

Document destiné aux travaux pratiques de bactériologie

Avertissement

Ce document est destiné aux travaux pratiques de bactériologie des étudiants de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. Il vient compléter l'enseignement théorique et l'enseignement oral dispensés aux cours des séances de travaux pratiques.

L'enseignement pratique destiné aux futurs vétérinaires n'a pas pour vocation de les transformer en bactériologistes. Il a pour objectif de donner un aperçu sur les modalités du diagnostic bactériologique conventionnel afin de favoriser le dialogue entre les vétérinaires praticiens et les laboratoires de diagnostic. Le diagnostic moléculaire et le diagnostic immunologique sont abordés aux cours d'autres séances de travaux pratiques.

Toutes les manipulations effectuées par les étudiants font préalablement l'objet d'une démonstration.

Il serait hors sujet d'envisager tous les détails du diagnostic conventionnel, si bien que les quelques indications données ci-dessous sont limitées aux manipulations réalisées par les étudiants et elles sont simplifiées. Cette simplification peut conduire à quelques inexactitudes susceptibles de surprendre un bactériologiste. Toutefois, l'auteur espère que ces quelques approximations ne constituent pas des erreurs fondamentales.

Des informations complémentaires peuvent être trouvées dans les ouvrages suivants :

J. FRENEY, F. RENAUD, R. LECLERQ et P. RIEGEL : Précis de bactériologie clinique, 2ème éd., Editions ESKA, Paris, 2007, 1764 pages.
Voir notamment le chapitre 4 (pages 67-108).

N. MARCHAL, J.L. BOURDON et C. RICHARD : Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin éditeurs, Paris, 1982, 482 pages.

Informations importantes

Les séances de travaux pratiques débutent à 8h30 et elles ont lieu dans la salle de travaux pratiques de Microbiologie-Immunologie-Biologie moléculaire.

Les étudiants doivent se munir d'une blouse en coton, d'une pince à mors plats (qui peut être remplacée par une pince à linge), d'un feutre capable d'écrire sur le verre et, si possible, d'un crayon gras.

Déroulement des séances

Jour 1

Remise d'un bouillon de culture contenant un mélange de deux bactéries.

Etat frais, coloration de Gram.

Isolement sur une gélose trypticase-soja, une gélose Columbia au sang de mouton, une gélose BCP et une gélose de Mac Conkey.

Jour 2

Observation des isollements, repérage des deux types de colonies.

Coloration de Gram sur chaque type de colonies.

Ensemencement d'une galerie d'identification pour l'une des deux bactéries.

Jour 3

Lecture et interprétation de la galerie d'identification.

Réalisation d'un antibiogramme.

Jour 4

Lecture et interprétation de l'antibiogramme.

Coloration de Ziehl sur un décalque d'organe.

Précautions à prendre lors des manipulations

Deux impératifs :

Prévenir la contamination du manipulateur et de son entourage

Eviter la contamination des milieux

Mesures de sécurité contre la contamination du manipulateur et de son entourage

Le bactériologiste est responsable de ses actes vis-à-vis de lui-même et de son entourage. Il doit respecter une discipline générale de travail, même si les bactéries étudiées au cours des travaux pratiques ne présentent pas un danger majeur.

Avant de pénétrer dans la salle de travaux pratiques, le bactériologiste doit (i) déposer au vestiaire ses vêtements de ville tels que manteau, imperméable, veste ... ainsi que tous les objets personnels non indispensables à son travail et (ii) revêtir une blouse propre fermée sur le devant (les blouses en fibres synthétiques sont prohibées car elles sont inflammables et supportent mal l'ébullition et la javellisation).

Il est interdit de manger, de boire ou de fumer dans un laboratoire de bactériologie ou dans la salle de travaux pratiques.

En cours de travail, les mains peuvent être souillées. Aussi, on évitera de porter les mains au visage, de toucher des objets personnels (mouchoirs, sac, ...), de serrer la main d'un visiteur, etc.

Le lavage des mains doit être effectué au moindre soupçon de contamination.

Après les manipulations il convient de nettoyer soigneusement les paillasse et de les désinfecter avec de l'eau de Javel.

Une désinfection immédiate doit être effectuée en cas de projection de matière virulente ou lors de la casse accidentelle d'un récipient contenant un produit pathologique ou une culture bactérienne.

Tout matériel en verre ayant été au contact avec une matière virulente doit être placé dans les bocaux contenant de l'eau de Javel.

Mesures destinées à éviter la contamination des milieux

Il est impératif de travailler dans le cône de stérilité d'un bec bunsen, sans parler et en évitant les courants d'air.

Etat frais

Déposer une goutte d'une culture en milieu liquide sur une lame de verre.

Recouvrir la goutte d'une lamelle couvre objet (la culture ne doit pas déborder les contours de la lamelle).

