

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة سعيدة- د مولاي الطاهر -  
Université de Saida - Dr. MOULAY Tahar



كلية العلوم  
Faculté des Sciences  
قسم البيولوجيا  
Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master En Sciences biologiques

**Spécialité :** Microbiologie Appliquée

## Thème

---

# Analyse bibliographique des tests biochimiques dans la microbiologie appliquée : Applications et avancées récentes

---

Présenté par :

▪ Mr : **BOUIHI Zohir**

Soutenu le : ...../06/2023

Devant le jury composé de :

<b>Président</b>	Mr. Kahloula Khaled	Pr Université De Saida
<b>Examineur</b>	Mr. Bellil Yahia	Pr Université De Saida
<b>Rapporteur</b>	Mr. ZIANI Kaddour	MCA Université De Saida

**Année Universitaire 2022/2023**

---

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة سعيدة - د. مولاي الطاهر -  
Université de Saida - Dr. MOULAY Tahar



كلية العلوم  
Faculté des Sciences  
قسم البيولوجيا  
Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master En Sciences biologiques

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

## Thème

---

# Analyse bibliographique des tests biochimiques dans la microbiologie appliquée : Applications et avancées récentes

---

Présenté par :

▪ Mr : **BOUIHI Zohir**

Soutenu le : ...../06/2023

Devant le jury composé de :

<b>Président</b>	Mr. Kahloula Khaled	Pr Université De Saida
<b>Examineur</b>	Mr. Adli Djallal Eddine Houari	Pr Université De Saida
<b>Rapporteur</b>	Mr. ZIANI Kaddour	MCA Université De Saida

**Année Universitaire 2022/2023**

## **Dédicaces**

Je tiens à dédier ce mémoire de fin d'études à toutes les personnes qui ont joué un rôle essentiel dans sa réalisation et qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours académique.

**À mes parents :**

**À mon père « *Boudjemaa* »** que la miséricorde de Dieu soit sur lui, grâce à vous, je suis devenu un homme et je suis bien conscient de ma responsabilité. Je marche sur votre chemin, si Dieu le veut.

**Et à ma mère « *Hayat* »**, pour son amour inconditionnel, son soutien indéfectible et ses sacrifices inestimables. Votre confiance en moi et votre encouragement constant ont été mes sources de motivation et de détermination. Je vous suis profondément reconnaissant pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi.

**À mes frères « *Maamar* » « *Fethi* » « *Azzedine* » « *Abdelrahmen* »**, pour leur soutien sans faille, leurs encouragements et leurs conseils précieux. Votre présence dans ma vie a été un véritable soutien, et je suis reconnaissant de pouvoir compter sur vous à chaque étape de mon parcours.

**À mes amis proches**, pour leurs encouragements, leurs conseils et leur soutien moral. Votre amitié précieuse m'a apporté du réconfort et m'a aidé à surmonter les obstacles. Je suis reconnaissant d'avoir des amis aussi merveilleux à mes côtés.

**À mes professeurs** et encadrants, pour leur expertise, leurs enseignements et leur accompagnement tout au long de mes études. Vos conseils éclairés et votre passion pour votre domaine m'ont inspiré et m'ont permis de progresser dans ma formation.

**À mes camarades** de promotion microbiologie appliqué, pour les moments de partage, les échanges académiques et les souvenirs précieux que nous avons créés ensemble. Votre camaraderie a rendu cette expérience d'apprentissage encore plus enrichissante.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire, je vous exprime ma gratitude sincère. Votre soutien, vos conseils et votre présence ont été d'une valeur inestimable.

Merci du fond du cœur à chacun d'entre vous.

***BOUIHI ZOHIR***

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, On tient à remercier **Dieu** le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.*

*J'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Notre encadreur **Mr ZIANI Kaddour**, pour sa précieuse aide, ces orientations et le temps qu'il m'a accordé pour mon encadrement.*

*Nous remercions par ailleurs vivement les membres du jury **Président Mr. Kahloula Khaled** et **Examineur Mr. Adli Djallal Eddine Houari** de nous avoir fait l'honneur de juger mon travail et d'assister à la soutenance.*

*Nos grands remerciements à tous les enseignants de promotion de 2<sup>ème</sup> année Master Microbiologie Appliquée*

***Finalemnt**, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire*

---

**Liste des abréviations**

<b>EPI</b>	Équipement de protection individuelle
<b>EMBA</b>	Eosin Methylene Blue Agar
<b>MCA</b>	Mac Conkey Agar
<b>HEA</b>	Hektoen Enteric Agar
<b>SSA</b>	Salmonella et Shigella Agar
<b>RUT</b>	Test rapide à l'uréase
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne
<b>BIS</b>	Brain Infusion Agar Salé
<b>MOI</b>	Motilité-indole-ornithine
<b>LIA</b>	Lysine Iron. Agar
<b>TSI</b>	Triple Sugar Iron.
<b>TSIA</b>	Triple Sugar Iron. Agar
<b>KIA</b>	Kligler Iron. Agar
<b>SIM</b>	Sulfide-Indole-Motility
<b>(MALDI-TOF MS)</b>	Spectrométrie de masse par ionisation/désorption laser assistée par matrice
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DMF</b>	N, N-diméthylformamide
<b>VITEK® 2</b>	Système automatisé d'identification et de susceptibilité aux antimicrobiens
<b>BD Phoenix™</b>	Système automatisé d'identification et de susceptibilité aux antimicrobiens
<b>LAMP</b>	L'amplification isotherme médiée par boucle
<b>RUT</b>	Test rapide à l'uréase
<b>CLO</b>	<i>Campylobacter</i> -like organism test
<b>VP</b>	Voges-Proskauer

---

**Liste des Tableaux**

<b>Tableau 1 :</b> Système de configuration de <i>EnteroPluri-Test</i> .....	10
<b>Tableau 2 :</b> Identification biochimique des bactéries par <i>EnteroPluri-Test</i> .....	12
<b>Tableau 3 :</b> Les valeurs des réactions positives pour obtenir un code à 5 chiffres qui, à l'aide du Manuel des codes.....	13
<b>Tableau 4 :</b> Inoculer <i>EnteroPluri-Test</i> .....	14
<b>Tableau 5:</b> Pourcentage des souches qui donnent des réactions positives après 18-24 h d'incubation à $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .....	15
<b>Tableau 6 :</b> Ingrédients utilisés dans le test de l'urée.....	38
<b>Tableau 7 :</b> Composition de la base du milieu d'essai de la décarboxylase.....	43
<b>Tableau 8 :</b> Test de la décarboxylase .....	45
<b>Tableau 9 :</b> Résultat du test de la décarboxylase.....	47
<b>Tableau 10 :</b> Bactérie d'indole positif et négatif.....	51

Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Procédure d'EnteroPluri-Test (2023 © DocPlayer.fr) .....	11
<b>Figure 2</b> : Résultats du test de catalase (American Society for Microbiology © 2016).....	20
<b>Figure 3</b> : Résultats du test de la catalase en tube (American Society for Microbiology © 2016) .....	21
<b>Figure 4</b> : Résultats du test de la catalase en tube. (En pente) (American Society for Microbiology © 2016) .....	22
<b>Figure 5</b> : Test oxidase (Microbe Notes., 2020). .....	24
<b>Figure 6</b> : Principe du test de réduction des nitrates.....	25
<b>Figure 7</b> : Test oxydo-fermentaire (American Society for Microbiology © 2016) .....	33
<b>Figure 8</b> : Test oxydo-fermentaire inoculé avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (American Society for Microbiology © 2016) .....	34
<b>Figure 9</b> : Test oxydo-fermentaire inoculé avec <i>Alcaligenes</i> (American Society for Microbiology © 2016).....	35
<b>Figure 10</b> : Test rapide à l'uréase (© 2023 MicrobiologyInfo.com).....	37
<b>Figure 11</b> : Test respiratoire à l'urée (© 2023 MicrobiologyInfo.com).....	37
<b>Figure 12</b> : Résultats du test de l'uréase (© 2023 MicrobiologyInfo.com).....	39
<b>Figure 13</b> : La décarboxylation de la lysine et ornithine et arginine (© 2023 Microbiologynote.com).....	42
<b>Figure 14</b> : Test de décarboxylase (© 2023 Microbiologynote.com).....	44
<b>Figure 15</b> : Milieux décarboxylase avec <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Source : www.asm.org).....	45
<b>Figure 16</b> : Milieux décarboxylase avec <i>Klebsiella oxytoca</i> (Source : www.asm.org).....	46
<b>Figure 17</b> : Milieux décarboxylase <i>Enterobacter cloacae</i> (Source : www.asm.org).....	46

