

TD 5

Tests d'identification biochimique des bactéries

L'identification bactérienne est une étape très importante dans le diagnostic au laboratoire d'une maladie ou d'une contamination. Une série de tests biochimiques est utilisée pour identifier les diverses propriétés métaboliques des différentes espèces bactériennes. Généralement, un seul test biochimique ne suffit pas pour identifier une bactérie inconnue, mais en combinant plusieurs tests en galerie biochimique classique ou miniaturisée de type API, il est possible de parvenir à l'identification précise d'une espèce bactérienne.

Des tests biochimiques conventionnels du métabolisme respiratoire, glucidique ou protéique, pour la différenciation de bactéries ou pour leur identification, sont utilisés en pratique courante au laboratoire.

A. Galerie biochimique classique

1. Test de catalase.

Ce test est utilisé pour identifier les organismes qui produisent l'enzyme catalase. Cette enzyme détoxifie le peroxyde d'hydrogène en le décomposant en eau et en oxygène ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$). Les bulles résultant de la production d'oxygène gazeux indiquent clairement un résultat positif pour la catalase



2. Test de Mannitol-Mobilité

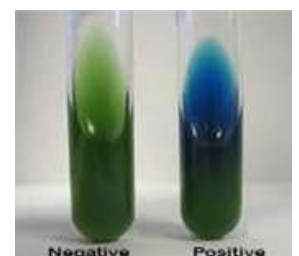
Le milieu mannitol mobilité est un milieu combiné. Il est utilisé pour la détermination de trois caractères : fermentation du mannitol, mobilité de la souche et présence de la nitrate réductase.

- Si le milieu prend une coloration jaune : la bactérie est mannitol +.
- Si le milieu reste rouge : la bactérie est mannitol -.
- Si les bactéries sont mobiles, elles se disperseront à partir de la piqûre d'ensemencement créant un **trouble** dans le milieu, sinon la bactérie est mobilité - (culture autour de la piqure centrale seulement).



3. Utilisation du Citrate (test de Citrate de Simmons).

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Le citrate est hydrolysé en acide pyruvique et le CO₂ qui réagit avec des composants du milieu pour produire un composé alcalin faisant passer l'indicateur de pH (bleu de bromothymol) du vert au bleu.



4. Test d'oxydase

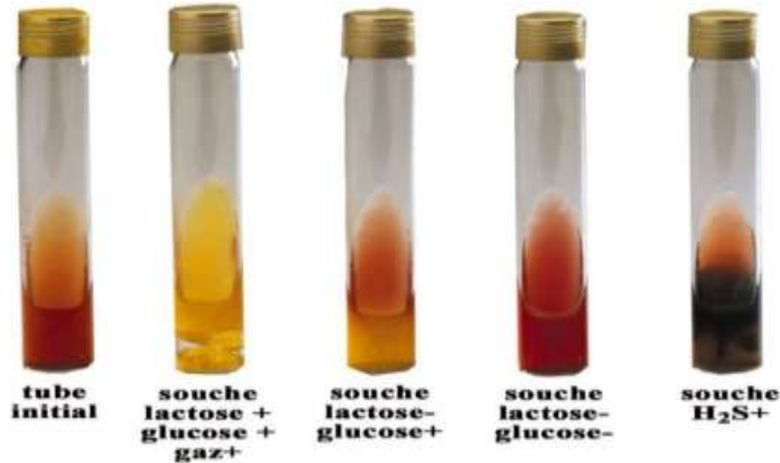
Ce test est utilisé pour identifier les microorganismes contenant l'enzyme cytochrome oxydase (importante dans la chaîne de transport des électrons). Dans le test oxydase, des donneurs et accepteurs d'électrons artificiels sont fournis. Lorsque le donneur d'électrons est oxydé par le cytochrome oxydase, il devient violet foncé. Ceci est considéré comme un résultat positif.



5. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)

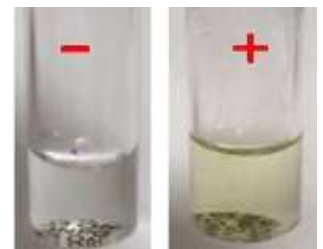
C'est un milieu glucosé, saccharosé lactosé peptoné, contenant du citrate de fer ammoniacal et une source de soufre. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

La souche microbienne utilise en premier temps le glucose, puis le saccharose ou le lactose en 2^{ème} stade, puis les peptones en 3^{ème} stade. Comme elle peut produire de l' H_2S .



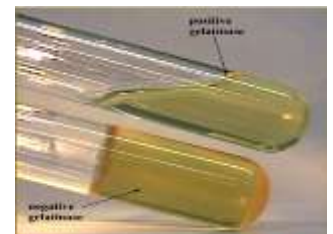
6. Le test ONPG

Il consiste à rechercher la présence de β -galactosidase. On utilise comme substrat : l'ortho-nitro-phényl- galactoside (ONPG) qui présente l'avantage d'être hydrolysé en un produit coloré (l'orthonitrophénol: ONP).



