques en fonction du temps d'incubation des microplaques CSB pour chaque inoculum ont été illustrés sur les figures suivantes :

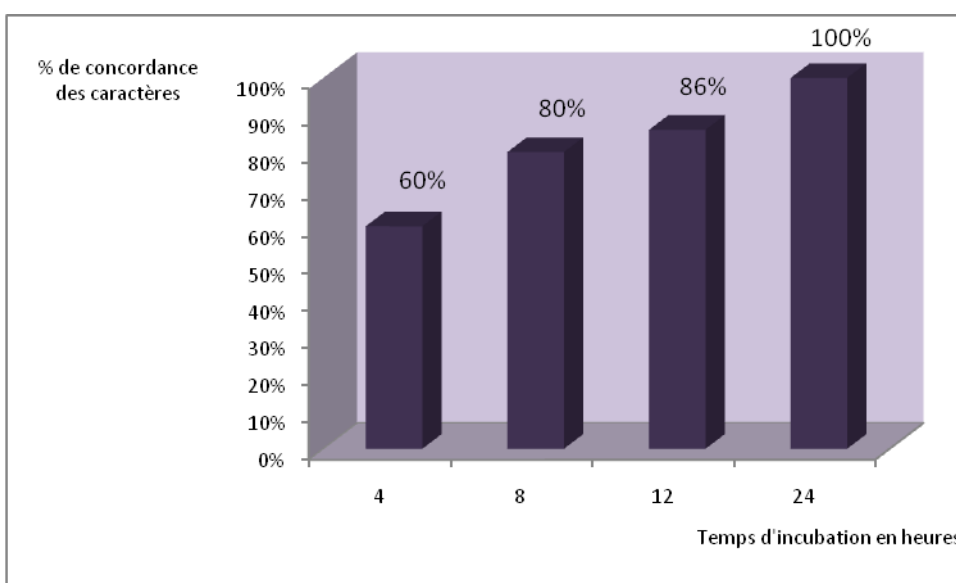


Figure 2 : Concordance des caractères de *E.coli* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $5,5 \cdot 10^6$ UFC/ml

L'identification de la souche a été d'emblée acceptable à la 8^{ème} heure d'incubation de la microplaque. Dans ce cas, il s'agit d'une bonne représentativité de l'inoculum. Les concordances ont crû dans le même sens que les temps d'incubation des plaques Micro-CSB.

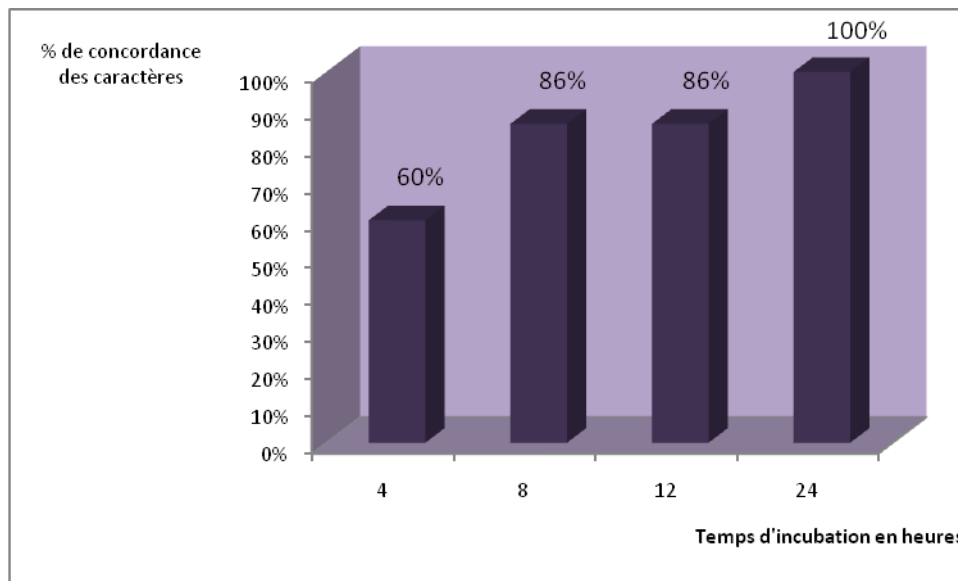


Figure 3 : Concordance des caractères de *E.coli* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $6,85 \cdot 10^6$ UFC/ml

Il est important de noter que la progression de cette concordance est fonction de l'allongement du temps d'incubation mais également de l'accroissement de la taille de l'inoculum. En effet la concordance observée à la 8^{ème} heure d'incubation pour l'inoculum de $6,5 \cdot 10^6$ UFC/ml est passée de 80% à 86% pour l'inoculum de $6,85 \cdot 10^6$ UFC/ml.

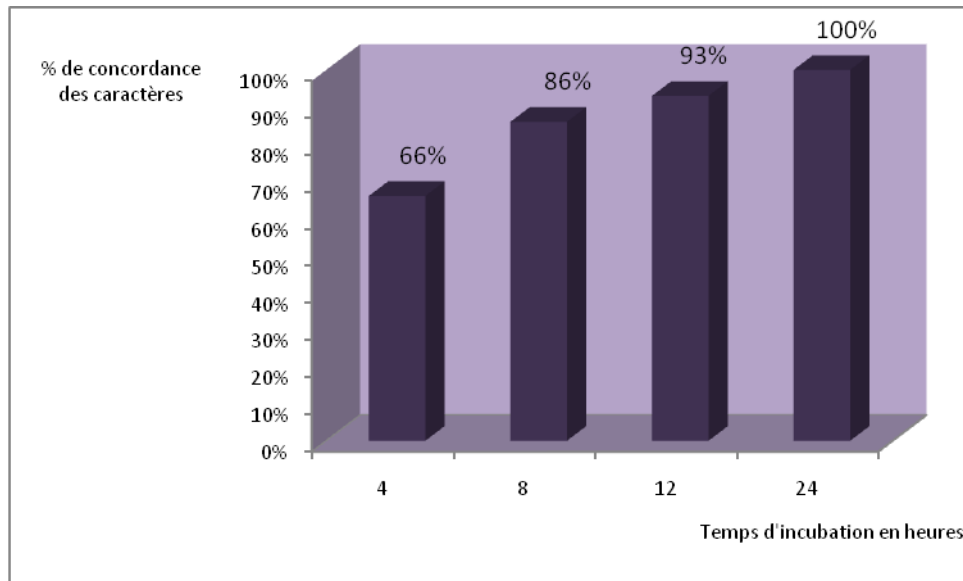


Figure 4 : Concordance des caractères de *E.coli* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $7,65 \cdot 10^6$ UFC/ml

Il y a une bonne corrélation entre la concordance des caractères étudiés et le temps d'incubation.

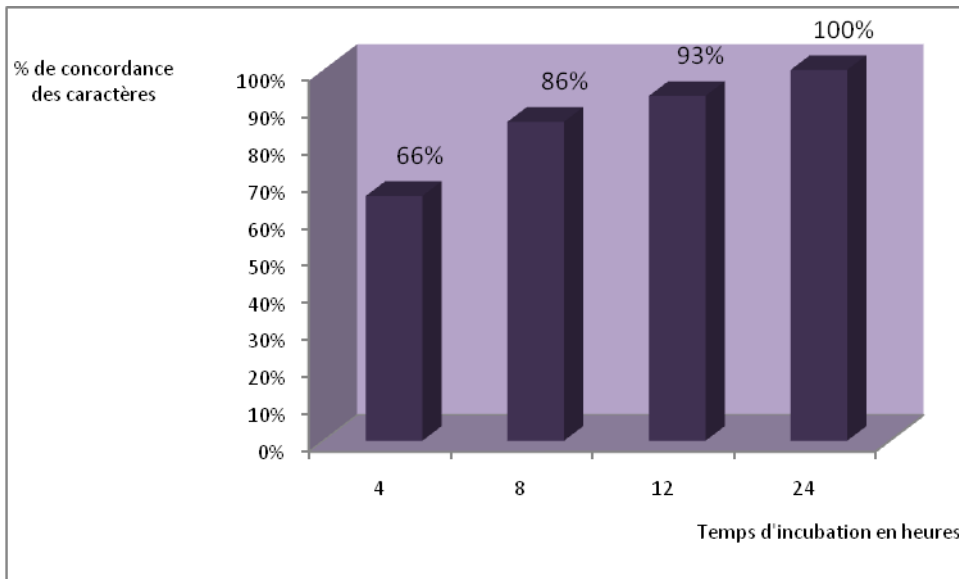


Figure 5 : Concordance des caractères de *E.coli* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $1,75 \cdot 10^7$ UFC/ml

Le parallélisme entre ces deux paramètres s'est précisé au fur et à mesure que la concentration de l'inoculum augmentait. Les résultats sont superposables pour les inocula de $7,65 \cdot 10^6$ UFC/ml et de $1,75 \cdot 10^7$ UFC/ml bien que la population ait augmenté d'une puissance de 10.

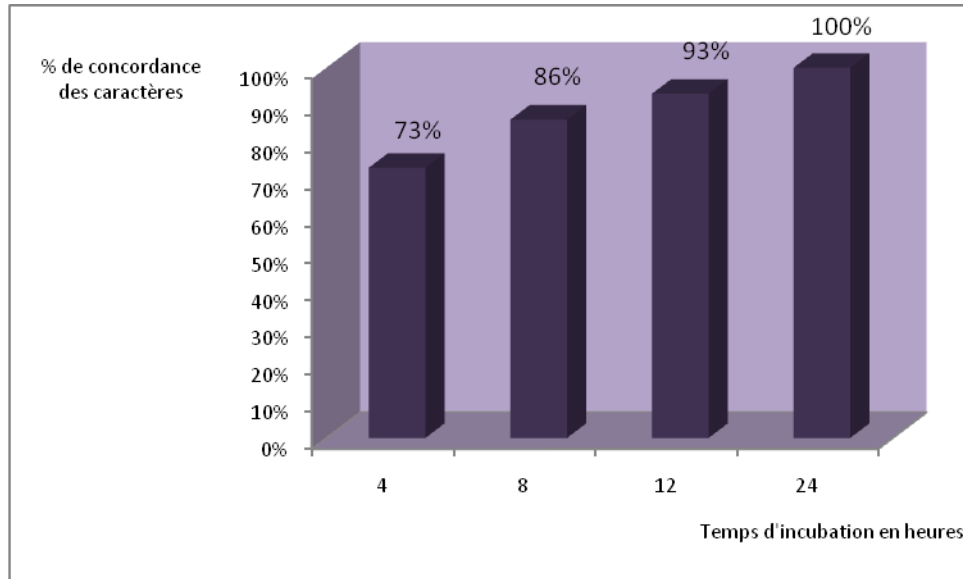


Figure 6 : Concordance des caractères de *E.coli* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $1,4 \cdot 10^8$ UFC/ml

Nous avons constaté une évolution de la concordance des caractères à la 4^{ème} heure de lecture avec un pourcentage qui est passé de 66 % UFC/ml à 73 % UFC/ml.

- Résultats des galeries Micro-CSB obtenus à la 12^{ème} heure d'incubation en fonction de l'inoculum

Les résultats obtenus après 24 heures ont été analysés et validés par des études antérieures. Seuls les résultats obtenus durant la période d'incubation, comprises entre 4 heures et 12 heures ont été retenus pour cette étude. Les meilleurs de ceux-ci ont été obtenus à la 12^{ème} heure mais déjà après 8h d'incubation nous pouvions observer une bonne identification de la souche. Nous avons donc fait une étude comparative de nos résultats à cette heure en fonction des différents inocula.