<i>Figure 18 : Milieux décarboxylase avec E. coli (Source : <a href="http://www.asm.org">www.asm.org</a>)</i> .....	46
<i>Figure 19 : Principe de test d'indole</i> .....	49
<i>Figure 20 : Test d'indole Positif et Négatif</i> .....	50
<i>Figure 21 : Indole Spot test</i> .....	50
<i>Figure 22 : Résultat de test phénylalanine désaminase</i> .....	54
<i>Figure 23 : Résultats du test de la production de H<sub>2</sub>S</i> .....	57
<i>Figure 24 : Schéma de la méthode PCR</i> .....	59
<i>Figure 25 : Cartes d'identification VITEK®</i> .....	62

## **Résumé**

L'identification biochimique des bactéries est essentielle en microbiologie appliquée car elle permet une meilleure compréhension des maladies infectieuses, contribue à la sécurité alimentaire et facilite le développement de produits biotechnologiques efficaces. Dans cette optique, nous avons abordé cette étude bibliographique pour présenter les différents tests biochimiques classiques et récents utilisés pour identifier les bactéries dans les domaines clinique, alimentaire et biotechnologique. Dans la première partie de cette recherche bibliographique, nous avons donné un aperçu général des tests biochimiques les plus couramment utilisés dans les domaines mentionnés ci-dessus. Dans la deuxième partie, nous avons examiné les méthodes d'identification bactérienne conventionnelles et rapides, telles que les tests Enteropluri, les tests d'oxydo-réduction, les tests d'oxydo-fermentation, les tests d'hydrolyse et les tests de production d'enzymes. Il existe également des tests biochimiques rapides tels que la PCR (Polymerase Chain Reaction), la MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Ionisation/ Desorption Mass Spectrometry) et les systèmes automatisés d'identification et de sensibilité aux antimicrobiens. En conclusion, les tests biochimiques sont essentiels pour l'identification des micro-organismes, et les techniques rapides telles que la PCR et la MALDI-TOF MS offrent plus d'avantages que les techniques conventionnelles qui prennent plus de temps.

**Mots clés :** Analyse Microbiologique, Bactérie, Test biochimique ; Technique rapide

## **Abstract**

The biochemical identification of bacteria is essential in applied microbiology as it allows a better understanding of infectious diseases, contributes to food safety, and facilitates the development of effective biotechnological products. In this respect, we approach this bibliographical study to show the different classical and recent biochemical tests used to identify bacteria in the clinical, food, and biotechnological fields. In the 1st part of this literature search, we gave a general overview of the most commonly used biochemical tests in the fields mentioned above. However, in Part 2, we looked at conventional and rapid bacterial identification methods, such as *Enteropluri* tests, oxidation/reduction tests, oxide-fermentation tests, hydrolysis tests, and enzyme production tests; there are also rapid biochemical tests such as PCR (Polymerase Chain Reaction), MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Ionisation/Desorption Mass Spectrometry) and automated antimicrobial identification and sensitivity systems. In conclusion, biochemical tests are essential for identifying microorganisms, and rapid techniques such as PCR and MALDI-TOF MS offer more advantages than the more time-consuming conventional techniques.

**Keywords:** Microbiological analysis, Bacteria, Biochemical test, Rapid technique

## ملخص

تعتبر الهوية الكيميائية للبكتيريا أمرًا أساسيًا في علم الأحياء الدقيقة التطبيقية حيث تساهم في فهم أفضل للأمراض المعدية وتأمين سلامة الأغذية وتطوير المنتجات البيوتكنولوجية الفعالة. وفي هذا السياق، قمنا بإجراء هذه الدراسة النظرية من أجل تبيان أهمية الاختبارات الكيميائية الكلاسيكية والمستحدثة المستخدمة في تحديد البكتيريا في المجالات السريرية والغذائية والبيوتكنولوجية. في الجزء الأول من هذه الدراسة، قدمنا نظرة عامة على الاختبارات الكيميائية الأكثر استخدامًا في المجالات المذكورة أعلاه. أما في الجزء الثاني، ناقشنا "الأساليب التقليدية والسريعة لتحديد البكتيريا، مثل اختبارات Enteropluri، اختبارات الأكسدة والاختزال، اختبارات الأكسدة والتخمير، اختبارات التمييز واختبارات إنتاج الإنزيمات. تطرقنا أيضًا لاختبارات كيميائية سريعة مثل (تفاعل البوليميراز المتسلسل) وتقنية طيف كتلي بالليزر المعزز بالمصاحبة/الطرد وأنظمة التحديد والحساسية الآلية للمضادات الحيوية. في الختام، تعد الاختبارات الكيميائية أمرًا أساسيًا لتحديد الكائنات الدقيقة، وتقدم التقنيات السريعة مثل تفاعل البوليميراز المتسلسل وتقنية طيف كتلي بالليزر المعزز بالمصاحبة/الطرد مزايا أكثر من التقنيات التقليدية التي تستغرق وقتًا أطول.

الكلمات الرئيسية: تحليل ميكروبيولوجي، بكتيريا، اختبار كيميائي، تقنية سريعة

**Table des Matières**

<b>DEDICACES.....</b>	<b>III</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>ملخص .....</b>	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>VIII</b>
<b>PARTIE I. INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
I.1. Introduction Générale.....	1
I.2. Conception de l'étude .....	2
<b>PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
<b>CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LES TESTS BIOCHIMIQUES EN MICROBIOLOGIE GENERALE .....</b>	<b>5</b>
II.1. Importance des tests biochimiques en microbiologie .....	5
II.1.1. Identification précise des microorganismes.....	6
II.1.2. Caractérisation des propriétés physiologiques et métaboliques des microorganismes.....	6
II.1.3. Détection des mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	6
II.1.4. Détection de contaminants microbiens dans l'environnement.....	6
II.1.5. Étude de la diversité microbienne.....	6

II.2. Importance de l'identification des micro-organismes .....	7
II.2.1. Diagnostic des maladies infectieuses .....	7
II.2.2. Surveillance de la qualité des produits alimentaires .....	7
II.2.3. Surveillance de la qualité de l'eau .....	7
II.2.4. Surveillance de la qualité de l'air .....	7
<b>CHAPITRE 2 : APPLICATION DES TESTS BIOCHIMIQUES EN MICROBIOLOGIE .....</b>	<b>8</b>
II.1. Principes fondamentaux des tests biochimiques .....	8
II.2. Classification des tests biochimique .....	9
II.2.1. En fonction de leur type .....	9
II.2.2. Tests biochimiques rapides .....	58
<b>PARTIE III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>66</b>
III.1. Conclusion .....	67
<b>PARTIE IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>68</b>

# Partie I. INTRODUCTION GENERALE

## I.1. Introduction Générale

L'étude des microorganismes, tels que les bactéries, les virus, les champignons et les parasites, est connue sous le nom de microbiologie. Ces microorganismes sont tous autour de nous dans l'environnement, et certains d'entre eux peuvent infecter les personnes, les animaux et les plantes avec des maladies. L'identification et la caractérisation sont cruciales pour améliorer notre compréhension de ces microorganismes et de la façon dont ils affectent la santé humaine, l'agriculture et l'environnement.

Les méthodes traditionnelles d'identification microbiologique ont cédé la place à des techniques plus rapides et plus précises au fil du temps. Les tests biochimiques utilisés dans les méthodes traditionnelles peuvent révéler des détails sur la génétique, la physiologie et le métabolisme des microorganismes. Ces tests biochimiques conventionnels comprennent, entre autres, des tests d'oxydation/réduction, d'oxydation-fermentation, d'hydrolyse, de décarboxylation, de désamination et de production d'enzymes (**Prescott *et al.*, 2008**). Ces techniques peuvent cependant prendre du temps et être laborieuses.

Les avancées technologiques ont conduit au développement de nouvelles méthodes plus rapides et plus précises pour l'identification des microorganismes, notamment la PCR, MALDI-TOF MS, VITEK® 2, BD Phoenix TM, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme en boucle et les (**Opota *et al.*, 2015 ; Singhal *et al.*, 2015 ; Buchan *et al.*, 2016 ; Campana *et al.*, 2019**). Ces techniques reposent sur diverses théories, notamment la détection d'ADN, de protéines ou de métabolites particuliers produits par des microorganismes.