Luter la lame avec de la paraffine fondue.

Observer immédiatement au microscope (objectif x40, condenseur non relevé au maximum, diaphragme non complètement ouvert).

Après observation jeter immédiatement la lame dans un bocal contenant de l'eau de Javel

Coloration de Gram (Kit Gram-Nicolle RAL)

Voir aussi le fichier [Principe de la coloration de Gram](#)

À partir d'une culture en milieu liquide

Déposer une goutte de bouillon au centre d'une lame de verre, étaler la goutte et laisser sécher.

Fixer par flambage à l'alcool à 95°.

Recouvrir la lame de violet de gentiane phéniqué et laisser agir une minute.

Rincer rapidement à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.

Recouvrir la lame de lugol ("Liquide de lugol stabilisé PVP") et laisser agir une minute.

Rincer à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.

Différencier (décolorer) avec un mélange alcool -acétone ("Différenciateur rapide"). Ce temps est le plus délicat de la coloration de Gram (cf. démonstration réalisée au cours des travaux pratiques).

Rincer abondamment à l'eau du robinet.

Recouvrir la lame de fuchsine de Ziehl 1/10 et laisser agir une minute.

Rincer à l'eau du robinet.

Sécher puis observer au microscope (objectif x100 à immersion).

À partir d'une colonie

Déposer une goutte d'eau sur une lame de verre.

Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.

Dissocier soigneusement l'inoculum dans la goutte d'eau et laisser sécher.

Fixer par flambage à l'alcool à 95°.

Poursuivre la coloration comme indiquée ci-dessus.

Coloration de Ziehl (Ziehl-Neelsen)

Les lames remises aux étudiants (décalsque d'organe) sont déjà fixées.

Recouvrir la lame de Fuchsine de Ziehl.

Chauffer jusqu'à émission de vapeurs blanches (voir démonstration effectuée lors des travaux pratiques).

Laisser refroidir environ trois minutes.

Répéter deux fois le chauffage si bien que dans un temps de l'ordre de 10 minutes la lame aura été chauffée trois fois.

Rincer à l'eau du robinet.

Recouvrir la lame d'acide sulfurique au 1/4 et laisser agir une minute.

Rincer à l'eau du robinet.

Recouvrir la lame d'alcool à 95° et laisser agir une minute.

Rincer à l'eau du robinet.

Recouvrir la lame avec une solution diluée de bleu de méthylène et laisser agir deux minutes.

Rincer à l'eau du robinet.

Sécher puis observer au microscope (objectif x100 à immersion).

Milieux de culture utilisés au cours des travaux pratiques

Pour une information générale concernant les milieux de culture, voir le fichier "[Nutrition et croissance des bactéries \(procaryotes\)](#)".

Bouillon Trypticase- soja bioMérieux (composition en grammes par litre) :

bio-Trypcase : 17 g/L

bio-Soyase : 3 g/L

Chlorure de sodium : 5 g/L

Phosphate bipotassique : 2,5 g/L

Glucose : 2,5 g/L

pH : 7,3

Le bouillon trypticase soja est un milieu largement utilisé et permettant la croissance de bactéries exigeantes.

Gélose Trypticase-soja bioMérieux (composition en grammes par litre) :

bio-Trypcase : 15 g/L

bio-Soyase : 5 g/L

Chlorure de sodium : 5 g/L

Agar : 15 g/L

pH : 7,3

La gélose trypticase-soja présente les mêmes avantages que le bouillon, mais elle permet de réaliser un isolement.

Gélose Columbia + 5% sang de mouton bioMérieux

bio-Polytone : 10 g/L

Hydrolysate de protéines animales et végétales : 10 g/L

bio-Myotone : 3 g/L

Amidon de maïs : 1 g/L

Chlorure de sodium : 5 g/L

Agar : 13,5

Sang défibriné de mouton : 5%

pH : 7,3

La gélose Columbia contient de l'amidon qui joue un rôle protecteur en neutralisant des substances toxiques contenues dans les milieux ou élaborées au cours de la culture. Outre son rôle nutritif, la présence de sang permet de visualiser des zones d'hémolyse qui sont particulièrement nettes sur ce milieu.

Gélose de Mueller Hinton bioMérieux

Infusion de viande bœuf : 300 g/L

bio-Case : 17,5 g/L

Amidon : 1,5 g/L

Agar : 17 g/L

pH : 7,3

La gélose de Mueller-Hinton est le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Gélose BCP bioMérieux :

Extrait de viande de bœuf : 3 g/L

bio-Polytone : 5 g/L

Lactose : 10 g/L

Agar : 10 g/L

Bromocrésol pourpre : 25 mg/L

Ce milieu permet la croissance des bactéries sans exigences particulières. La présence de lactose et d'un indicateur de pH permet de différencier les bactéries qui fermentent le lactose de celles qui ne le fermentent pas. Toutefois, ce milieu donne des résultats difficiles à interpréter lors de l'isolement de prélèvements polymicrobiens renfermant à la fois des bactéries lactose-positives et lactose-négatives. En effet, le virage de l'indicateur diffuse dans le milieu. De plus, une réalcalinisation rapide est observée lors d'une incubation supérieure à 18-24 heures.