Tableau X : Etude comparative des résultats obtenus à la 12^{ème} heure
d'incubation en fonction des inocula

Inocula (UFC/ml)	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆
	5,5 10 ⁶	6,85 10 ⁶	7,65 10 ⁶	1,75 10 ⁷	1,4 10 ⁸
Caractères Biochimiques					
ADH	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-
VP	l	i	i	i	i
GEL	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
IND	l	i	i	i	i
MAL	-	-	-	-	-
PDA	l	i	i	i	i
LDC	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+
URE	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
SOR	-	-	+	+	+
XYL	+	+	+	+	+
% de concordance des caractères	86	86	93	93	93

Légende : (I) = inoculum

(i) = caractère indéterminé

L'évolution de la concordance des caractères biochimiques à la douzième heure en fonction de l'inoculum est représentée par la figure

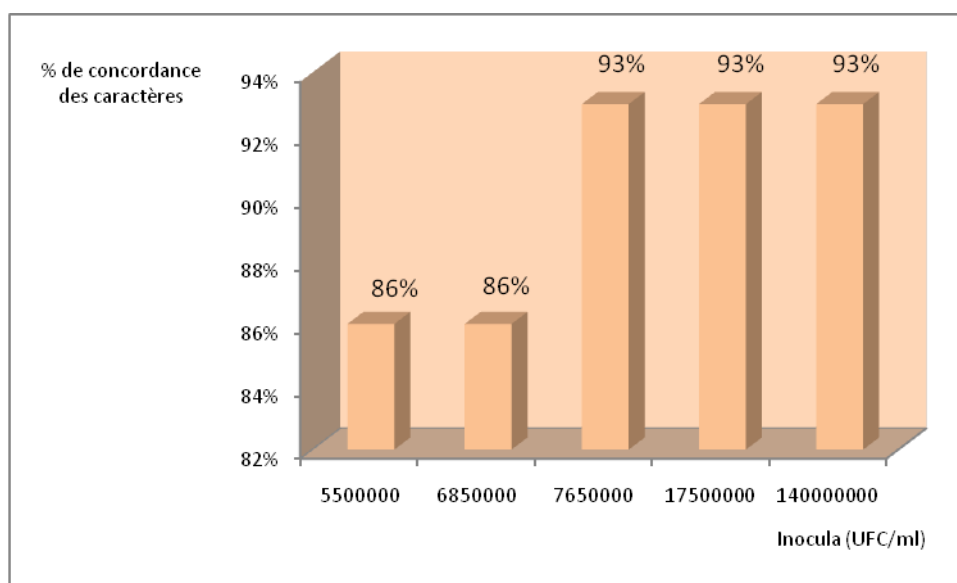


Figure 7 : Identification de *E. coli* au bout de 12h d'incubation des Plaques en fonction des différents inocula

Sur les 18 tests biochimiques étudiés, les trois tests à savoir l'indole, le VP et le PDA n'ont pu être déterminés qu'à la 24^{ème} heure car leur révélation a nécessité l'addition de réactifs.

Pour les deux premiers inocula, seuls deux caractères ont donné des réactions négatives. Il s'agit de l'ONPG et du sorbitol.

Pour les trois derniers inocula, seul l'ONPG s'est présenté comme étant un caractère discordant.

1.2. *Klebsiella pneumoniae*

1.2.1. Résultats du dénombrement

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

Tableau XI : Dénombrement de *Klebsiella pneumoniae*

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

Le bouillon thioglycolate, après inoculation, a été incubé à l'étuve pendant 3h. En effet la souche de *K. pneumoniae* présente un temps de génération de 30min. Toutes les 30min durant donc, une plaque a été ensemencée avec l'inoculum ainsi obtenu. Cette souche a présenté une croissance assez significative.

1.2.2. Conditions d'interprétation

L'identification d'une bactérie est régie par un certain nombre de critères qui permettent de la catégoriser (cf. 1.1.2).

1.2.3. Résultats des plaques Micro-CSB

Les conditions d'étude de *Klebsiella pneumoniae* ont été les mêmes que celles de *E.coli* (cf. I.1.1.3).

- Résultats des galeries Micro-CSB obtenus à la 4^{ème}, à la 8^{ème}, à la 12^{ème} et après 24heures d'incubation en fonction de l'inoculum

Tableau XII : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques (*Klebsiella pneumoniae*)

Inocula (UFC/ml)	2 10 ⁷				1,35 10 ⁸				1,5 10 ⁸				Caractères d'identification de <i>K. pneumoniae</i> [4,14, 23]
Temps d'incubation en heures	4	8	12	24	4	8	12	24	4	8	12	24	
Tests biochimiques													
ADH	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
ONPG	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CC	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
CS	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
VP	i	i	i	+	i	i	i	+	i	i	i	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ODC	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
URE	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
XYL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Concordance des caractères (%)	53	53	73	83	53	53	73	83	53	66	80	83	100

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

Tableau XIII : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques (*Klebsiella pneumoniae*)

Inocula(UFC/ml)	3,45 10 ⁸				1,75 10 ⁹				Caractères d'identification de <i>K. pneumoniae</i> [4,14, 23]
Temps d'incubation en heures	4	8	12	24	4	8	12	24	
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	+	-	-	-	+	-
ONPG	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CC	-	+	+	+	-	+	+	+	+
CS	-	-	+	+	-	-	+	+	+
VP	i	i	i	+	i	i	i	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	-	i	i	i	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ODC	-	-	+	+	-	-	+	+	-
URE	-	-	+	+	-	-	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	-	+	-	-	-	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	d
XYL	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Concordance des caractères (%)	53	66	80	83	53	73	80	83	100

Légende : (+) = caractère positif,

(-) = caractère négatif,

(d) = caractère variable,

(i) = Indéterminé.

Les résultats des tests pour la mise en évidence de l'indole, de la réaction de Voges-Proskauer et de la phényl alanine désaminase n'ont pu être déterminés qu'au bout de 24h pour cause, leur révélation a nécessité l'addition de réactifs.

Les pourcentages de concordance des caractères biochimiques en fonction du temps d'incubation des microplaques CSB pour chaque inoculum ont été illustrés sur les figures suivantes :

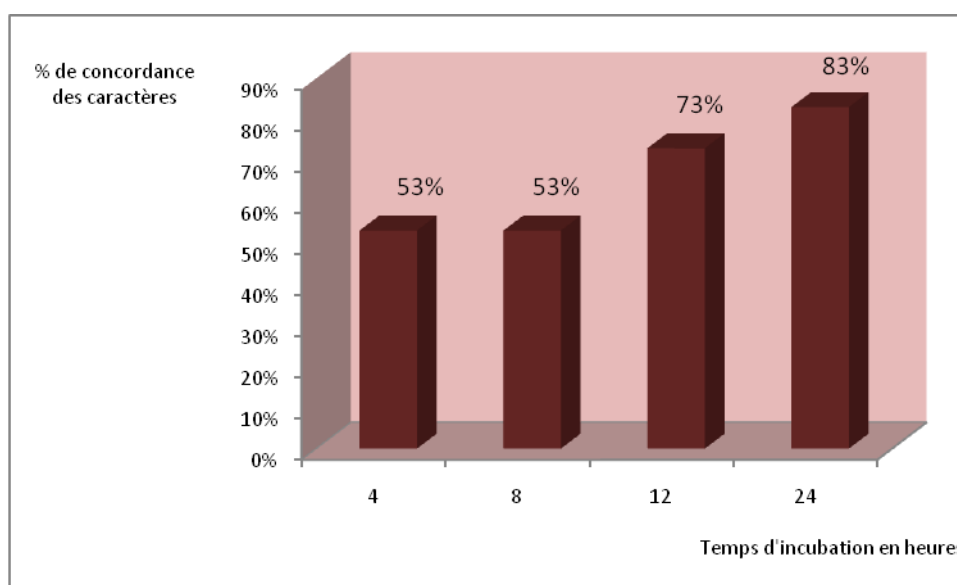


Figure 8 : Concordance des caractères de *K. pneumoniae* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $2 \cdot 10^7$ UFC/ml

Une bonne identification de la souche n'a pu être possible qu'à la 24^{ème} heure ce qui montre que les inocula n'étaient pas tant significatifs pour donner de bons résultats. Le pourcentage des caractères a évolué dans le temps jusqu'à donner un bon résultat à la 24^{ème} heure d'incubation des microplaques.

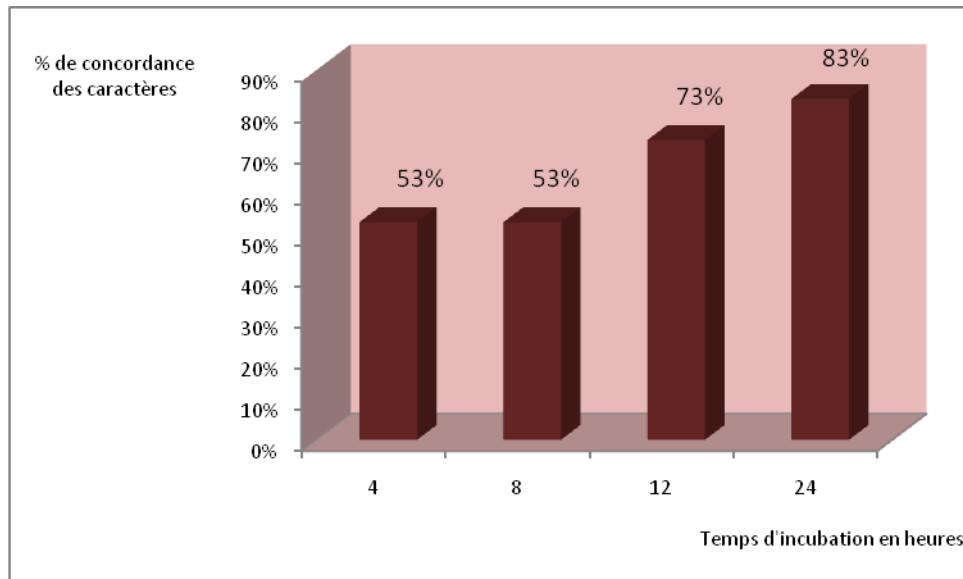


Figure 9 : Concordance des caractères de *K. pneumoniae* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $1,35 \cdot 10^8$ UFC/ml

Les résultats sont superposables pour les inocula de $1,35 \cdot 10^8$ UFC/ml et $2 \cdot 10^7$ UFC/ml. Bien que la différence entre les inocula soit grande, les caractères biochimiques n'ont pas évolué.

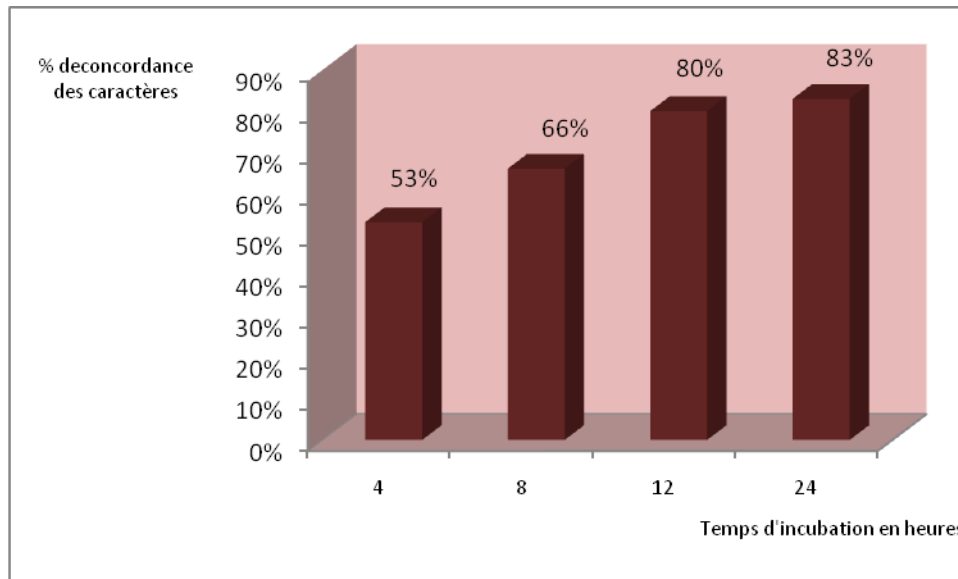


Figure 10 : Concordance des caractères de *K. pneumoniae* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml

Par contre pour l'inoculum de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml, le pourcentage des caractères a bien progressé en passant 66% à la 8^{ème} heure à 80% après 12heures d'incubation ; permettant ainsi une bonne identification de la souche. A cet inoculum nous avons pu avoir une identification de la souche à 12 heures.