Ces méthodes rapides sont de loin supérieures aux méthodes conventionnelles en termes de rapidité, de sensibilité, de spécificité et de coût (**Opota *et al.*, 2015**) Ils permettent également une identification plus rapide et plus précise des microorganismes, ce qui est crucial pour le traitement des maladies infectieuses et le contrôle des épidémies.

Cependant, ces techniques elles présentent aussi quelques inconvénients, notamment en termes de coût initial d'achat et de formation, de complexité et de besoin d'expertise pour interpréter les résultats (**Campana *et al.*, 2019**). Les méthodes rapides peuvent également être insensibles à certains types de microorganismes et produire des faux positifs ou négatifs (**Opota *et al.*, 2015**).

Dans ce contexte, cette étude vise à fournir une méta-analyse approfondie des différentes méthodes conventionnelles et rapides d'identification des microorganismes, en donnant un aperçu des concepts fondamentaux des tests biochimiques conventionnels ainsi que des avantages et des inconvénients des nouvelles techniques. Les résultats des différentes méthodes

sont analysés de manière critique dans cette étude, avec une discussion sur leur applicabilité dans la pratique clinique.

## **I.2. Conception de l'étude**

### *a. Formulation de la question de recherche*

Cette étude bibliographique vise à examiner les applications et les avancées récentes des tests biochimiques dans le domaine de la microbiologie appliquée : quelles sont les méthodes couramment utilisées en microbiologie ? Quelles sont les limites de l'utilisation de ces tests ?

### *b. Recherche de la littérature*

Pour optimiser notre recherche systématique dans la littérature, nous appuyons sur souvent des bases de données bibliographiques spécialisées telles que PubMed, Science Direct, Web of Science et Google Scholar pour trouver des articles scientifiques pertinents, en utilisant des mots-clés spécifiques tels que "tests biochimiques", "microbiologie appliquée", "identification bactérienne", etc. De plus, plusieurs informations ont été recueillies à partir des Communication avec des experts et des conférences et des congrès. Généralement, une combinaison de ces méthodes bibliographiques nous permettrons d'obtenir une vue d'ensemble sur les études antérieures dans le domaine de la microbiologie appliquée.

### *c. Sélection des études & Extraction des données*

La première ligne de sélection des articles collectés est basée sur le « titre » et « l'abstract », une fois, la sélection des articles pertinents effectuée, une lecture attentive de chaque document a été faite pour obtenir une compréhension approfondie des méthodes de tests biochimiques utilisées dans la microbiologie appliquée, afin de noter les informations clés, les résultats et les conclusions importantes.

### *d. Limites de l'étude et perspectives pour de futures recherches*

Comme pour toute étude, cette étude systématique présentée ici comporte certaines limites qui doivent être prises en compte lors de l'interprétation des résultats. Dans cette section, nous discuterons des limites de l'étude et des perspectives pour de futures recherches.

Tout d'abord, il convient de noter que la qualité des articles inclus dans l'étude systématique variait considérablement. Certaines études étaient de bonne qualité, tandis que d'autres présentaient des risques de biais. Cela peut avoir affecté la validité des résultats de la méta-analyse (*Higgins., et al. 2011*).

De plus, l'étude systématique était basée sur des études publiées dans des revues scientifiques, ce qui signifie qu'il est possible que des études non publiées aient été manquées. Cela peut avoir introduit un biais de publication dans les résultats des informations collectés, où les études présentant des résultats positifs ont plus de chances d'être publiées que les études présentant des résultats négatifs (*Egger., et al. 1997*).

Enfin, l'étude systématique a été limitée à des études menées dans la plupart des cas dans des pays développés, ce qui signifie que les résultats peuvent ne pas être généralisables à des populations de pays en développement (**Chow., et al 2009**).

## Partie II. **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre 1 : Généralités sur les tests biochimiques en microbiologie générale

La microbiologie est un domaine de la biologie qui étudie les micro-organismes, tels que les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ces microorganismes sont des organismes unicellulaires qui peuvent être trouvés dans différents environnements, y compris le sol, l'eau, les aliments, les animaux et les humains (**Tortora., et al 2019**) Certains de ces microorganismes sont bénéfiques pour l'homme, tels que ceux utilisés dans la production d'aliments fermentés et de médicaments, tandis que d'autres peuvent causer des maladies graves, telles que la tuberculose, la pneumonie, la méningite et la septicémie (**Brooks., et al 2019**).

Dans la microbiologie, les tests biochimiques sont des méthodes courantes pour identifier les microorganismes et caractériser leurs propriétés physiologiques et métaboliques. Ces tests sont basés sur l'observation de la réaction des microorganismes à différents substrats et réactifs, tels que les sucres, les acides aminés, les enzymes et les indicateurs colorimétriques (**Forbes., et al 2014**). Ils sont souvent utilisés en conjonction avec d'autres méthodes d'identification, telles que la morphologie, la coloration de Gram, la croissance sur différents milieux de culture et les tests sérologiques (**Koneman., et al 2006**).

L'identification précise des microorganismes est cruciale pour des raisons cliniques, épidémiologiques et environnementales. En clinique, l'identification précise des microorganismes est essentielle pour le diagnostic et le traitement des infections bactériennes, fongiques et virales (**Patel., et al 2020**). Les tests biochimiques peuvent également aider à détecter les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les microorganismes pathogènes (**Doern., et al 2011**). En épidémiologie, l'identification précise des microorganismes peut aider à surveiller la propagation des maladies infectieuses et à contrôler les épidémies (**Anderson., et al 2020**). En environnement, l'identification précise des microorganismes peut aider à détecter les polluants microbiens dans l'eau, le sol et l'air (**Miettinen., et al 2007**).

Les tests biochimiques sont également utilisés pour étudier la diversité microbienne, la physiologie et le métabolisme des microorganismes dans différents environnements. Les tests biochimiques peuvent être utilisés pour déterminer les voies métaboliques utilisées par les micro-organismes, leur capacité à utiliser différents substrats et leur sensibilité aux différents stress environnementaux (**Vartoukian., et al 2010**).

### II.1. Importance des tests biochimiques en microbiologie

Les tests biochimiques sont des outils précieux pour l'identification et la caractérisation des microorganismes en microbiologie. Ils sont largement utilisés dans de nombreux domaines, tels que la médecine, l'agriculture, l'environnement et l'industrie. Voici quelques-unes des raisons pour lesquelles les tests biochimiques sont si importants en microbiologie.

### **II.1.1. Identification précise des microorganismes**

L'identification précise des microorganismes est cruciale en microbiologie, en particulier en médecine clinique. Les tests biochimiques permettent de distinguer les différentes espèces de microorganismes et de déterminer leur sensibilité ou leur résistance aux antibiotiques. Cela est important pour le diagnostic et le traitement efficace des maladies infectieuses (**Giraldo, et al 2019**). En outre, l'identification précise des microorganismes est essentielle pour surveiller les épidémies et les éclosions de maladies infectieuses et pour mettre en place des mesures de contrôle (**Møller, et al 2013**).

### **II.1.2. Caractérisation des propriétés physiologiques et métaboliques des microorganismes**

Les tests biochimiques permettent également de caractériser les propriétés physiologiques et métaboliques des micro-organismes. Ils peuvent fournir des informations sur les voies métaboliques utilisées par les micro-organismes, leur capacité à utiliser différents substrats et leur sensibilité à différents stress environnementaux. Cela est important pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes microbiens et pour optimiser les processus biotechnologiques tels que la d'aliments fermentés, de médicaments et de biocarburants (**Batista-García, et al 2015**).

### **II.1.3. Détection des mécanismes de résistance aux antibiotiques**

Les tests biochimiques peuvent également aider à détecter les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les microorganismes pathogènes. Cela est important pour la sélection d'un traitement efficace contre les infections bactériennes et pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques (**Kahlmeter, et al 2014**).

### **II.1.4. Détection de contaminants microbiens dans l'environnement**

Les tests biochimiques sont également utilisés pour détecter les contaminants microbiens dans l'environnement. Ils peuvent être utilisés pour surveiller la qualité de l'eau, de l'air et des sols et pour détecter les pathogènes qui peuvent être présents dans ces milieux. Cela est important pour prévenir les maladies infectieuses et pour protéger la santé publique (**Haramoto, et al 2016**).

### **II.1.5. Étude de la diversité microbienne**

Les tests biochimiques sont également utilisés pour étudier la diversité microbienne dans différents environnements. Ils peuvent fournir des informations sur les différentes espèces de microorganismes présentes dans un environnement donné, leur rôle dans les écosystèmes et leur potentiel pour les applications biotechnologiques (**Dunbar, et al 2000**).