Les bactéries lactose-positives donnent des colonies jaunes et les bactéries lactose-négative donnent des colonies bleues.

La gélose BCP présente l'avantage d'abolir ou de limiter l'essaimage des *Proteus* spp.

Gélose de Mac Conkey bioMérieux

bio-Gelytone : 17 g/L

bio-Polytone : 3 g/L

Lactose : 10 g/L

Sels biliaires : 1,5 g/L

Chlorure de sodium : 5 g/L

Agar : 13,5 g/L

Rouge neutre : 0,03 g/L

Cristal violet : 0,001 g/L

pH : 7,1

La gélose de MacConkey contient deux inhibiteurs : le cristal violet (qui inhibe la croissance des bactéries à Gram positif) et les sels biliaires (sélection des entérobactéries). Ce milieu contient également du lactose et un indicateur de pH.

Les bactéries lactose-positives donnent des colonies d'une couleur rouge brique ou rose, entourées d'un halo opaque dû à la précipitation des sels biliaires. Les bactéries lactose-négatives donnent des colonies incolores.

Gélose viande-foie (VF)

Peptone pepsique de viande et de foie : 30 g/L

Glucose : 2 g/L

Agar : 6 g/L

Ce milieu sera utilisé pour l'étude du type respiratoire (Cf. *infra*).

Eau peptonée

Milieu présent dans certains microtubes de la galerie d'identification (voir [galeries API 20 E](#))

Eau distillée : 1 L

Peptone trypsique : 15 g

NaCl : 5 g

L'eau peptonée doit être exempte d'indole et de sucres fermentescibles et elle doit contenir du tryptophane en quantité suffisante.

Galerie d'identification

À l'exception de la recherche du type respiratoire, du test catalase et du test oxydase, l'identification sera conduite à l'aide d'un dispositif commercialisé et prêt à l'emploi, la galerie API 20 E (bioMérieux). Une présentation de cette galerie est donnée ci-dessous (voir page 16).

Etude du type respiratoire

Principe

Les milieux utilisés contiennent du glucose (métabolisme énergétique), mais ils sont dépourvus de nitrates qui pourraient être réduits et permettre le développement en anaérobiose de certaines bactéries aérobies (par exemple, *Pseudomonas aeruginosa*).

On utilise des géloses profondes telle que la gélose VF (viande foie), coulées dans des tubes longs et étroits (180 mm x 9 mm).

Technique

Au moment de l'emploi, placer les tubes dont la capsule a été partiellement dévissée dans un bain-marie bouillant pendant 20 minutes (régénération du milieu). Maintenir les milieux en surfusion dans un bain-marie à 45-50 °C.

Plonger l'effilure d'une pipette pasteur boutonnée et stérilisée par flambage dans une suspension de la bactérie à étudier. Transporter l'inoculum dans le fond du tube puis remonter la pipette en décrivant des tours de spires très serrés en prenant soin de ne pas aérer le milieu.

Incuber à 37 °C durant 18 à 24 heures

Lecture

Après incubation, on peut reconnaître quatre types respiratoires :

bactérie aérobie (aérobie strict) : croissance uniquement dans la zone superficielle de la gélose ;

bactérie anaérobie (anaérobie strict) : croissance uniquement dans la zone profonde de la gélose ;

bactérie aéro-anaérobie (aéro-anaérobie facultatif) : croissance sur toute la hauteur de la gélose ;

bactérie micro-aérophile : croissance dans un cylindre de gélose d'environ 0,5 cm de hauteur et situé à environ 1 à 2 cm de la surface.

Recherche de la catalase

Principe

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène.

Technique

Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes.

Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

Lecture

La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène.

Remarques

Au cours des travaux pratiques, l'eau oxygénée à 10 volumes sera remplacée par un réactif commercialisé, ID color Catalase (bioMérieux). Ce réactif est constitué d'eau oxygénée à 10 volumes, d'un agent épaississant et de bleu d'Evans. La réaction est censée être plus lisible et plus stable grâce à la présence de l'agent épaississant qui emprisonne les bulles d'oxygène.

Il est conseillé de ne pas prélever la culture sur une gélose au sang car le sang possède une activité catalasique. Aussi, la présence de sang pourrait provoquer une réaction faussement positive.

Recherche de l'oxydase

Principe

Le test de l'oxydase met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. Ce test met en évidence la présence de cytochrome c dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c.