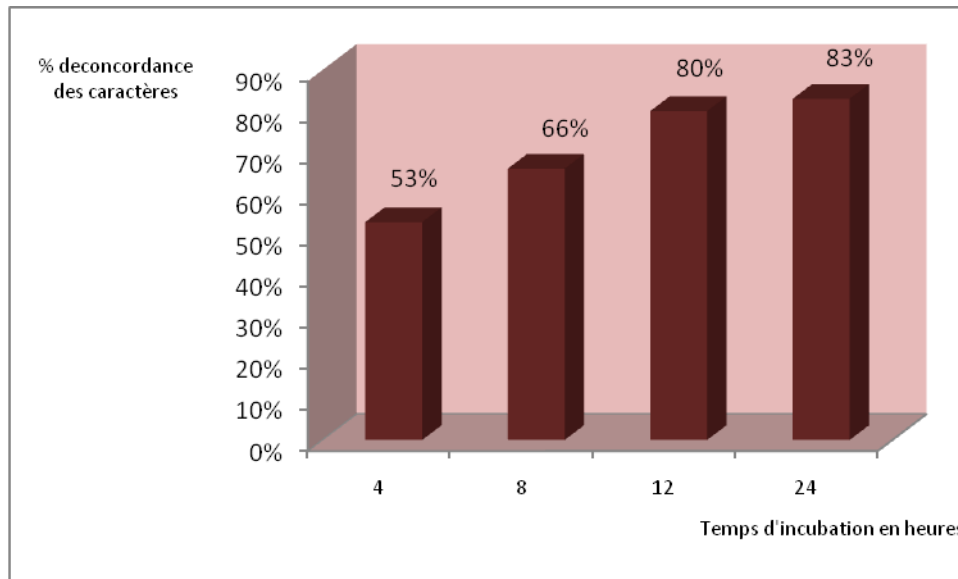


Figure 11 : Concordance des caractères de *K. pneumoniae* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $3,45 \cdot 10^8$ UFC/ml

Les résultats pour l'inoculum de $3,45 \cdot 10^8$ UFC/ml sont superposables à ceux de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml. Ceci est compréhensible parce que la différence de la population n'est pas grande.

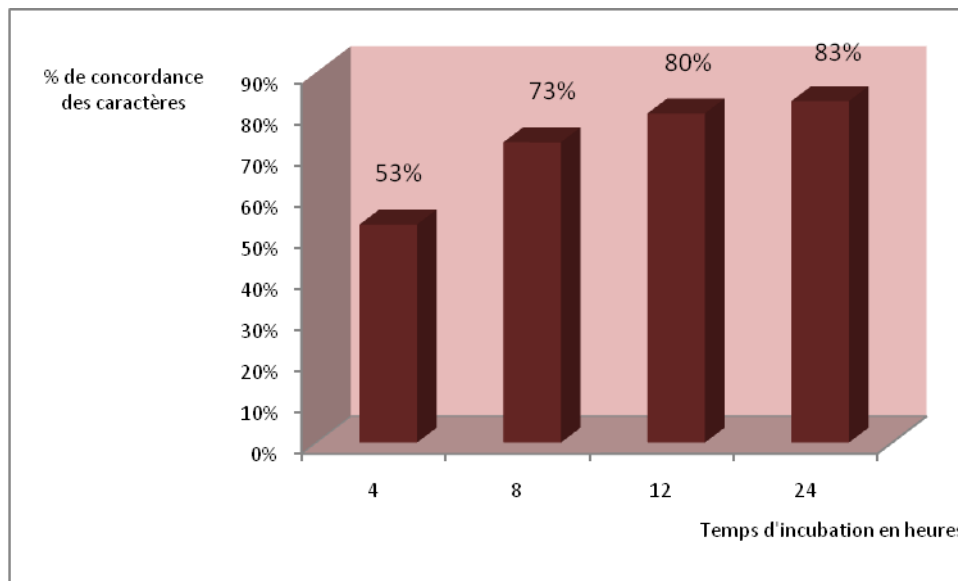


Figure 12 : Concordance des caractères de *K. pneumoniae* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $1,75 \cdot 10^9$ UFC/ml

Même pour l'inoculum le plus élevé, l'identification de la souche n'a pu se faire qu'à 12 et à 24 heures d'incubation des plaques Micro-CSB. Les caractères à la 24^{ème} heure sont restés constants pour pratiquement tous les inocula.

- Résultats des galeries Micro-CSB obtenus à la 12^{ème} heure d'incubation en fonction de l'inoculum

D'une manière générale, les résultats obtenus pour cette souche n'ont pas été fameux. Même à la 12^{ème} heure, avec certains inocula, nous n'avons pas pu bien identifier la souche de *Klebsiella pneumoniae*. Mais en moyenne l'identification est assez bonne. L'étude comparative des résultats de cette souche s'est faite quand même à la 12^{ème} heure, car avant 24 heures, les concordances étaient acceptables à cette heure.

Tableau XIV : Etude comparative des résultats obtenus à la 12^{ème} heure d'incubation en fonction des inocula

Caractères Biochimiques \ Inocula (UFC/ml)	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆
	2 10 ⁷	1,35 10 ⁸	1,5 10 ⁸	3,45 10 ⁸	1,75 10 ⁹
ADH	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-
CC	+	+	+	+	+
CS	+	+	+	+	+
VP	i	i	i	i	i
GEL	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	i	i
MAL	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	i	i
LDC	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	+	+
URE	-	-	-	+	+
GLU	+	+	+	+	+
LAC	-	-	+	-	-
MAN	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+
XYL	+	+	+	+	+
% de concordance des caractères	73	73	80	80	80

(I) = inoculum

(i) = caractère indéterminé

L'évolution de la concordance des caractères biochimiques à la douzième heure en fonction de l'inoculum est représentée à la figure 13.

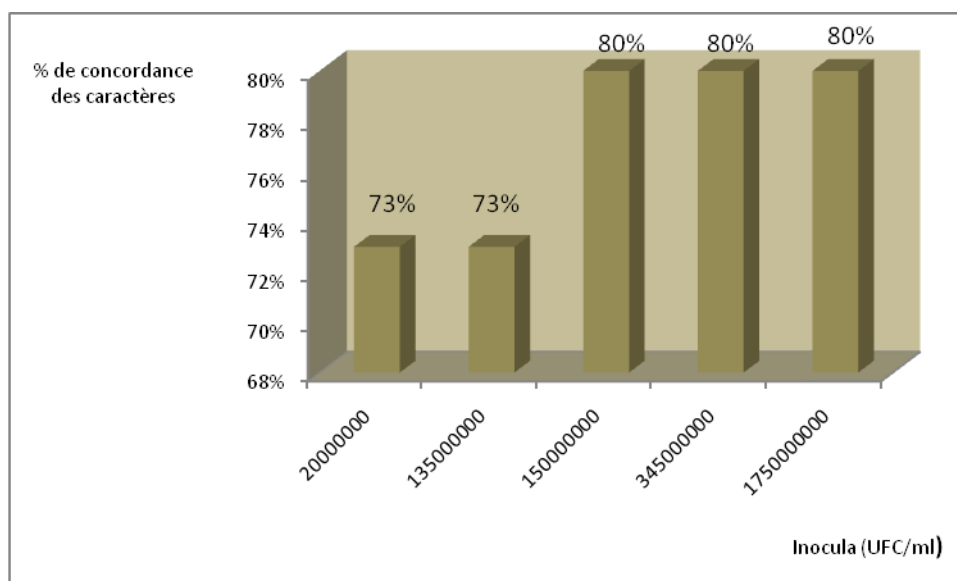


Figure 13 : Identification de *K. pneumoniae* au bout de 12h d'incubation des Plaques en fonction des différents inocula

Sur les 18 tests biochimiques, les trois n'ont pu être révélés qu'à la 24^{ème} heure d'incubation des microplaques car leur identification a nécessité l'ajout de réactifs de révélation.

Pour les inocula de $2 \cdot 10^7$ UFC/ml et de $1,35 \cdot 10^8$ UFC/ml, l'identification de la souche n'a pas pu être possible car sur les 15 tests, les quatre ont donné des résultats négatifs. Parmi ces tests discordants il y a le lactose, l'urée, le malonate, l'ONPG. Le malonate est resté négatif pendant toute la durée de l'opération alors qu'il devait être positif.

Pour les inocula de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml, de $3,45 \cdot 10^8$ UFC/ml, et de $1,75 \cdot 10^9$ UFC/ml, l'identification de la souche a été acceptable, et le pourcentage a diminué avec deux caractères discordants. C'est le malonate qui a persisté dans sa négativité ; l'ONPG, mais aussi le test à l'urée ne sont restés négatifs que pour l'inoculum de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml. Il y a l'ODC qui est passé d'un caractère négatif à un caractère positif alors que ce caractère devait rester négatif pour pouvoir répondre aux normes d'identification de cette souche.

1.3. Salmonella paratyphi A

1.3.1. Résultats du dénombrement

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

Tableau XV : Dénombrement de *Salmonella paratyphi A*

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

L'inoculum de départ a été mis à l'étuve à 37°C pendant 3h. Durant ces 3h le tube qui contenait la suspension d'inoculum est sorti toutes les 30min. Ceci nous a permis d'obtenir les résultats inscrits dans le tableau ci-dessus. Il faut signaler que cette croissance est assez lente.

1.3.2. Conditions d'interprétation

L'identification d'une bactérie est régie par un certain nombre de critères qui permettent de la catégoriser (cf. 1.1.2).

1.3.3. Résultats des plaques Micro-CSB

Comme pour les autres souches, les plaquesensemencées avec la souche de *Salmonella paratyphi A* ont été incubées à l'étuve à 37°C. Les phases d'incubation ont duré 30min. Les résultats obtenus ont été inscrits dans les tableaux ci-après :

- Résultats des galeries Micro-CSB obtenus à la 4^{ème}, à la 8^{ème}, à la 12^{ème} et à 24 heures d'incubation en fonction de l'inoculum

Tableau XVI : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques (*Salmonella paratyphi A*)

Inocula (UFC/ml)	4 10 ⁵				1,2 10 ⁶				1,42 10 ⁶				Caractères d'identification de <i>S. paratyphi A</i> [4,14, 23]
	4	8	12	24	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures													
Tests biochimiques													
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
IND	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
LAC	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	d
XYL	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	d
Concordance des caractères (%)	86	86	93	100	86	86	93	100	86	86	100	100	100

Légende : (+) = caractère positif,

(-) = caractère négatif,

(d) = caractère variable,

(i) = caractère indéterminé.

Tableau XVII : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques (*Salmonella paratyphi A*)

Inocula(UFC/ml)	3,5 10 ⁶				1,2 10 ⁷				Caractères d'identification de <i>S. paratyphi A</i> [22, 11, 17]
	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures									
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	d
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP				-				-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	d
IND				-				-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA				-				-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ODC	-	+	+	+	-	+	+	+	d
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	-	+	+	+	-	+	+	d
XYL	+	-	+	+	+	-	+	+	d
Concordance des caractères (%)	86	93	100	100	93	100	100	100	100

Légende : (+) = caractère positif,

(-) = caractère négatif,

(d) = caractère variable.

(i) = caractère indéterminé.

Les résultats des tests pour la mise en évidence de l'indole, de la réaction de Voges-Proskauer et de la phényl alanine désaminase n'ont pu être déterminés qu'au bout de 24h, pour cause leur révélation a nécessité l'addition de réactifs.