## **II.2. Importance de l'identification des micro-organismes**

L'identification des microorganismes est une étape cruciale en microbiologie, car elle permet de déterminer la nature exacte de l'organisme étudié et d'obtenir des informations sur sa biologie, son rôle dans les écosystèmes et son potentiel pour les applications biotechnologiques. Voici quelques-unes des raisons pour lesquelles l'identification des microorganismes est si importante.

### **II.2.1. Diagnostic des maladies infectieuses**

L'identification précise des microorganismes est essentielle pour le diagnostic et le traitement des maladies infectieuses chez l'homme, les animaux et les plantes. Les microorganismes pathogènes peuvent causer des maladies graves et souvent mortelles, et leur identification rapide et précise est nécessaire pour sélectionner le traitement le plus approprié (Sandhu., *et al* 2017). Des tests de diagnostic précis permettent également d'identifier les microorganismes qui causent des maladies émergentes et de suivre la propagation de ces agents pathogènes dans les populations humaines et animales (Zhang., *et al* 2020).

### **II.2.2. Surveillance de la qualité des produits alimentaires**

L'identification des microorganismes est également importante dans l'industrie alimentaire pour garantir la sécurité et la qualité des produits alimentaires. Les microorganismes peuvent causer la dégradation des aliments, la formation de toxines et la contamination bactérienne des aliments, ce qui peut entraîner des maladies alimentaires. L'identification précise des microorganismes peut aider à prévenir ces problèmes et à garantir la qualité des aliments (Rantsiou., *et al* 2019).

### **II.2.3. Surveillance de la qualité de l'eau**

L'identification des microorganismes est également importante pour surveiller la qualité de l'eau, car certains microorganismes peuvent causer des maladies d'origine hydrique. Des tests microbiologiques peuvent être utilisés pour détecter les pathogènes dans l'eau, ainsi que pour surveiller la qualité de l'eau potable et des eaux de baignade (Havelaar., *et al* 2015).

### **II.2.4. Surveillance de la qualité de l'air**

L'identification des microorganismes est également importante pour surveiller la qualité de l'air intérieur et extérieur. Certains microorganismes peuvent causer des allergies, des infections respiratoires et des maladies professionnelles. L'identification des microorganismes peut aider à prévenir ces problèmes en surveillant la qualité de l'air dans les lieux de travail et les espaces publics (Li DW., *et al* 1995).

## Chapitre 2 : Application des tests biochimiques en microbiologie

Les tests biochimiques sont des méthodes courantes et importantes pour identifier les microorganismes en microbiologie. Les tests biochimiques ont pour objectif d'identifier des micro-organismes, tels que les bactéries, les champignons et les levures, en fonction de leurs caractéristiques biochimiques. Ces tests peuvent être utilisés pour déterminer si un micro-organisme est pathogène ou non pathogène, pour aider à diagnostiquer une infection, pour surveiller l'efficacité d'un traitement antibiotique, et pour la recherche microbiologique en général (**Holt., et al 1994**).

L'un des principaux avantages des tests biochimiques est qu'ils sont relativement simples, peu coûteux et faciles à interpréter (**Cowan., et al 1993**). En effet, la plupart des tests peuvent être réalisés en utilisant des équipements de laboratoire standard et sont donc accessibles à la plupart des laboratoires. De plus, les tests biochimiques sont très sensibles et spécifiques, permettant une identification précise et fiable des microorganismes (**Winn., et al 2006**). Par conséquent, les tests biochimiques sont largement utilisés en microbiologie clinique pour diagnostiquer les infections bactériennes, fongiques et virales.

En outre, les tests biochimiques sont très utiles pour la recherche microbiologique en général, car ils permettent d'identifier des microorganismes inconnus et de caractériser leur physiologie et leur métabolisme (**Cowan., et al 1993**). Les tests biochimiques peuvent également être utilisés pour étudier les interactions entre les microorganismes et leur environnement, pour évaluer l'impact des traitements microbiens sur la qualité de l'eau et pour d'autres applications en microbiologie environnementale.

Enfin, les tests biochimiques sont également utilisés dans la production industrielle d'aliments, de boissons et de produits pharmaceutiques pour surveiller la qualité et la pureté des produits finis (**Winn., et al 2006**). Les tests biochimiques peuvent être utilisés pour détecter les contaminants microbiens dans les matières premières et les produits finis, pour suivre la croissance des microorganismes lors de la fermentation, pour surveiller l'efficacité des traitements microbiens et pour d'autres applications dans l'industrie.

### II.1. Principes fondamentaux des tests biochimiques

Les tests biochimiques sont une méthode courante et importante pour identifier les microorganismes en microbiologie. Ces tests sont basés sur les caractéristiques biochimiques des micro-organismes, telles que leur capacité à métaboliser des substrats spécifiques, leur production d'enzymes, ou leur profil d'utilisation de certaines molécules (**Koneman., et al 2006**). L'objectif des tests biochimiques est d'identifier les microorganismes en fonction de ces caractéristiques biochimiques.

Les tests biochimiques peuvent être utilisés pour déterminer si un micro-organisme est pathogène ou non pathogène, pour aider à diagnostiquer une infection, pour surveiller l'efficacité d'un traitement antibiotique, et pour la recherche microbiologique en général (**Holt, et al 1994**).

Les principes fondamentaux des tests biochimiques reposent sur l'utilisation de réactifs spécifiques qui réagissent avec les caractéristiques biochimiques des micro-organismes. Les réactifs peuvent être des substrats métaboliques, des indicateurs de pH, ou des réactifs colorimétriques, par exemple (**Winn, et al 2006**). Les résultats des tests biochimiques peuvent être interprétés en fonction de la production d'un produit métabolique, d'un changement de couleur, ou d'un changement de pH, par exemple.

Les tests biochimiques sont très sensibles et spécifiques, permettant une identification précise et fiable des microorganismes (**Winn, et al 2006**). De plus, la plupart des tests sont relativement simples, peu coûteux et faciles à interpréter (**Cowan, et al 1993**). Les tests biochimiques sont largement utilisés en microbiologie clinique pour diagnostiquer les infections bactériennes, fongiques et virales.

## II.2. Classification des tests biochimique

### II.2.1. En fonction de leur type

#### II.2.1.1. Tests *Enteropluri* (Murray, et al 1999)

*Enteropluri*-Test est un système à 12 secteurs contenant des milieux de culture spéciaux qui permettent l'identification des *Enterobacteriaceae* et d'autres bactéries à Gram négatif, oxydases négatives. Le système permet l'inoculation simultanée de tous les milieux présents dans les secteurs et l'exécution de 15 réactions biochimiques. Le micro-organisme est identifié en évaluant le virage de couleur des différents milieux de culture après 18-24 heures d'incubation à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  et au moyen du codage numérique obtenu à partir de l'interprétation des réactions biochimiques. Chaque emballage contient 10 ou 25 *Enteropluri*-Test, Kovac's Reagent, *Enteropluri*-Test Manuel des codes, Oxidase test sticks / swabs / discs, VP test EP (**Tableau 1**).

#### a. Principe de la méthode

*Enteropluri*-Test permet d'effectuer l'identification des *Enterobacteriaceae* et d'autres bactéries à Gram négatif, oxydases négatives isolées à partir d'échantillons cliniques et environnementaux. L'identification se base sur des tests biochimiques effectués sur des milieux de culture contenant des substrats spécifiques. La combinaison des réactions positives et négatives permet de former un code numérique qui permet à son tour d'identifier, à l'aide du Manuel des codes, les bactéries à étudier.