La réaction est schématiquement la suivante :

cyt c oxydé + réactif réduit ---> réactif coloré.

Technique

Plusieurs réactifs sont commercialisés et plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Au cours des travaux pratiques, la recherche de l'oxydase sera effectuée à l'aide de bandelettes "Bactident Oxydase" (Merck) dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4-phénylènediaminedichlorure.

Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture sur le papier filtre.

Lecture

La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé.

Recherche d'une nitrate-réductase

Principe

Certaines bactéries peuvent utiliser comme accepteur final d'électrons des composés minéraux riches en oxygène (respiration anaérobie). C'est le cas en particulier des nitrates qui sont alors réduits en nitrites. La réduction peut aller au-delà du stade nitrites et conduire à la formation d'azote gazeux (N₂).

La recherche d'une nitrate-réductase se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Les nitrites en milieu acétique ou sulfurique donnent une coloration rose ou rouge en présence d'acide parasulfanilique et d'alpha-naphtylamine.

Toutefois, comme certaines bactéries réduisent les nitrates au-delà du stade nitrites, toute réaction apparaissant négative (absence de coloration rose ou rouge) doit être contrôlée pour constater la présence ou la disparition des nitrates contenus à l'origine dans le milieu. Dans ce but, on ajoute au milieu de la poudre de zinc (épreuve de Zo Bell). Le zinc est un agent réducteur capable de réduire en quelques minutes les nitrates en nitrites.

Si la réaction est véritablement négative, les nitrates toujours présents dans le milieu sont réduits en nitrites sous l'action du zinc et une coloration rose ou rouge apparaît.

Si la réaction est faussement négative, les nitrates ont été réduits par les bactéries en azote gazeux. Le milieu ne contient plus de nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la teinte du milieu n'est pas modifiée.

Technique

Cultiver la bactérie dans un bouillon nitraté (1 p. mille de nitrate de potassium).

Incuber à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une culture abondante.

Ajouter une ou deux gouttes d'acide parasulfanilique en milieu acétique (réactif NIT 1) puis une à deux gouttes d'alpha-naphtylamine en milieu acétique (réactif NIT 2).

Lecture

Apparition en quelques secondes d'une coloration rose ou rouge : réaction positive, la bactérie réduit les nitrates en nitrites.

Absence de coloration : ajouter de la poudre de zinc :

Apparition en cinq minutes d'une coloration rose ou rouge : réaction négative.

Absence de coloration : réaction positive (bactérie réduisant les nitrites jusqu'au stade azote gazeux).

Remarque

Dans une galerie API 20 E, la recherche de la nitrate réductase se fait dans le tube marqué GLU (glucose). Cette recherche doit s'effectuer après avoir noté une éventuelle acidification du glucose (cf. *infra*).

Etude de l'acidification des glucides et dérivés

Principe

Ces tests recherchent la capacité d'un germe à utiliser par voie oxydative ou fermentative un substrat carboné avec production de métabolites acides (production faible pour les bactéries à métabolisme oxydatif, production importante pour les bactéries à métabolisme fermentatif).

Les substrats utilisés au cours des travaux pratiques sont listés ci-dessous :

Oses : arabinose (pentose), glucose (hexose).

Dérivés des oses : amygdaline, mannitol, rhamnose, sorbitol.

Diholosides : mélibiose, saccharose.

Molécule organique cyclique : inositol.

Le substrat carboné, dont on veut étudier l'acidification, doit être placé dans un milieu ne contenant aucun autre substrat fermentescible (par exemple une eau peptonée). L'utilisation du substrat carboné conduit à une acidification du milieu révélée par un indicateur de pH.

Technique

Ensemencer le milieu contenant le substrat carboné et l'indicateur de pH (bleu de bromothymol).

Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

Lecture

Le virage au jaune du bleu de bromothymol indique l'utilisation du substrat carboné (la fermentation commence dans la partie inférieure du tube, l'oxydation débute dans la partie supérieure du tube).

La présence d'une coloration bleue ou bleue-verte est le signe d'une réaction négative.

Test ONPG (orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside)

Principe

Pour que le lactose soit utilisé par les bactéries, il doit être scindé par des enzymes intracellulaires, les bêta-galactosidases. Ces enzymes sont spécifiques de la liaison bêta-1,4-osidique et elles hydrolysent le lactose en glucose et galactose.

Pour qu'une bactérie utilise le lactose, il faut que le lactose puisse pénétrer dans la cellule. Cette pénétration nécessite une autre enzyme, la bêta-galactoside perméase. Si cette enzyme est déficiente ou absente, une bactérie potentiellement capable d'utiliser le lactose (possédant une bêta-galactosidase) ne pourra exprimer ce caractère et paraîtra lactose négative.