Les pourcentages de concordance des caractères biochimiques en fonction du temps d'incubation des microplaques CSB pour chaque inoculum ont été illustrés sur les figures suivantes :

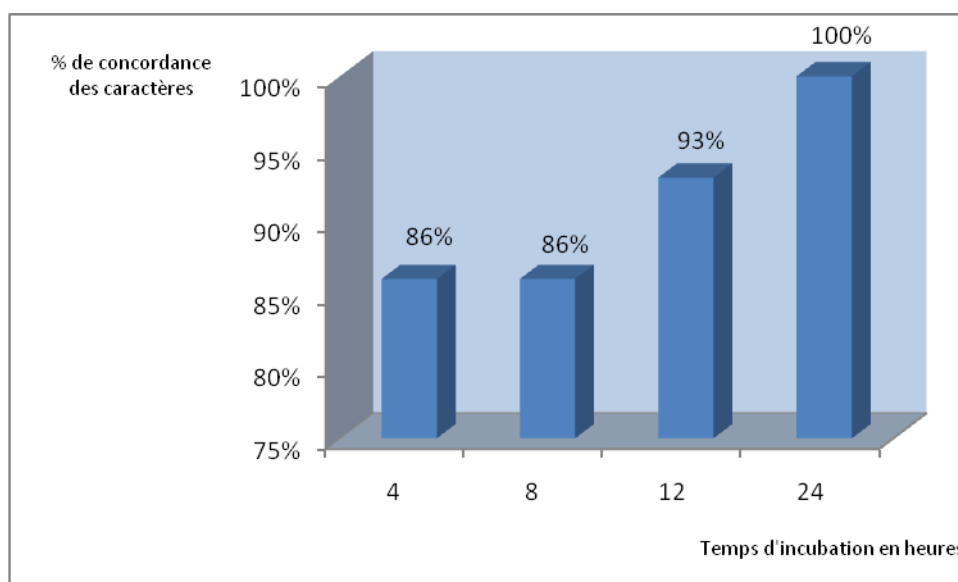


Figure 14 : Concordance des caractères de *S. paratyphi A* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de 4×10^5 UFC/ml

L'identification a été d'emblée acceptable à la 4^{ème} heure d'incubation, elle est très bonne à la 24^{ème} heure. Il suffit donc d'un faible inoculum pour avoir une bonne identification. Le pourcentage des caractères a évolué en fonction du temps.

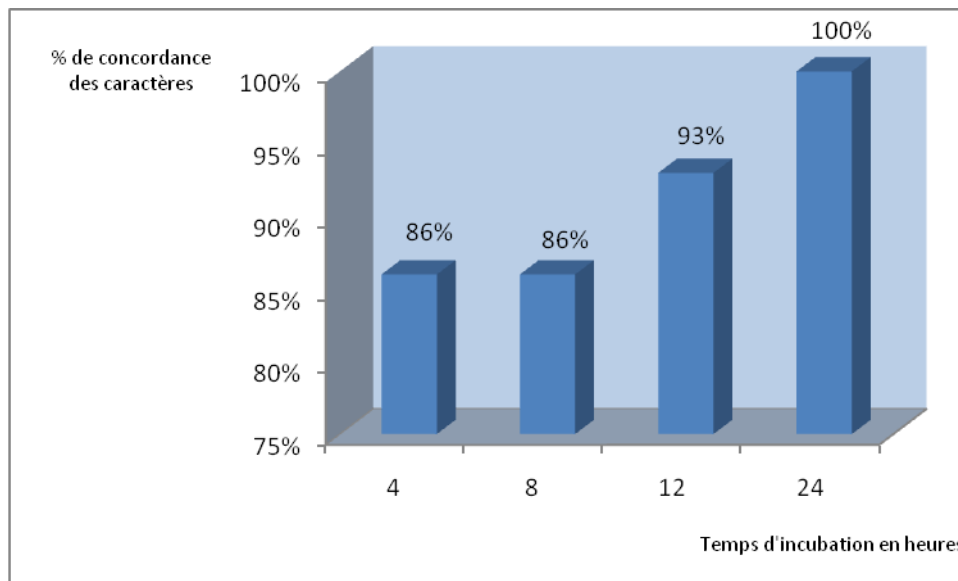


Figure 15 : Concordance des caractères de *S. paratyphi A* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $1,2 \cdot 10^6$ UFC/ml

Les inocula de $4 \cdot 10^5$ UFC/ml et de $1,2 \cdot 10^6$ UFC/ml ont présenté des résultats superposables. Les concordances n'ont pas varié malgré la différence des inocula après 4 heures, 8 heures et 12 heures d'incubation.

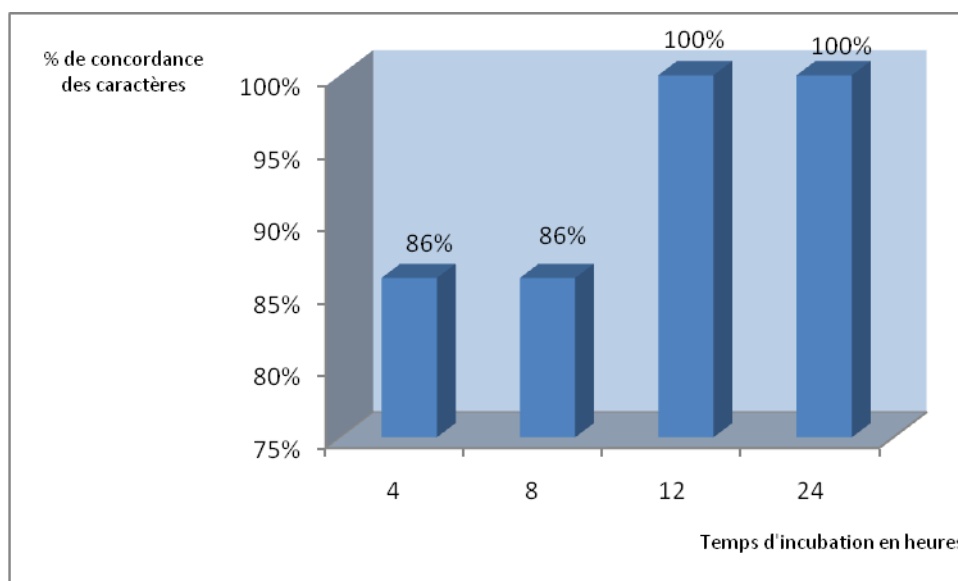


Figure 16 : Concordance des caractères de *S. paratyphi A* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $1,42 \cdot 10^6$ UFC/ml

Nous avons constaté que la concordance des caractères à la 12^{ème} heure de lecture a progressé de 14% par rapport à la 8^{ème} heures.

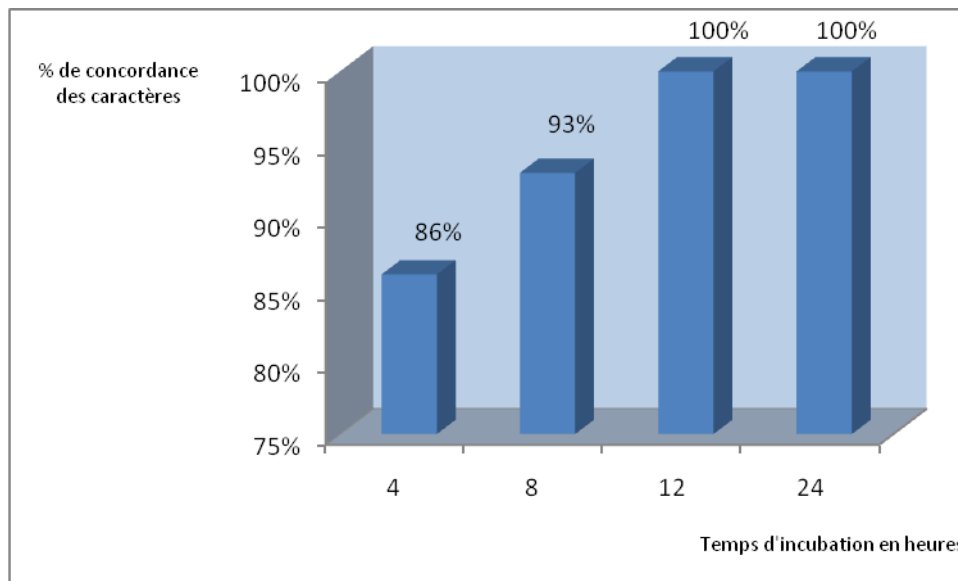


Figure 17 : Concordance des caractères de *S. paratyphi A* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $3,5 \cdot 10^6$ UFC/ml

Une autre évolution a été observée à la 8^{ème} de lecture, le pourcentage est passé de 86% à 93%. Plus la population devenait importante, plus le délai pour l'obtention de bons résultats était réduit.

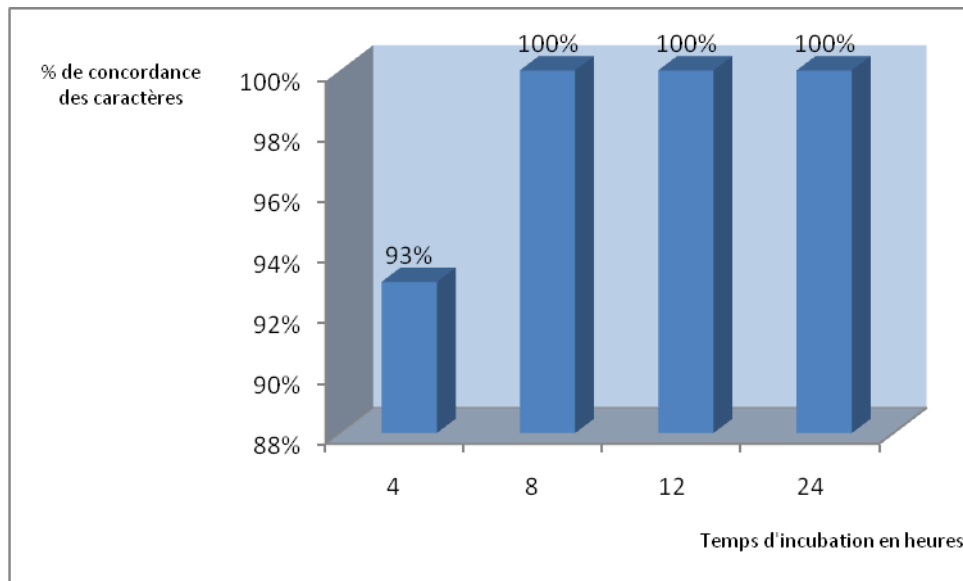


Figure 18 : Concordance des caractères de *S. paratyphi A* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $1,2 \cdot 10^7$ UFC/ml

Pour l'inoculum de $1,2 \cdot 10^7$ UFC/ml l'identification de la souche était excellente à l'exception de la lecture à 4h.

- Résultats des galeries Micro-CSB obtenus à la 12^{ème} heure d'incubation en fonction de l'inoculum

Nous avons obtenus de très bons résultats à tous les inocula.

Tableau XVIII : Etude comparative des résultats obtenus à la 12^{ème} heure d'incubation en fonction des inocula

Inocula (UFC/ml) Caractères Biochimiques	I ₂ 4 10 ⁵	I ₃ 1,2 10 ⁶	I ₄ 1,42 10 ⁶	I ₅ 3,5 10 ⁶	I ₆ 1,2 10 ⁷
ADH	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-
VP	i	i	i	i	i
GEL	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	i	i
MAL	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	i	i
LDC	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+
URE	-	-	-	-	-
GLU	-	-	+	+	+
LAC	+	+	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+
XYL	+	+	+	+	+
% de concordance des caractères	93	93	100	100	100

(I) = inoculum

(i) = caractère indéterminé

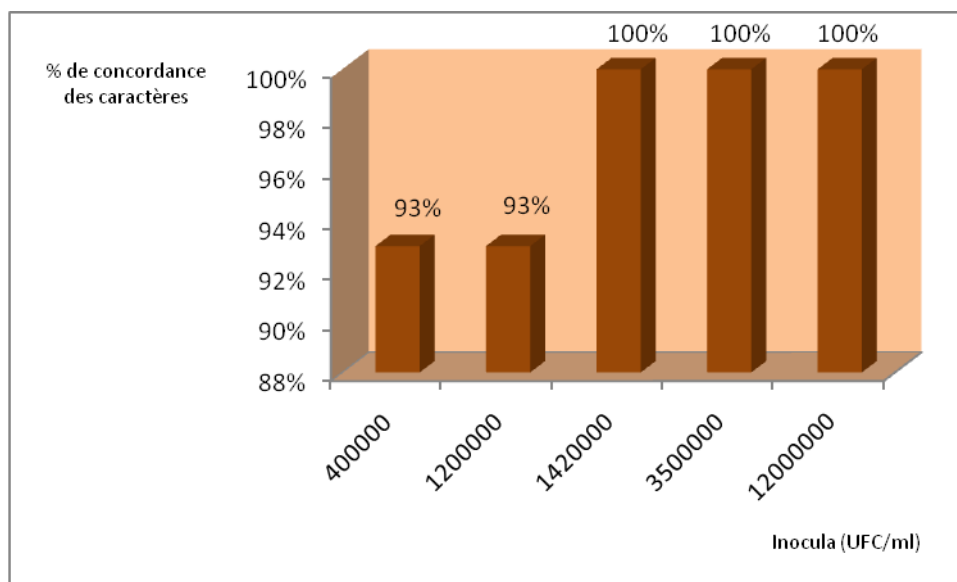


Figure 19 : Identification de *S. paratyphi A* au bout de 12h d'incubation des Plaques en fonction des différents inocula

Les concordances ont varié dans le même sens que les différents inocula. Il y avait 18 tests biochimiques dont les 3 nécessitaient l'ajout de réactifs pour leur identification.