Tableau 1 : Système de configuration de *Enteropluri-Test*

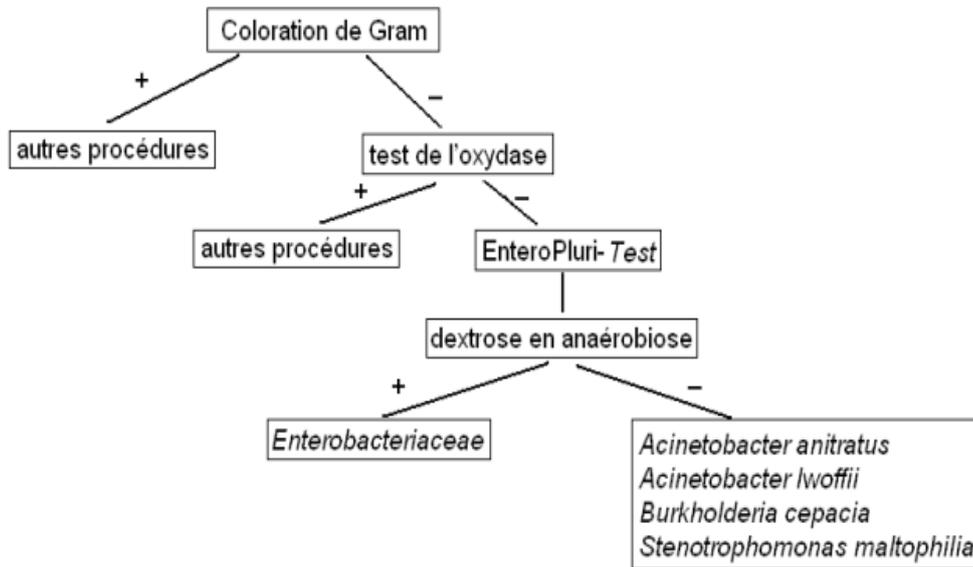
Secteurs	Réaction biochimique
<i>Glucose / Gaz</i>	Fermentation du glucose et production de gaz en anaérobiose
<i>Lysine</i>	Décarboxylation de la lysine en anaérobiose
<i>Ornithine</i>	Décarboxylation de l'ornithine en anaérobiose
<i>H<sub>2</sub>S / Indole</i>	Production d'hydrogène sulfuré et production d'indole
<i>Adonitol</i>	Fermentation de l'adonitol
<i>Lactose</i>	Fermentation du lactose
<i>Arabinose</i>	Fermentation de l'arabinose
<i>Sorbitol</i>	Fermentation du sorbitol
<i>VP</i>	Production d'acétoïne (Voges-Proskauer)
<i>Dulcitol / PA</i>	Fermentation du dulcitol et désamination de la phénylalanine
<i>Urée</i>	Hydrolyse de l'urée
<i>Citrate</i>	Utilisation du citrate

#### b. Prélèvement des échantillons

*Enteropluri-Test* est utilisé pour l'identification de bactéries à Gram négatif, oxydases négatives isolées sur des milieux de culture gélosés sélectifs pour l'isolement des *Enterobacteriaceae* comme : Mac Conkey Agar (MCA), Eosin Methylene Blue Agar (EMBA), Salmonella et Shigella Agar (SSA), Hektoen Enteric Agar (HEA) ou sur milieux non sélectifs.

#### c. Procédure du test

Le micro-organisme à identifier doit avoir été isolé récemment (18-24 heures) ; les bactéries provenant de milieux ayant plus de 48 heures peuvent donner lieu à des résultats non fiables. Avant de procéder à l'ensemencement du micro-organisme à étudier, il est nécessaire d'effectuer la coloration de Gram et le test de l'oxydase sur ce dernier. Seules les bactéries à Gram négatif, les oxydases négatives peuvent être ensemencées sur l'*Enteropluri-Test*. Pour l'exécution correcte des deux tests.



**Figure 1 :** Procédure d'Enteropluri-Test (2023 © DocPlayer.fr)

- Sortir un système *Enteropluri-Test* de l'emballage et y noter : nom d'identification de l'échantillon Bactérien à identifier, date d'exécution et autres informations utiles.
- Dévisser les deux capuchons du système. À l'aide de la pointe du fil d'inoculation, située sous le Capuchon bleu et sans flamber, prélever une colonie bien isolée d'un milieu gélosé sélectif ou non Sélectif, en veillant à ne pas pénétrer dans la gélose.
- Inoculer *Enteropluri-Test* en tournant le fil et en l'extrayant à travers tous les secteurs du système.
- Réintroduire le fil avec un mouvement rotatoire jusqu'à l'entaille de rupture ; casser le fil d'inoculation En le pliant au niveau de l'entaille. La partie du fil qui reste à l'intérieur du système maintient le milieu Anaérobie nécessaire pour les réactions des secteurs Glucose/Gaz, Lysine et Ornithine.
- Utiliser la partie du fil cassée qui est restée dans la main de l'opérateur pour percer la pellicule de, Plastique au niveau des trous des secteurs Adonitol, Lactose, Arabinose, Sorbitol, VP, Dulcitol/PA, Urée, Citrate afin de maintenir un milieu aérobie.
- Revisser les deux capuchons et incuber *Enteropluri-Test* à  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 18-24 heures en le Plaçant sur sa surface plate ou verticalement dans un porte-éprouvettes avec le secteur Glucose/Gaz tourné vers le haut.

#### d. Interprétation des résultats

À la fin de l'incubation :

- Observer le virage de couleur des milieux des différents secteurs et interpréter les résultats à l'aide du tableau n° 2 et éventuellement d'un *Enteropluri-Test* non ensemencé et porté à température ambiante.

NB : Si le secteur Glucose/Gaz ne présente aucun changement de couleur, alors que dans certains des autres secteurs on remarque une variation de couleur, le micro-organisme à étudier n'appartient pas à la famille des *Enterobacteriaceae*. Le Manuel des codes comprend aussi de nombreux codes de microorganismes qui ne fermentent pas le glucose en anaérobiose ; toutefois dans certains cas, certaines réactions biochimiques supplémentaires peuvent être nécessaires pour une identification correcte de ces non-fermentant.

- Noter les résultats obtenus sur le formulaire de collecte des données, excepté le test de l'indole (secteur H<sub>2</sub>S/Indole) et le test de Voges-Proskauer (secteur VP). Exécuter ensuite les tests de l'indole et de Voges-Proskauer.

### Test d'indole

Placer *Enteropluri-Test* avec la surface plate tournée vers le haut et injecter à l'aide d'une seringue, en perçant la pellicule de plastique, 3 ou 4 gouttes de « Kovac's Reagent » dans le secteur H<sub>2</sub>S/Indole. La réaction positive est donnée par l'apparition dans les 10-15 secondes d'une coloration rose-rouge du réactif.

### Test de Voges- Proskauer

Placer *Enteropluri-Test* avec la surface plate tournée vers le haut et injecter à l'aide d'une seringue, en perçant la pellicule de plastique, 3 gouttes de solution d'alpha-naphtol (Réactif 1) et 2 gouttes d'hydroxyde de potassium (Réactif 2). La réaction positive est donnée par l'apparition d'une coloration rouge dans les 20 minutes.

- Former le code numérique de 5 chiffres en suivant les instructions figurant au paragraphe

#### e. Formation du code numérique

Remonter à l'identification bactérienne à l'aide du Manuel des codes.

**Tableau 2 :** Identification biochimique des bactéries par *Enteropluri-Test*

Secteur	Réactions Biochimiques	Couleur des secteurs	
		Réaction positive	Réaction négative
<b>Glucose / Gaz</b>	Fermentation du glucose	Jaune	Rouge
	Production de gaz	Cire détachée	Cire adhérente
<b>Lysine</b>	Décarboxylation de la lysine	Violet	Jaune
<b>Ornithine</b>	Décarboxylation de l'ornithine	Violet	Jaune
<b>H<sub>2</sub>S / Indole</b>	Production d'hydrogène sulfuré	Noir-marron	Beige
	Production d'indole	Rose-rouge	Incolore
<b>Adonitol</b>	Fermentation de l'adonitol	Jaune	Rouge
<b>Lactose</b>	Fermentation du lactose	Jaune	Rouge
<b>Arabinose</b>	Fermentation de l'arabinose	Jaune	Rouge
<b>Sorbitol</b>	Fermentation du sorbitol	Jaune	Rouge
<b>VP</b>	Production d'acétoïne	Rouge	Incolore
<b>Dulcitol / PA</b>	Fermentation du dulcitol	Jaune	Vert
	Désamination de la phénylalanine	Marron foncé	Vert
<b>Urée</b>	Hydrolyse de l'urée	Pourpre	Beige
<b>Citrate</b>	Utilisation du citrate	Bleu	Vert

1) Les 15 tests biochimiques sont divisés en 5 groupes contenant 3 tests et chaque test est indiqué avec une valeur de positivité de 4, 2, 1.

- *Valeur 4* : Premier test positif de chaque groupe (Glucose, Ornithine, Adonitol, Sorbitol, PA)
- *Valeur 2* : Deuxième test positif de chaque groupe (Gaz, H<sub>2</sub>S, Lactose, VP, Urée)
- *Valeur 1* : Troisième test positif de chaque groupe (Lysine, Indole, Arabinose, Dulcitol, Citrate)
- *Valeur 0* : Chaque test négatif

2) Additionner dans chaque groupe les valeurs des réactions positives pour obtenir un code à 5 chiffres qui, à l'aide du Manuel des codes, permet d'identifier le micro-organisme étudié, selon l'exemple ci-dessous.