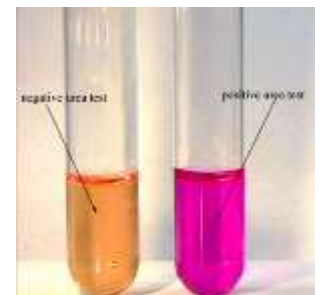
7. Test d'hydrolyse de la gélatine

Le test d'hydrolyse de la gélatine est utilisé pour détecter la capacité d'un organisme à produire de la gélatinase (enzyme protéolytique) liquéfiant de la gélatine. L'hydrolyse de la gélatine indique la présence de gélatinases.



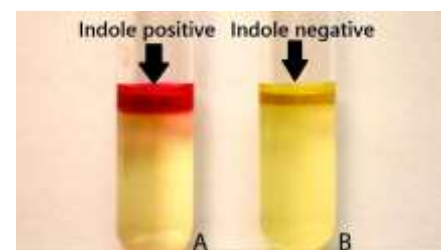
8. Test d'uréase

La recherche de l'uréase s'effectue par culture sur milieu Ferguson (milieu Urée-Indole) qui contient, en plus du tryptophane, de l'urée et indicateur de pH : le rouge de phénol. Il permet la mise en évidence de l'uréase, de la tryptophane désaminase et de la production d'indole (ce milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries).



9. Test à l'indole

Le test de l'indole détermine la capacité des bactéries à produire de l'indole à partir du tryptophane par diverses enzymes. L'indole peut être détecté dans une culture bactérienne en l'ajoutant au réactif de Kovacs sur le test précédent (test uréase).



10. Test des décarboxylases

Trois enzymes décarboxylases sont fréquemment recherchées : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH).

Dans un 1^{er} temps, la bactérie utilise le glucose du milieu qui s'acidifie et fait virer l'indicateur au jaune.

Dans un 2^{ème} temps, la décarboxylation de l'acide aminé alcalinise le milieu et refait virer l'indicateur au bleu violacé, alors que le tube témoin reste jaune.

Après incubation :

- ✓ Si le témoin vire au jaune, continuer la lecture :
 - S'il y a coloration violette, la réaction est positive.
 - Si le milieu reste jaune : la réaction est négative.
- ✓ Si le témoin reste violet : la réaction est à refaire.



B. Galerie biochimique miniaturisée de type API

1. **Définition :** C'est une galerie miniaturisée et standardisée de **tests biochimiques**, exploitable avec des bases de données d'identification complètes dont la plus connue est l'**api 20E** (20 caractères pour les entérobactéries).

La galerie **API 20E** comprend une bande en plastique contenant 20 mini-puits de tests. Chaque puit contient des milieux déshydratés destinés à détecter généralement l'activité enzymatique, principalement liée à la fermentation des glucides ou au catabolisme des protéines et des acides aminés par les organismes inoculés.

2. **Principe :** Une suspension bactérienne est utilisée pour réhydrater chacun des puits. Pendant l'incubation, le métabolisme produit des changements de couleur spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs. Tous les résultats de tests positifs et négatifs sont compilés pour obtenir un numéro de profil, qui est ensuite comparé aux numéros de profil dans un livre de codes commercial (ou en ligne) afin de déterminer l'identification de l'espèce bactérienne.

3. Interprétation des résultats

- Pour certains compartiments, le changement de couleur peut être lu immédiatement après 24 heures, mais pour certains réactifs, il faut y ajouter des réactifs avant toute interprétation.
- Remplissez la fiche de lecture de l'API en marquant chaque test comme positif ou négatif. Les puits sont délimités en triplets par des triangles noirs pour lesquels des scores sont attribués.
- Additionnez les scores pour les puits positifs uniquement dans chaque triplet.
- Trois réactions de test sont additionnées à la fois pour donner un numéro à 7 chiffres, qui peut ensuite être recherché dans le livre de codes.
- Identifier l'organisme en utilisant le catalogue API ou apiweb (en ligne).

Tous les tests sont négatifs



Tous les tests sont positifs

api 20 E

Fiche des résultats de l'API20E

- ❖ Les puits sont délimités en triplets par des triangles noirs.
- ❖ Pour chaque triplet, si le premier test est positif, le puits prendra 1, si le test est négatif il prendra 0.
- ❖ Pour chaque triplet, si le second test est positif, le puits prendra 2, si le test est négatif il prendra 0.
- ❖ For each triplet, if the third test is positive, the well will take 4, if the test is negative it will take 0.
- ❖ Additionnez les scores des puits positifs uniquement dans chaque triplet. Le score le plus élevé possible pour un triplet est 7.

L'oxydase peut également être incluse dans le profil.

Entrez le profil numérique dans l'apiweb pour obtenir l'identité.