Pour les inocula de $4,5 \cdot 10^5$ UFC/ml et $1,2 \cdot 10^6$ UFC/ml sur les 15 tests restant, il y a eu deux caractères discordants qui étaient le lactose et le glucose.

L'ensemble des caractères a pu être déterminé avec les inocula de $1,42 \cdot 10^6$ UFC/ml, de $3,5 \cdot 10^6$ UFC/ml et de $1,2 \cdot 10^7$ UFC/ml.

1.4. *Acinetobacter*

1.4.1. Résultats du dénombrement

Le tableau ci-dessous montre les résultats du dénombrement de *Acinetobacter*

Tableau XIX : Dénombrement de *Acinetobacter*

Temps (min)	T ₀ = 0	T ₁ = 30	T ₂ = 60	T ₃ = 90	T ₄ = 120	T ₅ = 150	T ₆ = 180
Inoculum (UFC/ml)	6,95 10 ⁵	9,1 10 ⁵	2,35 10 ⁶	3 10 ⁶	2,7 10 ⁷	3,85 10 ⁷	8 10 ⁷

1.3.2. Conditions d'interprétation

L'identification d'une bactérie est régie par un certain nombre de critères qui permettent de les catégoriser (cf. 1.1.2).

1.3.3. Résultats des plaques Micro-CSB

Les conditions d'étude de *Acinetobacter* ont été les mêmes que celles de *E.coli* (cf. 1.1.3).

- Résultats des galeries Micro-CSB obtenus à la 4^{ème}, à la 8^{ème}, à la 12^{ème} et à 24 heures d'incubation en fonction de l'inoculum

Tableau XX : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques (*Acinetobacter*)

Inocula (UFC/ml)	2,35 10 ⁶				3 10 ⁶				2,7 10 ⁷				Caractères d'identification de <i>Acinetobacter</i> [4, 14, 23]
	4	8	12	24	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures													
Tests biochimiques													
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CS	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
NIT	i	i	i	-	i	i	i	-	i	i	i	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
Concordance des caractères (%)	85	85	85	100	85	85	92	100	85	85	92	100	100

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

Tableau XXI : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation des plaques (*Acinetobacter*)

Inocula (UFC/ml)	3,85 10 ⁷				8 10 ⁷				Caractères d'identification de <i>Acinetobacter</i> [4, 14, 23]
	4	8	12	24	4	8	12	24	
Temps d'incubation en heures									
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	+	+	-	-	+	+	+
CS	-	+	+	+	-	+	+	+	+
ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	d
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	i	i	i	-	i	i	i	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	i	i	i	-	i	i	i	-	-
NIT	i	i	i	-	i	i	i	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	d
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	d
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	d
XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	d
Concordance des caractères (%)	85	92	100	100	85	92	100	100	100

Légende : (+) = caractère positif,

(-) = caractère négatif,

(d) = caractère variable,

(i) = caractère indéterminé.

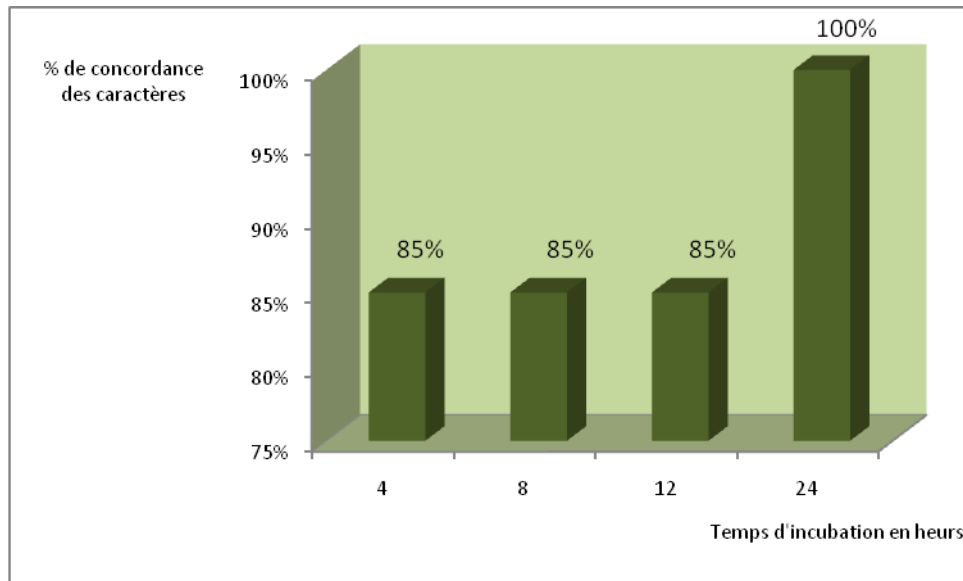


Figure 21 : Concordance des caractères de *Acinetobacter* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $2,35 \cdot 10^6$ UFC/ml

Dès la 4^{ème} heure, nous avons pu obtenir de bons résultats, cela veut dire que cet inoculum est adéquat pour permettre une bonne identification.

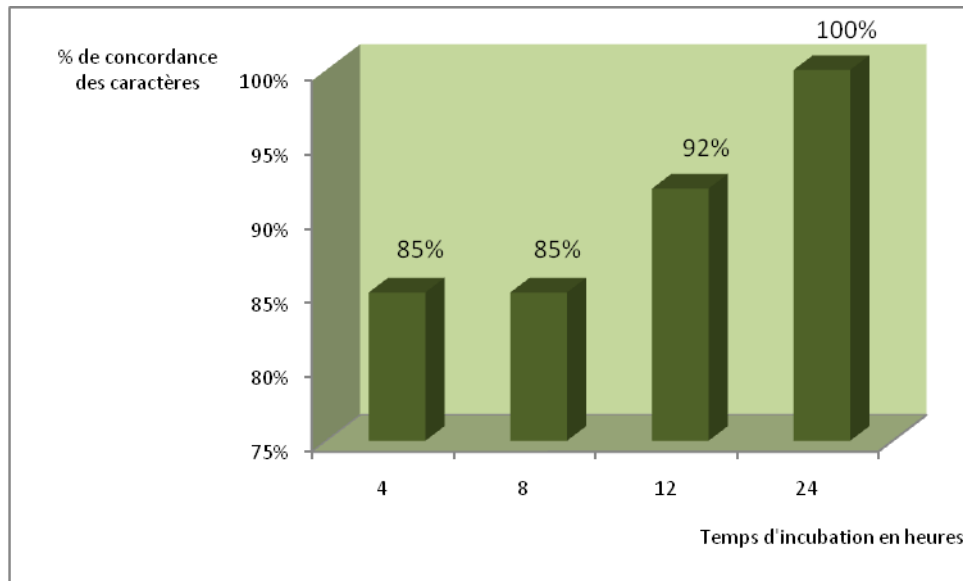


Figure 22 : Concordance des caractères étudiés de *Acinetobacter* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $3 \cdot 10^6$ UFC/ml

Les données observées pour l'inoculum de $3 \cdot 10^6$ UFC/ml sont superposables à celles de l'inoculum de $2,35 \cdot 10^6$ UFC/ml pour les heures de lecture suivantes : 4 heures, 8 heures et 24 heures. Alors qu'une évolution a été observée à la 12^{ème} heure, le pourcentage de concordance à cette heure est passé de 85 % à 92 %.

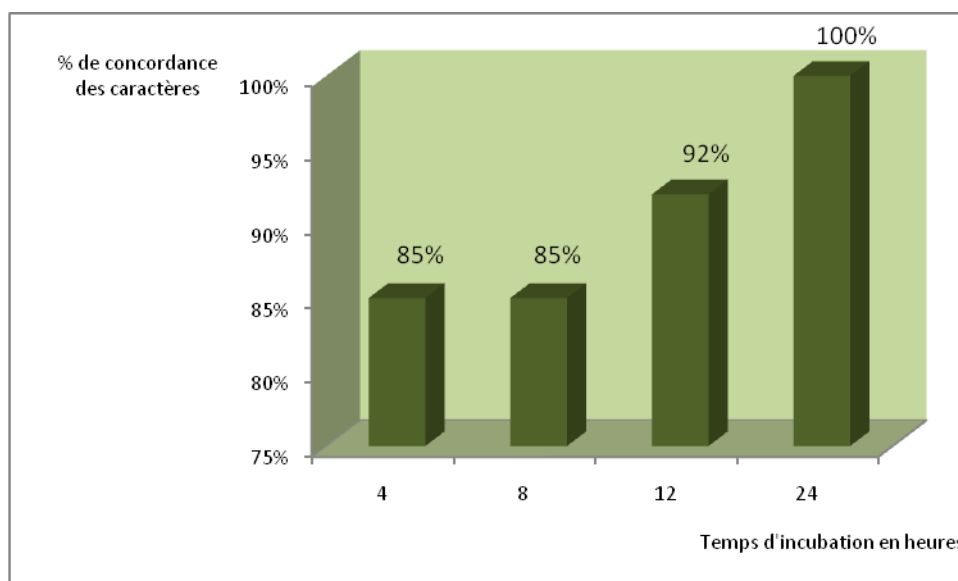


Figure 23 : Concordance des caractères de *Acinetobacter* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $2,7 \cdot 10^7$ UFC/ml

Les résultats observés pour l'inoculum de $2,7 \cdot 10^7$ UFC/ml sont les mêmes que ceux de l'inoculum de $3 \cdot 10^6$ UFC/ml.

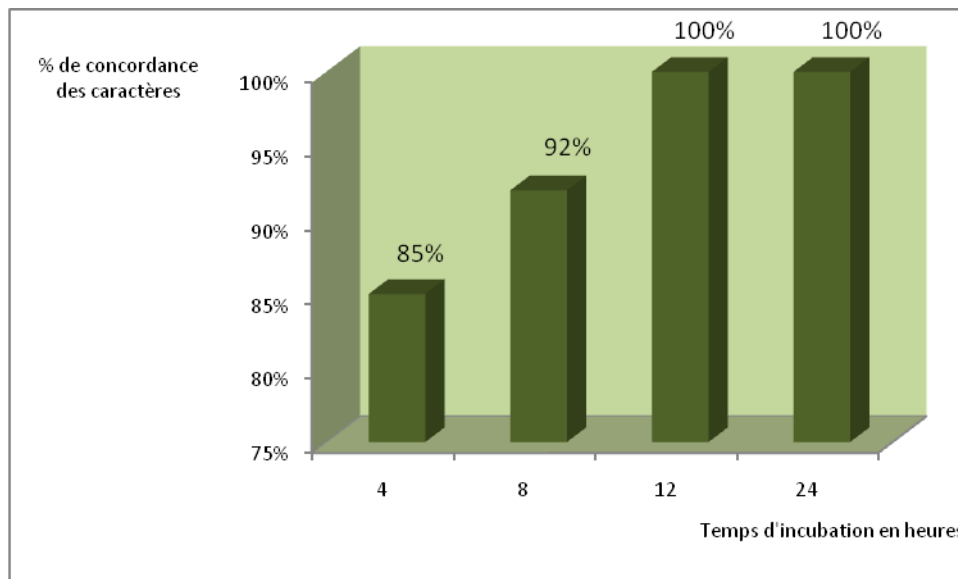


Figure 24 : Concordance des caractères de *Acinetobacter* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $3,85 \cdot 10^7$ UFC/ml

L'évolution des concordances s'est faite en fonction du temps. En passant de l'inoculum de $2,7 \cdot 10^7$ UFC/ml à $3,85 \cdot 10^7$ UFC/ml, les pourcentages ont bien évolué. A la 4^{ème} heure de lecture le pourcentage des caractères est passé de 85 % à 92 %, à la 8^{ème} heure de lecture celui-ci est passé de 92 % à 100 %, signe d'une bonne évolution dans l'identification de la souche.