**Tableau 3** : Les valeurs des réactions positives pour obtenir un code à 5 chiffres qui, à l'aide du Manuel des codes

Test	Groupe 1			Groupe 2			Groupe 3			Groupe 4			Groupe 5		
	Glucose	Gaz	Lysine	Ornithin	H <sub>2</sub> S	Indole	Adonitol	Lactose	Arabinos	Sorbitol	Vp	Dulcitol	Pa	Urée	Citrate
Code de	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Positivité															
Résultats	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Code	4+2+0=6			4+2+0=6			0+0+0=0			0+2+0=2			4+2+0=6		
CODE : 66026 IDENTIFICATION : <i>Proteus mirabilis</i>															

*f. Contrôle qualité pour l'utilisateur*

Inoculer *Enteropluri-Test* en utilisant les souches bactériennes de référence, indiquées dans le (**Tableau 4**). Pour l'inoculation, l'incubation et la lecture, suivre les instructions indiquées au paragraphe précédent.

Tableau 4 : résultats de *EnteroPluri-Test*

Micro Organismes	Glucose	Gaz	Lysine	Omitinine	H <sub>2</sub> S	Indole	Adonitol	Lactose	Arabinose	Sorbitol	Vp	Dulcitol	Pa	Urée	Citrate	Biocodes Acceptables
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	75340
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	66007
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> ATCC 13883	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	±	+	-	±	+	70773- 70771 70753- 70751
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	52140
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	+	+	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	±	*

\* Le *Pseudomonas aeruginosa* est oxydase positive, il n'est donc pas inclus dans le Manuel des codes de l'EnteroPluri-Test.

Tableau 5: Pourcentage des souches qui donnent des réactions positives après 18-24 h d'incubation à 36 ± 1°C

			Glucose	Gaz	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Indole	Adonitol	Lactose	Arabinose	Sorbitol	Voges-proskauer	Dulcitol	Phénylalanine	Urée	Citrate	
	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>	+ 100.0	+J 92.0	d 80.6	d 57.8	-K 4.0	+ 96.3	- 5.2	+J 91.6	+ 91.3	+/- 80.3	- 0.0	d 49.3	- 0.1	- 0.1	- 0.2	
		<i>Shigella</i>	+ 100.0	-A 2.1	- 0.0	-/+B 20.0	- 0.0	-/+ 37.8	- 0.0	- 0.3	-B 0.3	+/- 67.8	-/+ 29.1	- 0.0	d 5.4	- 0.0	- 0.0	- 0.0
	<i>Edwardsiellae</i>	<i>Edwardsiella</i>	+ 100.0	+ 99.4	+ 100.0	+ 99.0	+ 99.6	+ 99.0	- 0.0	- 0.0	+/- 10.7	- 0.2	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	
<i>Salmonelleae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Arizona</i>	+ 100.0	+ 99.7	+ 99.4	+ 100.0	+ 98.7	- 2.0	- 0.0	D 69.8	+ 99.1	+ 97.1	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	+ 96.8
		<i>Freundii</i>	+ 100.0	+ 91.4	- 0.0	d 17.2	+/- 81.6	- 6.7	- 0.0	- 0.0	d 39.3	+ 100.0	+ 98.2	- 0.0	d 59.8	- 0.0	dw 89.4	+ 90.4
		<i>Amalonicus</i>	+ 100.0 + 97.0		- 0.0	+ 97.0	- 0.0	+ 99.0	- 0.0	+/- 70.0	+ 99.0	+ 97.0	- 0.0	-/+ 11.0	- 0.0	+/- 81.0	+ 94.0	
		<i>Diversus</i>	+ 100.0	+ 97.3	- 0.0	+ 99.8	- 0.0	+ 100.0	+ 100.0	d 40.3	+ 98.0	+ 98.2	- 0.0	+/- 52.2	- 0.0	dw 85.8	+ 99.7	
<i>Proteae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Vulgaris</i>	+ 100.0	+/-G 86.0	- 0.0	- 0.0	+ 95.0	+ 91.4	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	+ 100.0	+ 95.0	d 10.5	
		<i>Mirabilis</i>	+ 100.0	+G 96.0	- 0.0	+ 99.0	+ 94.5	- 3.2	- 0.0	- 2.0	- 0.0	- 0.0	-/+ 16.0	- 0.0	+ 99.6	+/- 89.3	+/- 58.7	
	<i>Morganella</i>	<i>Morganii</i>	+ 100.0	+/-G 86.0	- 0.0	+ 97.0	- 0.0	+ 99.5	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	+ 95.0	+ 97.1	- 0.0	
	<i>Providencia</i>	<i>Alcalifaciens</i>	+ 100.0	DG 85.2	- 0.0	- 1.2	- 0.0	+ 99.4	+ 94.3	- 0.3	- 0.7	- 0.6	- 0.0	- 0.0	+ 97.4	- 0.0	+ 97.9	
		<i>Stuartii</i>	+ 100.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	+ 98.6	+/- 12.4	- 3.6	- 4.0	- 3.4	- 0.0	- 0.0	+ 94.5	+/- 20.0	+ 93.7	
		<i>Rettgeri</i>	+ 100.0	+/-G 12.2	- 0.0	- 0.0	- 0.0	+ 95.9	+ 99.0	d 10.0	- 0.0	- 1.0	- 0.0	- 0.0	+ 98.0	+ 100.0	+ 96.0	
<i>Klebsielleae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Cloacae</i>	+ 100.0	+ 99.3	- 0.0	+ 93.7	- 0.0	- 0.0	-/+ 28.0	+/- 94.0	+ 99.4	+ 100.0	+ 100.0	d 15.2	- 0.0	+/- 74.6	+ 98.9	
		<i>Sakazakii</i>	+ 100.0	+ 97.0	- 0.0	+ 97.0	- 0.0	-/+ 16.0	- 0.0	+ 100.0	+ 100.0	- 0.0	+ 97.0	- 6.0	- 0.0	- 0.0	+ 94.0	
		<i>Gergoviae</i>	+ 100.0	+ 93.0	+/- 64.0	+ 100.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	-/+ 42.0	+ 100.0	- 0.0	+ 100.0	- 0.0	- 0.0	+ 100.0	+ 96.0	

Partie II. Synthèse bibliographique

	<i>Pantoea</i>	<i>Aerogenes</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
		<i>Agglomerans</i>	+	-/+	-	-	-	-/+	-	d	+	d	+/-	d	-/+	d	d
	<i>Hafnia</i>		+	+	+	+	-	-	-	d	+	-	+/-	-	-	-	-
		<i>Alvei</i>	100.0	98.9	99.6	98.6	0.0	0.0	0.0	2.8	99.3	0.0	65.0	2.4	0.0	3.0	5.6
	<i>Serratia</i>	<i>Marcescens</i>	+	+/-G	+	+	-	-w	-/+	-	-	+	+	-	-	dw	+
		<i>Liquefaciens</i>	+	D	+/-	+	-	-w	-	d	+	+	+/-	-	-	dw	+
		<i>Rubidaea</i>	+	DG	+/-	-	-	-w	+/-	+	+	-	+	-	-	dw	+/-
	<i>Klebsiella</i>	<i>Pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-/+	-	+	+
			100.0	96.0	97.2	0.0	0.0	0.0	89.0	98.7	99.9	99.4	93.7	33.0	0.0	95.4	96.8
		<i>Oxytoca</i>	+	+	+	-	-	+	+/-	+	+	+	+	-/+	-	+	+
			100.0	96.0	97.2	0.0	0.0	100.0	89.0	98.7	100.0	98.0	93.7	33.0	0.0	95.4	96.8
		<i>Ozaenae</i>	+	d	-/+	-	-	-	+	d	+	+/-	-	-	-	d	d
		100.0	55.0	35.8	1.0	0.0	0.0	91.8	26.2	100.0	78.0	0.0	0.0	0.0	14.8	28.1	
<i>Rhinoscleromatis</i>		+	-	-	-	-	-	+	d	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Yersineae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Enterocolitica</i>	+	-	-	+	-	-/+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
			100.0	0.0	0.0	90.7	0.0	26.7	0.0	0.0	98.7	98.7	0.1	0.0	0.0	90.7	0.0
		<i>Pseudotuberculosis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
			100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	55.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	