L'objet du test ONPG est d'étudier l'existence d'une bêta-galactosidase (et donc la possibilité d'acidifier le lactose), indépendamment de la présence ou de l'absence d'une bêta-galactoside perméase. La lecture est alors très rapide et on dispose ainsi d'une réaction complémentaire pour l'étude des germes apparaissant lactose négative après 24 à 48 heures d'incubation.

La bêta-galactosidase libérée de la cellule bactérienne (lyse théoriquement provoquée par le toluène) va agir sur un galactose substitué, l'orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside ou ONPG. L'hydrolyse de l'ONPG libère de l'orthonitrophénol qui présente une coloration jaune très stable.

Technique

Réaliser une suspension du germe à étudier dans de l'eau physiologique contenant une solution tamponnée d'ONPG.

Incuber à 37 °C après avoir éventuellement ajouté une goutte de toluène.

Lecture

Apparition d'une coloration jaune : bactérie ONPG positive.

Absence de coloration, bactérie ONPG négative.

Remarques

En cas de réaction positive, une coloration jaune apparaît souvent en moins de 30 minutes. Toutefois, dans le cadre des travaux pratiques la réaction ne sera lue qu'après 18 à 24 heures d'incubation.

Toutes les bactéries possédant une bêta-galactosidase présentent un test ONPG positif. Toutefois, certaines bactéries dépourvues de bêta-galactosidase peuvent hydrolyser l'ONPG grâce à une autre enzyme appelée ONPGase. La dénomination de "test ONPG" est donc plus correcte que la dénomination de "recherche de la bêta-galactosidase".

Utilisation du citrate

Principe

Certaines bactéries sont capables d'assimiler le citrate, c'est à dire capables d'utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie. Ces bactéries possèdent une citrate perméase et les enzymes du catabolisme du citrate.

De telles bactéries sont capables de croître sur un milieu synthétique, le milieu au citrate de Simmons, dont l'unique source de carbone est le citrate de sodium. Ce milieu contient également des sels d'ammonium comme unique source d'azote et du bleu de bromothymol comme indicateur de pH. Initialement, le pH du milieu est de 7,0 et, à un tel pH, le bleu de bromothymol a une teinte verte.

La croissance sur le milieu au citrate de Simmons s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage au bleu (bleu outre-mer) du bleu de bromothymol.

Technique

Ensemencer le milieu au citrate de Simmons à partir d'une culture prélevée sur un milieu gélosé. En aucun cas on ne se servira d'une culture en bouillon ou en eau peptonée qui apporterait avec les germes des éléments nutritifs susceptibles de fausser les résultats.

Incuber à 37 °C.

Observer le milieu tous les jours durant cinq jours.

Lecture

La majorité des auteurs considère qu'une bactérie est citrate de Simmons positive lorsqu'elle utilise le citrate en provoquant une alcalinisation du milieu. Cette interprétation est celle retenue par bioMérieux pour la lecture d'une galerie API 20 E.

Présence d'une coloration bleue (même localisée uniquement en surface) : réaction positive.

Présence d'une coloration verte dans tout le milieu : réaction négative (même en présence d'une culture).

Réaction de Voges-Proskauer (VP)

Principe

Les réactions de Voges-Proskauer (VP) permet l'étude des dérivés de l'acide pyruvique.

Le glucose, utilisé par les bactéries, est dégradé en acide pyruvique qui est un intermédiaire clef du métabolisme des glucides. Selon les bactéries, l'acide pyruvique peut être complètement oxydé ou être le point de départ de diverses voies fermentaires conduisant à une très grande variété de composants finaux dont la nature est caractéristique du type fermentaire :

La fermentation acide mixte conduit à la production d'acide formique, d'acide acétique, d'acide lactique, d'acide propionique, d'acide succinique, de dioxyde de carbone, d'hydrogène, d'éthanol, etc. La fermentation acide mixte provoque une acidification importante d'un milieu glucosé. La fermentation acide mixte est étudiée par le test au rouge de méthyle non effectué dans le cadre des travaux pratiques.

La fermentation butylène glycolique (butanediolique) conduit à la production de 2-3-butanediol. La suite des réactions conduisant au 2-3-butanediol est la suivante : (i) condensation de deux molécules de pyruvate avec décarboxylation et formation d'acide alpha-acétolactique, (ii) décarboxylation de l'alpha-acétolactate et formation d'acétoïne (hydroxy-3-butanone) et (iii) réduction de l'acétoïne en 2-3 butanediol.

Le test VP permet de caractériser l'acétoïne. En présence d'oxygène et d'une base forte (soude 4M ou potasse 4M), l'acétoïne est oxydée en diacétyle qui forme un complexe coloré en rose en réagissant avec une fonction amine d'un groupement guanidyle des protéines. La réaction est plus sensible et plus rapide en présence d'alpha-naphtol.