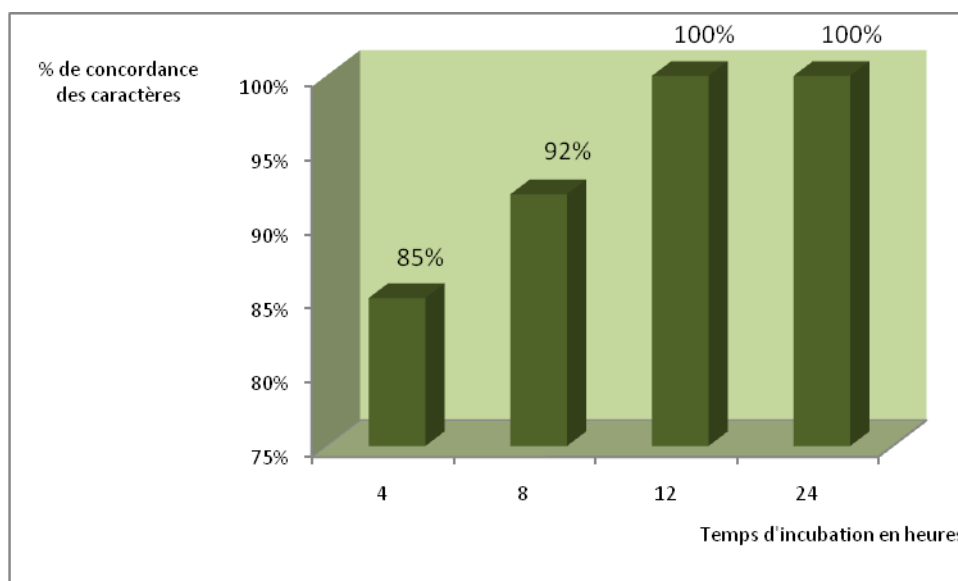


Figure 25 : Concordance des caractères de *Acinetobacter* en fonction du temps d'incubation de la microplaque CSB avec un inoculum de $8 \cdot 10^7$ UFC/ml

Pour les inocula $3,85 \cdot 10^7$ UFC/ml et $8 \cdot 10^7$ UFC/ml, les concordances étaient constantes.

- Résultats des galeries Micro-CSB obtenus à la 12^{ème} heure d'incubation en fonction de l'inoculum

Les résultats obtenus à la 12^{ème} heure étaient acceptables.

Tableau XXII : Etude comparative des résultats obtenus à la 12^{ème} heure d'incubation en fonction des différents inocula.

Inocula (UFC/ml)	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆
Caractères Biochimiques	2,35 10 ⁶	3 10 ⁶	2,7 10 ⁷	3,85 10 ⁷	8 10 ⁷
ADH	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	+	+
CS	-	+	+	+	+
ESC	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
IND					
MAL	-	-	-	-	-
PDA					
NIT					
URE	-	-	-	-	-
GLU	+	-	-	-	-
LAC	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-
XYL	-	-	-	-	-
% de concordance des caractères	85	92	92	100	100

(I) = inoculum

(i) = caractère indéterminé

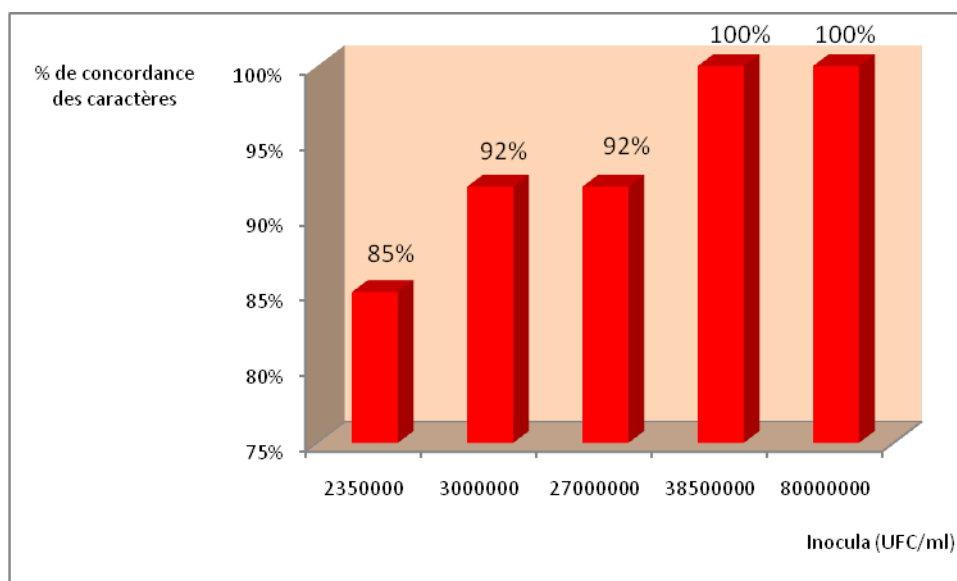


Figure 26 : Identification de *Acinetobacter* au bout de 12h d'incubation des Plaques en fonction des différents inocula

Il y a 17 tests biochimiques qui permettent d'identifier *Acinetobacter*, mais parmi ces 17 tests, les trois n'ont pu être déterminés qu'à la 24^{ème} heure de lecture après ajout de réactifs de révélation.

Pour le premier inoculum, deux caractères étaient discordants ; c'étaient le CS et le CC. Pour les inocula $3 \cdot 10^6$ UFC/ml et $2,7 \cdot 10^7$ UFC/ml, seul le CC est resté négatif. Ils se sont tous révélés aux deux derniers inocula.

II. VALIDATION DE LA METHODE

2.1 Détermination de la droite de régression

2.1.1 Paramètres de détermination

La droite de régression fournit une idée schématique de la relation entre deux variables.

Pour faire la prédiction, il s'agira simplement de substituer la valeur donnée à x dans l'équation de régression et de calculer la valeur de y'.

Pour cela nous avons tracé la droite la plus représentative de l'ensemble qui est donnée par l'équation :

$$y' = ax + b$$

où a et b sont des constantes déterminées par les formules suivantes :

$$b = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{\sum y}{N} - a \frac{\sum x}{N}$$

x et y sont des variables

$$x = \log [n]$$

$$y = C$$

Ce qui nous a permis de calculer un coefficient de corrélation entre les deux variables, r de formule :

$$r = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{N\sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N\sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

r = coefficient de corrélation;

x_i = données observées

b = pente de la droite;

a = ordonnée à l'origine

n = concentration inocula;

C = concordance des caractères

Y' = données à l'ordonnée de droite de corrélation

N = nombre de paires (x ; y) utilisées pour calculer la droite de concordance.

Critères d'interprétation de « r » et de « a »

r = 0,2 à 0,4 : Corrélation faible ou quasi absence de corrélation.

r = 0,4 à 0,6 : Corrélation moyenne.

r = 0,6 à 0,8 : Bonne corrélation.

r = 0,8 : Corrélation élevée.

r = 1 où -1 : Corrélation parfaite

a = 0 : pas de corrélation

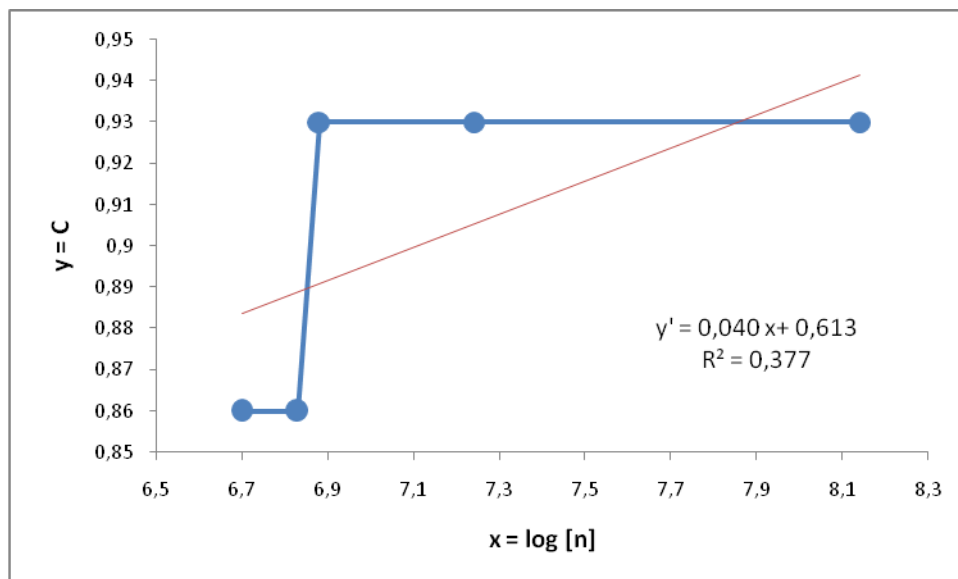
a < 0 : corrélation négative

a > 0 : corrélation positive

2.1.2. *Escherichia coli*

Tableau XXIII : Résultats de *E.coli* à la douzième heure d'incubation des microplaques

Concentrations inocula (UFC/ml)	5,5 10 ⁶	6,85 10 ⁶	7,65 10 ⁶	1,75 10 ⁷	1,4 10 ⁸
Concordance des caractères (%)	86	86	93	93	93
x = log [n]	6,7	6,83	6,88	7,24	8,14
y = C	0,86	0,86	0,93	0,93	0,93
a	0,040				
b	0,613				
Y'	0,881	0,886	0,888	0,90	0,94
r	0,614				

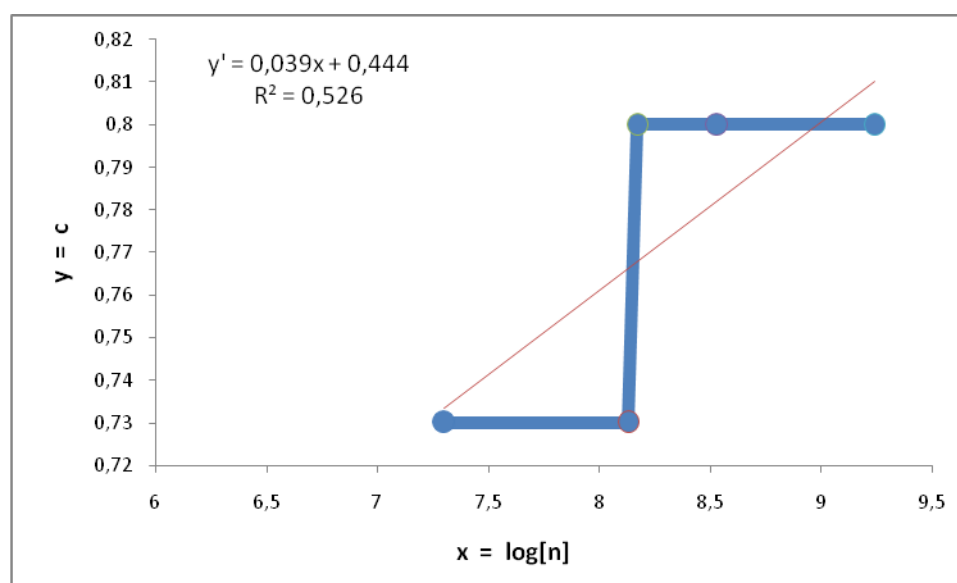


La corrélation entre la taille de l'inoculum et la concordance des caractères est bonne. L'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est sous la forme de $y' = 0,040x + 0,613$, avec $r = 0,614$. La valeur de **a**, pente de la droite est supérieure à zéro donc la corrélation est positive.