	<p>+</p> <p>Négative <sup>D</sup> <i>S. typhi</i>, <i>S. cholerae-suis</i>, <i>S. enteritidis</i> biosérotypes <i>paratyphi</i> A et <i>pullorum</i> et peu d'autres ne fermentent pas</p> <p>Positive</p> <p>-</p> <p>Rapidement le dulcitol</p> <p>+/- Essentiellement positive E <i>S. enteritidis</i> biosérotypes <i>paratyphi</i> A et d'autres biotypes rares peuvent être H<sub>2</sub>S négatif</p> <p>-/+ Essentiellement négative F <i>S. typhi</i>, <i>S. enteritidis</i> biosérotypes <i>paratyphi</i> A et certains biotypes rares sont citrate négatif. <i>S. cholerae-suis</i> donne en général une réaction positive retardée</p> <p>D Types biochimiquement différents G <i>Serratia</i>, <i>Proteus</i> et <i>Providencia alcalifaciens</i> développent une faible quantité de gaz. La production de gaz peut ne pas être évidente</p> <p>W Réaction faible H <i>S. enteritidis</i> biosérotypes <i>paratyphi</i> A est lysine décarboxylase négative</p> <p>A Certains biotypes de <i>S. flexneri</i> développent</p> <p>I <i>S. typhi</i> et <i>S. Galli arum</i> sont ornithine décarboxylase négative</p> <p>Des gaz</p> <p>B En général les souches de <i>S. sonnei</i></p> <p>Je Le groupe Alkalescens-Dispar (A-D) est considéré comme biotype d'<i>E.coli</i>. En général les appartenants au groupe A-D</p> <p>Fermentent le lactose très lentement</p> <p>Ne développent pas de gaz, ne fermentent pas le lactose et donnent un test de mobilité négatif</p> <p>C <i>S. typhi</i> et <i>S. Galli arum</i> ne développent pas</p> <p>K Occasionnellement une souche peut produire H<sub>2</sub>S</p> <p>De gaz</p>
--	--

### g. Conservation

Conserver à 2-8°C dans un endroit sombre dans son emballage d'origine. Dans ces conditions, le produit est valable jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser au-delà de cette date. Éliminer en présence de signes de détérioration.

### h. Elimination du matériel utilisé

Après utilisation, *Enteropluri-Test* doit être décontaminé et éliminé conformément aux techniques utilisées en laboratoire pour la décontamination et l'élimination du matériel potentiellement infecté.

## II.2.1.2. Tests d'oxydation/réduction

### II.2.1.2.1.1. Catalase (Bartelt *et al.*, 2000)

Ce test démontre la présence de catalase, une enzyme qui catalyse la libération d'oxygène à partir du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il est utilisé pour différencier les bactéries qui produisent une enzyme catalase, comme les *staphylocoques* des bactéries qui ne produisent pas de catalase, comme les *streptocoques*. Normalement, on utilise 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour la culture de routine, tandis que 15% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est utilisé pour la détection de la catalase chez les anaérobies

#### a. Principe du test de la catalase

L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène (Wheelis., 2008). La catalase accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène



Cette réaction se manifeste par la formation rapide de bulles (Clarke *et al.*, 1952 ; MacFaddin., 2000).

#### b. Objectif ou utilisations du test de la catalase

Le test de la catalase facilite la détection de l'enzyme catalase dans les bactéries. Il est essentiel pour différencier les *Micrococcaceae* à catalase positive des *Streptococcaceae* à catalase négative. Alors que Si elle est principalement utile pour différencier les genres, elle est également précieuse pour la spéciation de certaines bactéries à Gram positif. Dans la spéciation de certains Gram positifs tels que *Aerococcus urinae* (positif) d'*Aerococcus viridians* (négatif) et d'organismes à Gram négatif tels que *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, et *Campylobacter colis* (tous positifs) à partir d'autres espèces de *Campylobacter* (MacFaddin., 2000 ; Mahon *et al.*, 2011). Certains ont fait état de sa valeur dans la

différenciation présomptive parmi certaines *entérobactéries* (Taylor *et al.*, 1972). Le test de la catalase est également utile pour différencier les bactéries aérobies des bactéries anaérobies obligatoires, car on sait que les anaérobies sont généralement dépourvus de cette enzyme. Sont généralement connues pour ne pas posséder cette enzyme (Mahon *et al.*, 2011 ; McLeod *et al.*, 1923). Dans ce contexte, le test de la catalase est utile pour différencier les souches aérotolérantes des aérotolérantes de *Clostridium*, qui sont négatives à la catalase, et de *Bacillus*, qui sont catalase positive (Mahon *et al.*, 2011).

### c. Procédure du test de la catalase

Pour les tests de routine sur les aérobies, utiliser du peroxyde d'hydrogène à 3 % disponible dans le commerce (Clarke *et al.*, 1952 ; MacFaddin., 2000). Conserver le peroxyde d'hydrogène au réfrigérateur dans un flacon à l'abri de la lumière. Pour l'identification des bactéries anaérobies, une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 15 % est nécessaire (Bartelt., 2000). Dans ce contexte, le test de la catalase est utilisé pour différencier les souches aérotolérantes de *Clostridium*, qui sont négatives à la catalase, des espèces de *Bacillus*, qui sont négatives à la catalase, des espèces de *Bacillus*, qui sont positives (Mahon *et al.*, 2011). Le test à la catalase superoxol utilisé pour la spéciation présomptive de certains organismes *Neisseria* nécessite une concentration différente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## PROTOCOLE

Il existe de nombreuses applications et variantes du test de la catalase. Il s'agit notamment du test de la catalase sur lame ou sur goutte, de la méthode du tube, de la catalase semi-quantitative pour l'identification de *Mycobacterium tuberculosis*, de la catalase thermostable utilisée pour la différenciation des espèces de *Mycobacterium*, et de la méthode du tube capillaire et de la lamelle couvre-objet. (MacFaddin., 2000). L'une des méthodes les plus populaires en bactériologie clinique est la méthode de la catalase sur lame ou sur goutte, car elle nécessite une petite quantité d'organismes et repose sur une technique relativement simple. Le présent protocole décrit la procédure à suivre pour les méthodes qualitatives de la catalase sur lame et sur tube, qui sont principalement utilisées pour la différenciation des *staphylocoques* et des *streptocoques*.

### Méthode du lame (goutte)

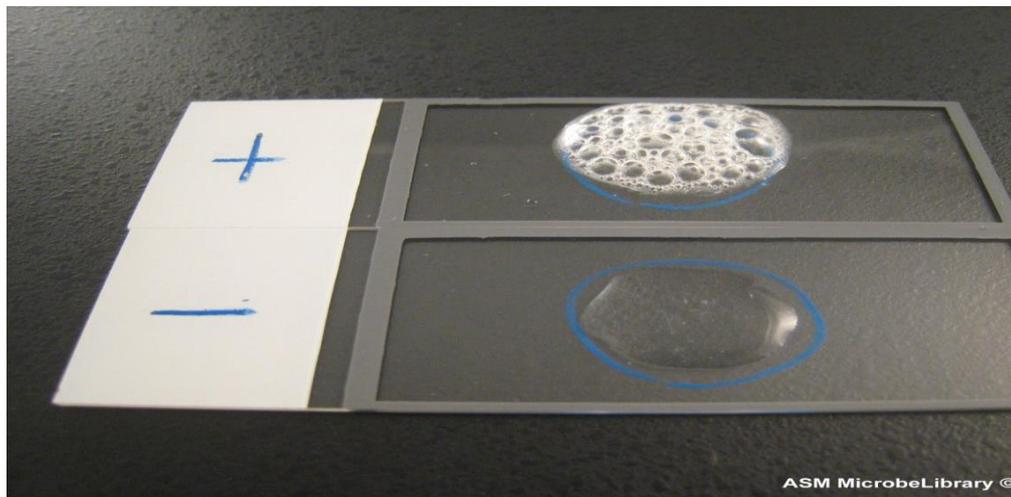
Placer une lame de microscope dans une boîte de Pétri. Garder le couvercle de la boîte de Pétri à disposition. L'utilisation d'une boîte de Pétri est facultative car la catalase sur lame peut être correctement réalisée sans elle. Toutefois, pour limiter les aérosols de catalase, dont il a été démontré qu'ils transportaient des cellules bactériennes viables (Duke *et al.*, 1972), l'utilisation d'une boîte de Pétri est fortement recommandée. À l'aide d'une anse d'inoculation stérile ou d'un bâtonnet applicateur en bois, prélever une petite quantité d'organisme sur une colonie bien

isolée de 18 à 24 heures et la placer sur la lame de microscope. Veillez à ne pas prélever de gélose. Cette précaution est particulièrement importante si la colonie isolée a été cultivée sur une gélose contenant des globules rouges. La présence de globules rouges dans le test peut entraîner une réaction faussement positive (**Forbes et al., 2007 ; MacFaddin., 2000**). À l'aide d'un compte-gouttes ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3 % sur l'organisme de la lame de microscope. Ne pas mélanger. Couvrir immédiatement la boîte de Pétri avec un couvercle pour limiter les aérosols et observer la formation immédiate de bulles (O<sub>2</sub> + eau = bulles). L'observation de la formation de bulles sur un fond sombre améliore la lisibilité.