Technique

Ensemencer un milieu de Clark et Lubs (peptone, phosphate bipotassique, glucose, pH 7,5).

Incuber 48 heures à 37 °C.

Prélever 1 mL de milieu et ajouter 0,5 mL de KOH ou de NaOH (réactif VP 1) et 0,5 mL d'alpha-naphtol (réactif VP 2).

Lecture

Attendre un temps maximum de 10 minutes. La présence d'acétoïne (bactérie VP positive) se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

Remarques

Le milieu utilisé dans une galerie API 20E est un milieu de Clark et Lubs modifié dans lequel le glucose est remplacé par de l'acide pyruvique ce qui permet de lire le test après 24 heures d'incubation.

Dans une galerie API 20E, les réactifs VP 1 (hydroxyde de potassium) et VP 2 sont directement ajoutés au milieu (sans qu'il soit nécessaire de prélever un aliquot du milieu).

Gélatinase (méthode de Kohn-Lautrop)

Principe

La technique rapide de Kohn-Lautrop consiste à faire attaquer par la bactérie à étudier un fragment de gélatine dans lequel on a préalablement inclus du charbon de bois finement pulvérisé (gélatine dénaturée au charbon). La gélatinase, éventuellement produite par le germe, désagrège la gélatine et libère le charbon de bois qui diffuse dans tout le milieu.

Technique

Ensemencer un tube d'eau peptonée dans lequel est introduit de la gélatine dénaturée au charbon.

Incuber à 37 °C.

Observer quotidiennement pendant au moins 8 jours.

Lecture

L'hydrolyse de la gélatine se traduit par la libération de particules de charbon de bois qui colorent le milieu en noir.

Remarque

Au cours des travaux pratiques, la lecture sera effectuée après 18 à 24 heures d'incubation.

Test LDC (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase) et ADH (arginine dihydrolase)

Principe

Ces enzymes, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés.

La décarboxylation de la lysine produit de la cadavérine, la L-ornithine est décarboxylée en putrescine et l'arginine est décarboxylée en agmatine puis hydrolysée en putrescine.

Les milieux utilisés ne contiennent qu'un seul acide aminé (lysine, ornithine ou arginine), du glucose, des extraits de levure, du chlorure de sodium et un indicateur de pH (rouge de phénol).

La recherche de ces enzymes n'est effectuée que pour des bactéries à métabolisme fermentatif. Dans un premier temps, les bactéries fermentent le glucose et les milieux s'acidifient (virage au jaune du rouge de phénol). À pH acide, la synthèse des décarboxylases est favorisée et ces enzymes présentent une activité maximale. Dans un second temps, la production éventuelle d'une décarboxylase conduit à la formation de composés alcalins et à l'alcalinisation du milieu ce qui provoque le virage au rouge du rouge de phénol.

Technique

Ensemencer chacun des trois tubes avec une suspension bactérienne.

Réaliser une anaérobiose en recouvrant la surface du milieu d'huile de paraffine.

Incuber à 37° C.

Lecture

Apparition d'une coloration jaune (acidification du milieu) : réaction négative.

Apparition d'une coloration orange foncée ou rouge (alcalinisation du milieu) : réaction positive.

Remarque

Dans une galerie API 20 E, un tampon acide remplace l'acidification due à la fermentation du glucose, d'où une sensibilité plus grande.

Hydrolyse de l'urée (uréase).

Principe

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone. En solution, le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu.

Technique

Ensemencer un milieu synthétique contenant de l'urée, du tryptophane et du rouge de phénol (milieu urée-indole).

Recouvrir la surface du milieu d'huile de paraffine pour éviter la libération d'ammoniac.

Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

Lecture

Uréase positive : le milieu présente une coloration rouge violacée ou orange foncée.

Uréase négative : le milieu a une teinte jaune.

Tryptophane désaminase

Principe

La tryptophane désaminase désamine le tryptophane pour donner de l'acide indole-pyruvique. En présence de perchlorure de fer et en milieu acide, l'acide indole-pyruvique donne un composé de couleur brune foncée (presque noire).

Technique

Ensemencer un milieu urée-indole.

Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

Lecture

Ajouter une goutte d'une solution acide de perchlorure de fer (réactif TDA).

Apparition d'une coloration brune foncée : bactérie TDA positive.

Apparition d'une coloration jaune : bactérie ne produisant pas de tryptophane désaminase.

Remarque

Dans une galerie API 20 E, le milieu urée-indole est remplacé par de l'eau peptonée enrichie en tryptophane.

Production d'indole

Principe

Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du paradiméthylaminobenzaldéhyde pour donner un composé coloré en rouge.

Technique

Ensemencer un milieu urée-indole.

Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

Lecture

Ajouter une goutte du réactif de James dont la composition n'est pas révélée par la société bioMérieux.

Réaction positive : apparition d'une coloration rouge qui diffuse dans tout le milieu.

Réaction négative : milieu incolore ou présentant une légère coloration jaune.

Remarque

Dans une galerie API 20 E, le milieu urée-indole est remplacé par de l'eau peptonée enrichie en tryptophane.

Production d'hydrogène sulfuré : recherche d'une thiosulfate réductase

Principe

L'hydrogène sulfuré peut être formé par le métabolisme des acides aminés soufrés (méthionine, cystéine, cystine) ou par la réduction de composés oxydés du soufre comme le thiosulfate. Seule la réduction du thiosulfate est envisagée ci-dessous.

La réduction du thiosulfate par une thiosulfate réductase conduit à la formation de sulfure et d'hydrogène sulfuré. En présence de sulfate de fer, l'hydrogène sulfuré donne un précipité noir de sulfure de fer.

Technique

Ensemencer un milieu contenant du thiosulfate et du sulfate de fer.

Recouvrir la surface du milieu d'huile de paraffine pour piéger l'éventuel dégagement gazeux d'hydrogène sulfuré.

Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

Lecture

La synthèse d'une thiosulfate réductase conduit à l'apparition d'une coloration noire.

Présentation des galeries API 20 E (d'après la documentation bioMérieux).

Principe

La galerie API 20 E, commercialisée par la société bioMérieux, est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé.

La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique (milieu "Suspension Medium"). Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (voir ci-dessous le tableau de lecture).

Un fond et un couvercle complètent la galerie *sensu stricto* et permettent de constituer une boîte d'incubation.

La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H₂S), synthèse d'une uréase (URE), recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), production d'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf "glucides" : glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amygdaline (AMY), et arabinose (ARA).

La galerie permet également la recherche de la nitrate réductase qui se fait dans le microtube "GLU".

Technique

Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.

Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte.

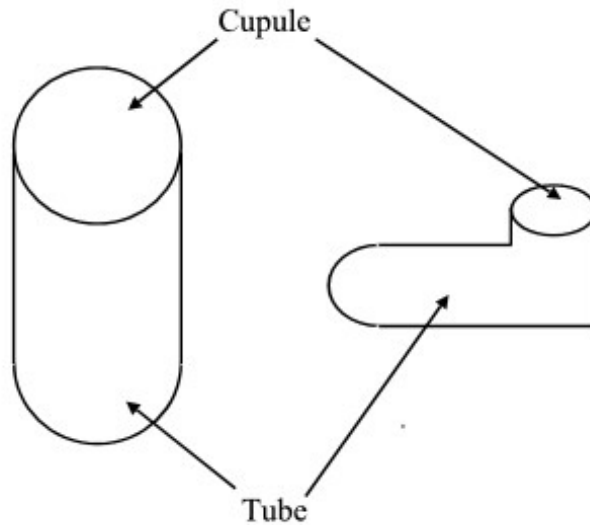
Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée. Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de "suspension Medium".

À l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Au sein des microtubes, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule.

Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule.

Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H₂S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.

Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube.



Représentation schématique d'un microtube d'une galerie API 20 E

Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et placer la boîte à 37 °C durant 18 à 24 heures.

Lecture

Sortir la boîte de l'étuve et noter sur la fiche de lecture les résultats obtenus pour les tests à lecture spontanée (voir ci-dessous le tableau de lecture).

Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir ci-dessous le tableau de lecture) :

TDA : ajouter une goutte du réactif TDA

IND : ajouter une goutte du réactif de James

VP : ajouter une goutte du réactif VP 1 et une goutte du réactif VP 2

Nitrate réductase : après avoir noté le résultat obtenu pour l'acidification du glucose, ajouter une goutte du réactif NIT 1 et une goutte du réactif NIT 2. Si aucune coloration rouge n'est obtenue (attendre deux à trois minutes), ajouter une petite quantité de poudre de zinc.

Noter les résultats sur la fiche de lecture.

Calculer le profil numérique.

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois (chaque groupe de trois tests est séparé du groupe voisin par un trait vertical).

Chaque test donnant une réaction négative prend la valeur 0.

Lorsqu'un test est positif, il prend la valeur 1, 2 ou 4 selon sa position au sein d'un groupe de trois : si le premier test d'un groupe de trois est positif il est noté 1, si le deuxième test est positif il est noté 2 et si le dernier test d'un groupe de trois est positif il est noté 4.

Le 21ème test mentionné sur la fiche de résultat (OX), correspond à l'oxydase (test réalisé avant l'ensemencement de la galerie).

Pour chaque groupe de trois, additionner les chiffres correspondants. On obtient un nombre à sept chiffres qui constitue le profil numérique de la souche étudiée.