2.1.3. *Klebsiella pneumoniae*

Tableau XXIV : Résultats de *K. pneumoniae* à la douzième heure d'incubation des Microplaques

Concentrations inocula (UFC/ml)	2 10 ⁷	1,35 10 ⁸	1,5 10 ⁸	3,45 10 ⁸	1,75 10 ⁹
Concordance des caractères (%)	73	73	80	80	80
x = log [n]	7,3	8,13	8,17	8,53	9,24
y = C	0,73	0,73	0,8	0,8	0,8
a	0,039				
b	0,444				
Y'	0,73	0,761	0,763	0,77	0,80
r	0,725				

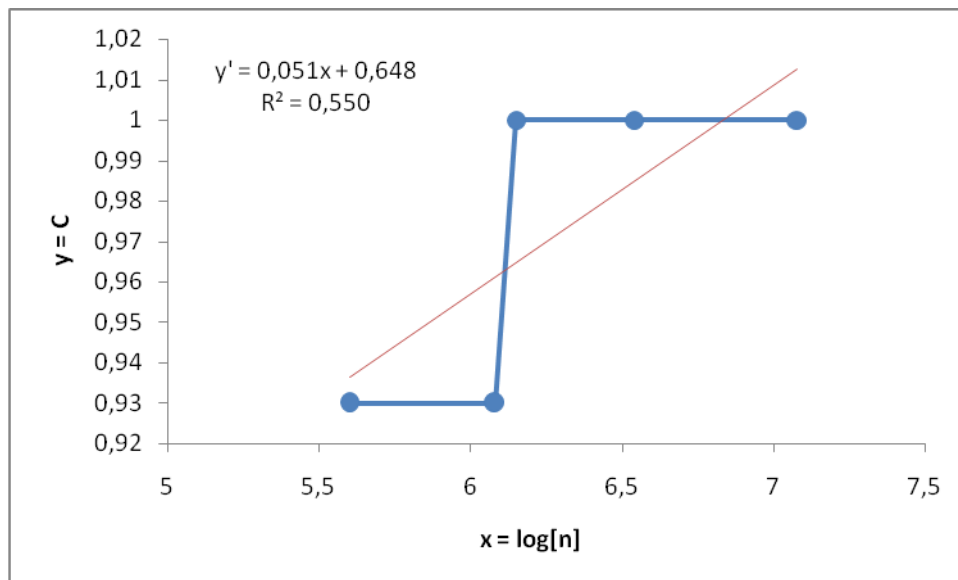


La corrélation entre la taille de l'inoculum et la concordance des caractères est bonne. L'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est sous la forme de $y' = 0,039x + 0,444$, avec $r = 0,725$. La valeur de **a**, pente de la droite est supérieure à zéro donc la corrélation est positive.

2.1.4. *Salmonella paratyphi A*

Tableau XXV : Résultats de *S. paratyphi A* à la douzième heure d'incubation des microplaques

Concentrations inocula (UFC/ml)	4 10 ⁵	1,2 10 ⁶	1,42 10 ⁶	3,5 10 ⁶	1,2 10 ⁷
Concordance des caractères (%)	93	93	100	100	100
x = log [n]	5,6	6,08	6,15	6,54	7,08
y = C	0,93	0,93	1	1	1
a	0,051				
b	0,648				
Y'	0,93	0,95	0,96	0,98	1
r	0,74				

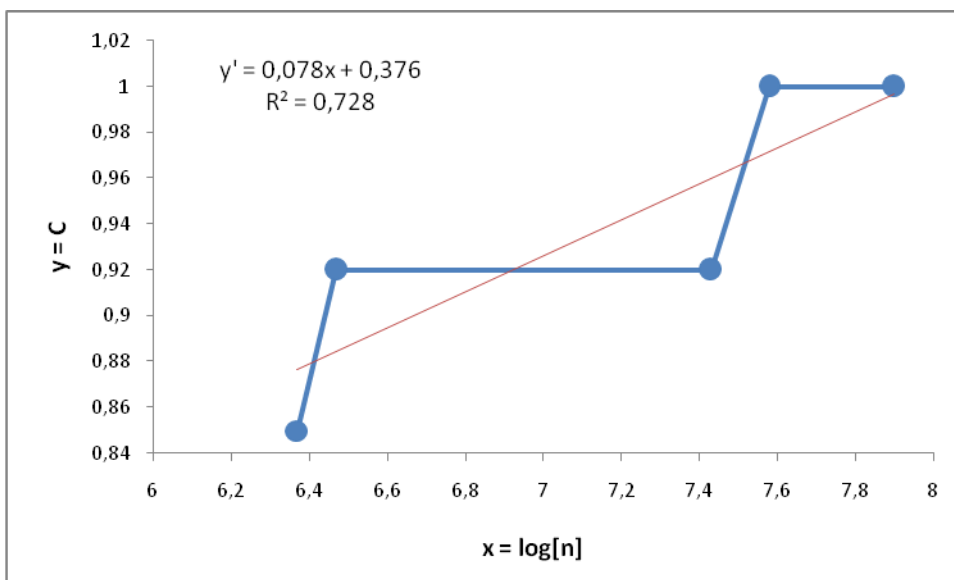


L'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est suivante : $y' = 0,051x + 0,648$ avec $r = 0,74$. Une bonne corrélation a été obtenue entre la taille de l'inoculum et la concordance des caractères. La valeur de **a**, pente de la droite est supérieure à zéro donc la corrélation est positive.

2.1.5. *Acinetobacter*

Tableau XXVI : Résultats de *Acinetobacter* à la douzième heure d'incubation des Microplaques

Concentrations inocula (UFC/ml)	2,35 10 ⁶	3 10 ⁶	2,7 10 ⁷	3,85 10 ⁷	8 10 ⁷
Concordance des caractères (%)	85	92	92	100	100
x = log [n]	6,37	6,47	7,43	7,58	7,90
y = C	0,85	0,92	0,92	1	1
a	0,078				
b	0,376				
Y'	0,87	0,88	0,95	0,97	0,99
r	0,85				



Une corrélation élevée a été observée entre la taille de l'inoculum et la concordance des caractères. L'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est sous la forme de $y' = 0,078x + 0,376$, avec $r = 0,85$. La pente de la droite est supérieure à zéro donc la corrélation est positive.

Notre étude tournait au tour de deux objectifs majeurs à savoir :

- La recherche de l'effet de l'inoculum sur l'identification des bactéries
- L'étude de l'impact de la taille de l'inoculum sur le temps d'incubation des galeries Micro-CSB.

Une analyse pratique réalisée de façon minutieuse au laboratoire a donné des résultats fiables et utilisables.

I. LES SOUCHES BACTERIENNES

Pour atteindre nos objectifs nous avons choisi de travailler avec quatre espèces. Ces souches ont été identifiées avant chaque manipulation pour confirmer leur authenticité. Il s'agit de trois bacilles à Gram négatif qui étaient *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. paratyphi A* et d'un bacille Gram négatif non fermentaire : *Acinetobacter*. Ces souches ont été isolées sur de la gélose CLED (cysteine lactose electrolyte deficient). Celle-ci avec son composant lactosé permettait une meilleure caractérisation de l'ONPG. Les souches qui fermentent le lactose, présentaient sur la gélose des colonies jaunes alors que celles qui ne le fermentent pas présentaient des colonies transparentes ou bleues. Pour les identifier nous avons utilisé la mini galerie classique d'identification pour avoir une assurance de la qualité de la souche étudiée.

II. ETUDE DE LA CROISSANCE PAR LA METHODE DU DENOMBREMENT SUR BOITE DE PETRI

Quelques difficultés ont été rencontrées au cours de notre étude. Trouver la dilution adéquate pour obtenir un inoculum convenable était le problème majeur. Cette technique est très fastidieuse, il fallait effectuer plusieurs

dilutions. A chaque point de prélèvement nous devions faire des dilutions progressives et ensemercer cet inoculum par étalement sur des boîtes de pétri contenant de la gélose MH. Pour obtenir cet inoculum convenable, nous avons rencontré quelques difficultés mais cela s'est amélioré après quelques manipulations. L'autre difficulté était d'éviter la présence de souillures au cours de nos opérations, car celles-ci pouvaient modifier considérablement nos résultats.

III. EFFET DE L'INOCULUM ET DU TEMPS D'INCUBATION SUR L'IDENTIFICATION DES BACILLES GRAM NEGATIFS

Les galeries d'identification Micro-CSB Entérobactéries et Micro-CSB BGNNF ont été validées par les études de stabilité, d'efficacité, et de reproductibilité avant leur utilisation.

Le nouvel objectif qu'il fallait atteindre avec ces plaques était la réduction de leur délai de lecture. Il fallait tout d'abord inoculer les plaques avec différentes concentrations obtenues au cours des 3h ou 2h10min de manipulation. Ensuite les plaques étaient incubées à l'étuve à 37°C, elles devaient rester 4h dans cette environnement ce qui correspondait à la première phase de lecture. A cet instant les caractères définissant la souche n'étaient pas très significatifs. La plaque était ré-incubée pour quatre autres heures ce qui correspondait à 8h d'incubation. A cette heure de lecture nous avons constaté une amélioration de la positivité des caractères. La plaque est remise à l'étuve pendant 4h ce qui revenait à un total de 12h d'incubation. La majorité des caractères pouvaient correctement être identifiés à cette heure de lecture. Certains des caractères n'ont pu être déterminés qu'après 24h d'incubation car ceux-ci nécessitaient l'ajout de réactifs pour leur révélation.

Toute cette opération avait pour objectif la réduction du temps d'incubation. Et cette réduction pouvait permettre à ces plaques d'avoir une compétitivité sur le marché par rapport aux autres méthodes d'identification des bacilles à Gram négatif.

3.1. *Escherichia coli*

Cette espèce appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, cette famille comporte un caractère indispensable qui est la fermentation du glucose et comme *E. coli* est capable de fermenter le glucose il est donc un membre de cette famille. Le genre auquel il appartient présente des caractères déterminants que sont l'ONPG et le lactose, *E. coli* respecte l'appartenance à ce groupe. Il est le seul à répondre aux caractères suivants : Urée (-), Indole (+), ce sont ses caractères d'espèces. [13]

Tous ces caractères ont pu être identifiés déjà à la 8ème heure, l'Indole fait partie des caractères qui nécessitent l'ajout de réactif de révélation à la 24ème heure. Seul l'ONPG n'a pu être identifié cela s'explique par la lenteur de la réaction, il n'a pu être révélé qu'après 24h. Le test à l'ONPG est encore appelé test à la β galactosidase, ce test est indispensable lorsque le lactose ne peut être révélé. Le retard dans l'identification de l'ONPG s'explique par le fait que : la β Gal est une enzyme inductible et le test se réalise en deux temps. Il faut d'abord une induction de l'enzyme par du lactose, ce qui va permettre à l'enzyme d'agir sur le substrat pour donner l'ortho-nitro-phénol. Des études antérieures ont montré que pour favoriser l'élution des disques, il fallait les immerger dans une solution de lactose de 10% [4]. Nous avons pu le révéler, 24 heures après parce que notre milieu d'isolement le CLED contient 10% de lactose.

Nous avons pu avoir jusqu'à 93% de caractères concordants au profil de référence avec des inocula de $7,65 \cdot 10^6$ UFC/ml, de $1,75 \cdot 10^7$ UFC/ml et $1,4 \cdot 10^8$ UFC/ml.

3.2. *Klebsiella pneumoniae*

Cette espèce appartient également à la famille des *Enterobacteriaceae* car comme *E. coli* elle est capable de fermenter le glucose. Comme espèce elle présente des caractères indispensables qui sont le VP (+), l'ODC (-), l'Indole (-). Le VP et l'Indole n'ont pu être identifiés qu'après 24h car leur révélation nécessitait l'ajout de réactifs, ils ont répondu positivement aux normes d'identification de l'espèce. Seul l'ODC a présenté des caractères discordants. Ce caractère est négatif pendant les 12h d'incubation ce qui s'est avéré correct, c'est à la lecture de 24h que ce caractère est devenu positif ce qui est anormal. En effet l'ODC est une enzyme qui scinde l'acide aminé présent dans le milieu, ce milieu contient du glucose et un indicateur coloré. La souche après avoir étéensemencé dans le milieu et que celle-ci soit capable de fermenter le glucose, il va y avoir une acidification du milieu cela va permettre à l'enzyme de la souche de scinder l'acide aminé présent dans le milieu pour donner une amine. Ainsi la présence de l'amine va alcaliniser le milieu et entraîner le virage de l'indicateur coloré [13].

L'explication qu'on pourrait avancer sur la positivité de ce caractère serait une mutation de la souche car la souche de *Klebsiella pneumoniae* ne possède pas cette décarboxylase et donc n'aurait pu scinder l'acide aminé présent dans le milieu.

Les lectures qui ont été faites à 4h et à 8h aux différents inocula n'ont pas donné de bons résultats, nous n'avons pas pu bien identifier la souche de *K. pneumoniae*. L'identification n'a été possible qu'à la 12ème et à la 24ème heure, nous avons obtenu des pourcentages variant entre 80% à 83%.

3.3. *Salmonella paratyphi A* [13, 32]

Contrairement aux deux autres souches celle-ci appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* mais ne fermente pas le lactose. Elle présente des caractères d'espèce qui sont négatifs ce qui permet de la distinguer des autres espèces de *Salmonella*, il y a le LDC, le CS et le H₂S. [10] Le seul caractère discordant que nous ayons rencontré c'est la fermentation du lactose, il s'est avéré être positif pour les inocula de $4 \cdot 10^5$ UFC/ml et de $1,2 \cdot 10^6$ UFC/ml aux heures de lecture de 4h, 8h et 12h ; pour l'inoculum de $1,42 \cdot 10^6$ UFC/ml aux heures de lecture de 4h et 8h enfin pour les inocula de $3,5 \cdot 10^6$ UFC/ml et de $1,2 \cdot 10^7$ UFC/ml pour la première lecture.

Selon Robert FASQUELLE nous pouvons avancer des explications plausibles. Il faudrait tout d'abord que nous parlions de l'isolement de la souche, en effet celle-ci a été ensemencée dans la gélose CLED qui contient 10% de lactose. Les bactéries qui fermentent le lactose possèdent d'une part l'enzyme nécessaire à la pénétration du lactose dans la bactérie, il s'agit de la β -galactoside perméase et d'autre part l'enzyme scindant la molécule de lactose en glucose et en galactose, il s'agit de la β -galactosidase qui est une enzyme induite par le lactose. Si toutefois la souche avait subi plusieurs isolements et par conséquent avait acquis un mutant perméase (+), cette dernière pourrait faire pénétrer le lactose dans la cellule bactérienne. Ainsi la fermentation pourrait avoir lieu et le milieu lactosé serait acidifié avec virage du milieu. L'identification de la souche a été excellente avec des pourcentages de l'ordre de 86% à 100%.

3.4. *Acinetobacter* [13]

Acinetobacter appartient aux bacilles Gram négatifs non fermentaires. Ce genre bactérien fait parti d'un groupe qui ne possède pas d'oxydase ce qui les différencie des autres BGNNF comme les *Pseudomonas*. Il a des

caractères indispensables mais ceux-ci varient en fonction de l'espèce. Nous n'avons pas observé de discordance dans les caractères de *Acinetobacter*. Pour les différents inocula les concordances montrent que *Acinetobacter* a pu être très bien identifié avec des pourcentages variant entre 85% et 100%.

IV. LA VALIDATION

Toute méthode d'analyse doit être validée pour prouver qu'elle correspond bien à l'usage pour lequel, elle est prévue. Pour cela nous avons utilisé la droite de régression qui est un diagramme de dispersion qui montre l'existence d'une relation linéaire en vue d'une prédiction. Nous avons tenté d'établir une relation entre les concordances des caractères et les inocula qui ont servi à leur obtention. Pour les quatre souches étudiées nous avons obtenu les résultats suivants :

<i>E. coli</i> :	$y' = 0,040x + 0,613$
<i>K. pneumoniae</i> :	$y' = 0,039x + 0,444$
<i>S. para typhi A</i> :	$y' = 0,051x + 0,648$
<i>Acinetobacter</i> :	$y' = 0,078x + 0,376$

Nous pouvons constater que les valeurs de a obtenu sont supérieures à zéro, la corrélation est donc positive. A partir de ces droites une corrélation a été établie avec comme coefficient de corrélation des deux variables étudiées :

<i>E. coli</i> :	$r = 0,614$
<i>K. pneumoniae</i> :	$r = 0,725$
<i>S. paratyphi A</i> :	$r = 0,74$
<i>Acinetobacter</i> :	$r = 0,85$

La valeur des coefficients de corrélation trouvée permet de dire que nos droites sont plutôt fiables. Elle permet également de conclure que la relation entre les deux variables tend vers la linéarité dans la mesure où la plupart des coefficients de corrélation r sont bons. Néanmoins il faudrait préciser qu'une très bonne corrélation devrait avoir un coefficient de corrélation égale à 1 ou proche de 1.

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 au niveau de l'hôpital qu'au sein des populations.

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

C'est dans cette perspective que l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec a élaboré une technique d'identification reposant sur l'utilisation de mini galeries à savoir les microplaques CSB. L'efficacité, la fiabilité et la spécificité de celles-ci ont été prouvées et améliorées par des études antérieures. De plus, leur moindre coût a permis leur accessibilité au niveau certaines couches sociales. Leur seule contrainte se situe au niveau de leur compétitivité par rapport à d'autres méthodes d'identification telles que les galeries API qui ont réussi à réduire leur temps d'incubation.

C'est dans cette optique que nous avons cherché à identifier des bacilles Gram négatifs avec un inoculum adéquat et en un temps réduit.

Cette étude a eu lieu au laboratoire de recherche de l'UCAD II du Professeur BOYE entre Janvier et Juin 2008. Elle a porté sur quatre souches à savoir :

- *Escherichia coli* ATCC 25922,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Salmonella Paratyphi A*
- *Acinetobacter*

Escherichia coli

Dès la 8^{ème} heure, l'analyse a révélé une identification acceptable de *E. coli* avec des pourcentages de l'ordre de 80%. Cependant la meilleure identification, tout en restant bien entendu dans l'idée de la réduction du temps d'incubation, a été obtenue à la 12^{ème} heure de lecture de la plaque Micro-CSB Entérobactéries. Le pourcentage des caractères obtenu à cette heure de lecture ont variés entre 86% et 93% pour différents inocula à savoir : $5,5 \cdot 10^6$ UFC/ml, $6,85 \cdot 10^6$ UFC/ml, $7,65 \cdot 10^6$ UFC/ml, $1,75 \cdot 10^7$ UFC/ml et $1,4 \cdot 10^8$ UFC/ml.

Klebsiella pneumoniae

Avec l'espèce *K. pneumoniae*, l'identification n'a été acceptable qu'à la 12^{ème} heure de lecture pour les inocula de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml, de $3,45 \cdot 10^8$ UFC/ml et de $1,75 \cdot 10^9$ UFC/ml avec une concordance de 80%.

Salmonella Paratyphi A

Avec la souche de *S. paratyphi A* l'identification a été excellente. Ainsi dès la 4^{ème} heure la concordance était à 86% avec un maximum de 100% à la 12^{ème} heure de lecture des plaques pour les inocula de $1,42 \cdot 10^6$ UFC/ml, de $3,5 \cdot 10^6$ UFC/ml et de $1,2 \cdot 10^7$ UFC/ml.

Acinetobacter

Acinetobacter a très tôt pu être identifié, avec à la 4^{ème} heure un pourcentage de 85% et un maximum de 100% à la 12^{ème} heure pour des inocula de $3,85 \cdot 10^7$ UFC/ml et de $8 \cdot 10^7$ UFC/ml.

Dans le cas général nous avons pu établir une identification acceptable des souches étudiées avant 24 heures.

En plus d'être une exigence réglementaire, la validation doit également être une exigence de la part du laboratoire lui-même, dans un souci de qualité, de sécurité et de meilleure maîtrise des procédés. C'est dans ce cadre qu'une relation linéaire acceptable a pu être établie entre les deux variables (x et y) à savoir la concordances et les inocula. Les équations de droite de régression ont permis de faire des estimations acceptables.

Par ailleurs, dans une perspective de rendre la recherche plus exhaustive, il serait intéressant d'apprécier la répétabilité ainsi que la reproductibilité de la méthode; mais également d'explorer l'effet du changement de certains paramètres (pH, température, activité enzymatique) sur l'identification.

1. API 20 E

Système d'identification des entérobactéries

Bio Mérieux S. A. France, 2002.

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

Microbiologie générale et santé

Editions ESKA 2003 :155 – 162

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

Bactériologie clinique.

Edition ELLIPSE: 171, 172, 175, 208, 294, 295

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

Bactériologie Clinique

Ellipses, 3^é édition, France, 2000: 114.

5. BAKHOUM I.

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

Thèse Pharm., 2004.N°8

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

Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium.

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

7. BRENNER D.J.

Introduction to the family Enterobacteriaceae

In: Starr M.P., Stolp H.G.

Eds the prokaryotes Spinger- Verlag K.L. Berlin, 1981: 1105 - 1127

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

Bactériologie médicale : Techniques usuelles.

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

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

Bactériologie clinique

Edition marketing, Paris, 1998; 144-145.

10. DRAME B.

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

Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 86.

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

Identification of the *Enterobacteriaceae*

Ed Burgess, Minneapolis, 3rd ed, 1977

12. FARMER

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

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

13. FARMER

Enterobacteriaceae: Introduction and identification

In : Manual of clinical Microbiology, P.R. Murray, E.J. Baron, M.A.

Pfatter, Tenoven F.C. and R.H. Yolken (eds)

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

14. FASQUELLE R.

Eléments de bactériologie médicale.

7^e Editions Médicales Flammarion, Paris 1968 : 160.

15. FERRON A.

Bactériologie médicale

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

16. FERRON A.

BACTERIOLOGIE MEDICALE à l'usage des étudiants en médecine

EDITION C et R, 12^e édition 1984 :122.

17. GUEYE O.

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

Thèse de pharm., 2007 ; n° 36.

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

Historical perspectives on the family Enterobacteriaceae

Lippin Cott Raven Publishers, Philadelphia 1998, 1-7.

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

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

20. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison

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

21. LE MINOR L., VERON M.

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

22. LE MINOR L., VERON N.

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

23. MOUSTARDIER G.

Bactériologie Médicale.
4^é Edition, LIBRAIRIE MALOINE S. A. EDITEUR, Paris 1972 : 805.

24. NDOYE R.

Algorithme d'identification des Entérobactéries et des bacilles gram négatifs non fermentaires.
Thèse Pharm., 2004 ; n° 83.

25. NIANG O.

Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires.
Thèse Pharm., Dakar 2003, n° 60

26. PERRIERE G.

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

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

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

Les entérobactéries

Bactériologie médicale et vétérinaire : Systématique bactérienne.

Doins Paris 2é édition 1979 : 109-187.

28. SANAA. M.

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

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

29. SMAI : 4e rencontres Math- Industrie.

Microbiologie prévisionnelle : Un outil pour estimer la durée de vie des Aliments. (DLC) et Assurer la qualité jusqu'à la consommation.

Article Adria Développement, 4 Avril, 2006 : 2, 3, 20.

30. SOW M. F.

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

Thèse de pharm., 2007

31. VERON M.

Croissance et nutrition bactériennes

Bactériologie médicale, 1984 ; 2:22-28.

32. Article de Wikipedia

Entérobacteriaceae :

« [http : //fr.wikipedia.org/wiki/Enterobacteriaceae](http://fr.wikipedia.org/wiki/Enterobacteriaceae)».

33. Article de Wikipedia

Droite de corrélation :

http://fr.Wikipedia.org/Wiki/R%C3%A9gression_lin%C3%A9aire.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

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

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

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

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

VU
LE PRESIDENT DU JURY

VU
LE DOYEN

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