La recherche du profil numérique dans le "Catalogue analytique" commercialisé par le fabricant permet d'identifier la bactérie.

Si le profil à sept chiffres ne permet pas une identification, il convient de noter les résultats obtenus pour les tests réduction des nitrates en nitrites (NO₂), réduction des nitrates en azote (N₂), mobilité (MOB), croissance sur gélose de Mac Conkey (McC), oxydation du glucose (OF-O), fermentation du glucose (OF-F). On obtient alors un profil numérique à neuf chiffres plus discriminant que le précédent.

Tableau de lecture d'une galerie API 20 E

Tests*	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactifs	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	Bêta-galactosidase	2-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside	Non	Incolore	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	L-arginine	Non	Jaune	Orange ou rouge
LDC	Lysine décarboxylase	L-lysine	Non	Jaune	Orange ou rouge
ODC	Ornithine décarboxylase	L-ornithine	Non	Jaune	Orange ou rouge
CIT	Assimilation du citrate	Citrate trisodique	Non	Vert pâle ou jaune	Bleu-vert ou bleu
H ₂ S	Thiosulfate réductase	Thiosulfate de sodium	Non	Incolore ou grisâtre	Dépôt noir
URE	Uréase	Urée	Non	Jaune	Orange ou rouge violacé
TDA	Tryptophane désaminase	L-tryptophane	TDA	Jaune	marron ou brun foncé
IND	Production d'indole	L-tryptophane	James	Incolore ou jaune	Rose ou rouge
VP	Production d'acétoïne	Pyruvate de sodium	VP1 VP2	Incolore	Rose ou rouge
GEL	Gélatinase	Gélatine de bœuf	Non	Non diffusion du charbon	Diffusion du charbon
GLU	Glucose	D-glucose	Non	Bleu ou bleu	Jaune

				vert	
MAN	Mannitol	D-mannitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Inositol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	D-sorbitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	L-rhamnose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SAC	Saccharose	D-saccharose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
MEL	Mélibiose	D-mélibiose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Amygdaline	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	L-arabinose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune

*

Pour les tests dont les sigles sont écrits en lettres noires seul le tube doit être ensemencé.

Pour les tests dont les sigles sont écrits en lettres rouges le tube et la cupule doivent être ensemencés.

Pour les tests dont les sigles sont écrits en lettres bleues seul le tube doit être ensemencé. Après ensemencement, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine.

Antibiogramme par la méthode de diffusion

Principe

Voir le fichier "[Antibiogramme](#)".

Technique

L'antibiogramme par la technique de diffusion est l'objet d'une standardisation rigoureuse (voir le fichier "[Standardisation de l'antibiogramme](#)").

Notamment, la densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial et elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité. Au cours des travaux pratiques, il est difficile d'ajuster de manière précise la densité de cet inoculum et la technique indiquée ci-dessous conduit à des résultats certainement erronés. Toutefois, le but des travaux pratiques est de faire comprendre un principe et non de rendre des résultats corrects à un vétérinaire praticien. Aussi, pour des raisons pratiques, une technique peu précise sera utilisée.

Prélever une colonie parfaitement isolée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.

Dissocier la colonie dans un tube contenant 10 mL d'eau physiologique stérile. Homogénéiser soigneusement la suspension.

Prélever 1 mL de la suspension obtenue et le transférer dans un deuxième tube contenant 10 mL d'eau physiologique. Homogénéiser soigneusement la suspension.

À l'aide d'une pipette Pasteur, inonder la surface d'une gélose de Mueller-Hinton avec deux à quatre mL de la suspension. Enlever soigneusement l'excès de liquide.

Sécher les boîtes à température ambiante.

Appliquer les disques à l'aide du distributeur de disque.

Antibiotiques testés : ampicilline, streptomycine, gentamicine, colistine, acide nalidixique, association triméthoprim/sulfaméthoxazole.

Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

Lecture

Voir le fichier "[Antibiogramme](#)".

Pour chacun des disques d'antibiotique, mesurer le diamètre de la zone d'inhibition. Comparer ce diamètre aux diamètres critiques indiqués dans le tableau ci-dessous.

Concentrations et diamètres critiques pour une espèce de la famille des *Enterobacteriaceae* (d'après les "[Recommandations du Comité de l'antibiogramme de la SFM](#)")

Antibiotique (symbole)	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Ampicilline (AM)	10 µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14
Streptomycine (S)	10 µg	≤ 8	> 16	≥ 15	< 13
Gentamicine (GM)	10 UI (15 µg)	≤ 2	> 4	≥ 16	< 14
Acide nalidixique (NA)	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 20	< 15
Colistine (CS)	50 µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (SXT)	1,25/23,75 µg	≤ 2 /38	> 8 /152	≥ 16	< 10