Les réactions positives se manifestent par une effervescence immédiate (formation de bulles) (**Fig. 2**). Placer la lame de microscope sur un fond sombre et utiliser une loupe ou un microscope pour observer les réactions positives faibles.

Si vous utilisez un microscope, placez une lamelle couvre-objet sur la lame et observez sous un grossissement de 40x. L'absence de formation de bulles (pas d'enzyme catalase pour hydrolyser le peroxyde d'hydrogène) correspond à une réaction catalase négative (**Fig. 2**).

Le contrôle de qualité est effectué en utilisant des organismes connus pour être positifs et négatifs pour la catalase.



**Figure 2 : Résultats du test de catalase (American Society for Microbiology © 2016)**

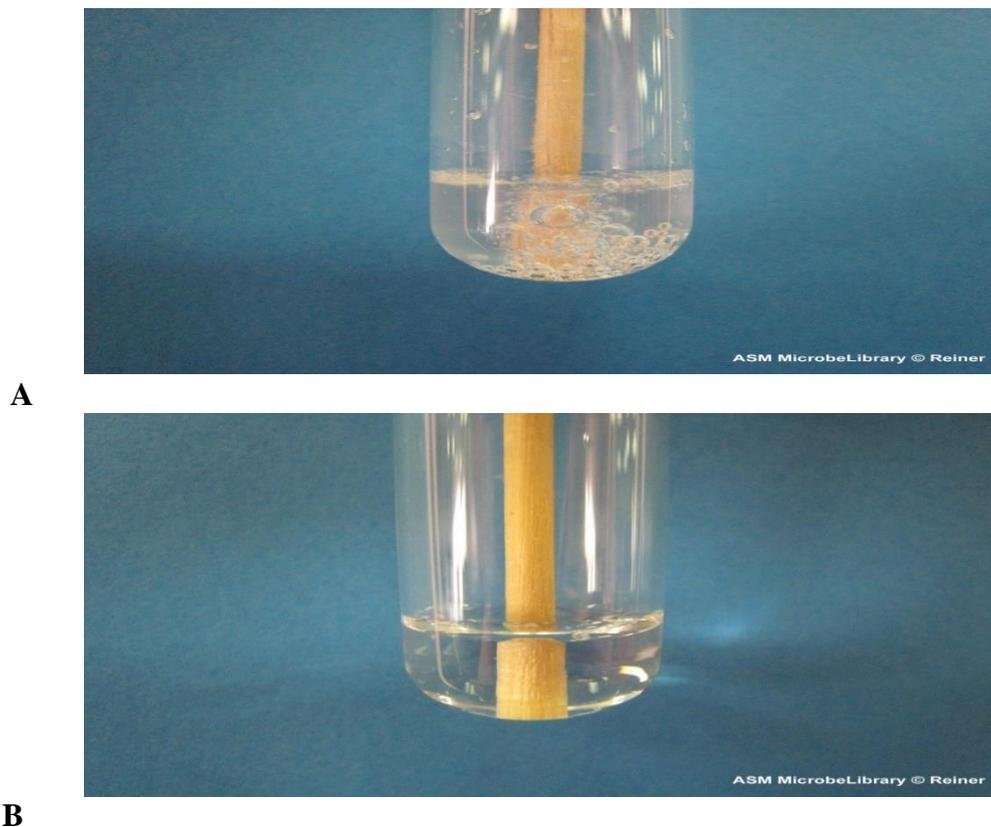
Sur lame. (En haut) La réaction positive a été produite par *Staphylococcus aureus* ; (en bas) la réaction négative a été produite par *Streptococcus pyogenes*.

### Méthode du tube

Ajouter 4 à 5 gouttes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3 % dans un tube à essai de 12 x 75 mm (**South Bend., 2010**). À l'aide d'un bâtonnet applicateur en bois, prélever une petite quantité d'organisme sur une colonie bien isolée de 18 à 24 heures et la placer dans le tube à essai. Veiller à ne pas prélever d'agar. Ceci est particulièrement important

si l'isolat de la colonie a été cultivé sur une gélose contenant des globules rouges. Le transport de globules rouges dans le test peut entraîner une réaction faussement positive (Forbes *et al.*, 2007 ; MacFaddin., 2000). Placer le tube sur un fond sombre et observer la formation immédiate de bulles ( $O_2 + \text{eau} = \text{bulles}$ ) à l'extrémité du bâtonnet applicateur en bois. Les réactions positives se manifestent par une effervescence immédiate (formation de bulles) (figure 3A). Utiliser une loupe ou un microscope pour observer les réactions positives faibles. L'absence de formation de bulles (pas d'enzyme catalase pour hydrolyser le peroxyde d'hydrogène) correspond à une réaction catalase négative (figure 3B).

Le contrôle de qualité est effectué en utilisant des organismes connus pour être positifs et négatifs pour la catalase.

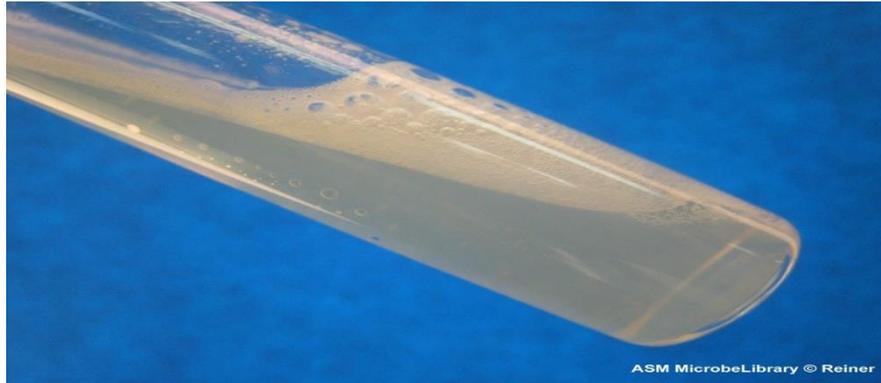


**Figure 3 : Résultats du test de la catalase en tube (American Society for Microbiology © 2016)**

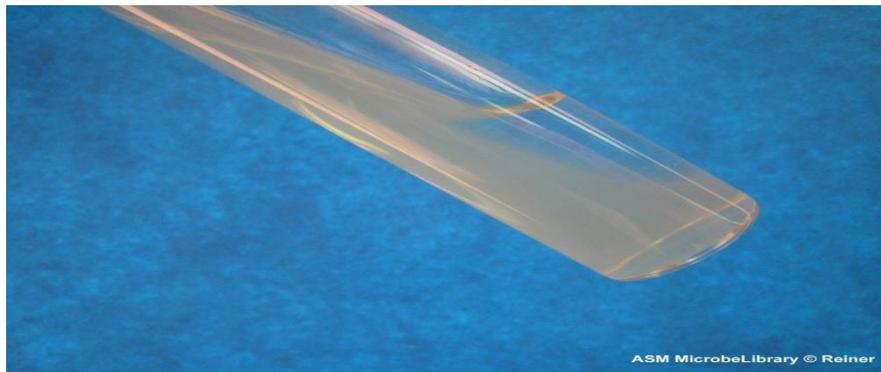
(A) La réaction positive a été produite par *Staphylococcus aureus* ; (B) la réaction négative a été produite par *Streptococcus pyogenes*.

**Méthode du tube (en pente)**

Ajouter 1,0 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3 % directement sur une culture pure de 18 à 24 heures fortement inoculée et cultivée sur une gélose nutritive (MacFaddin., 2000). Placer le tube sur un fond sombre et observer la formation immédiate de bulles. Les réactions positives se manifestent par une effervescence immédiate (formation de bulles) (figure 4A). L'absence de formation de bulles (pas d'enzyme catalase pour hydrolyser le peroxyde d'hydrogène) correspond à une réaction catalase négative (figure 4B).



A



B

**Figure 4 :** Résultats du test de la catalase en tube. (En pente) (American Society for Microbiology © 2016)

(A) La réaction positive a été produite par *Staphylococcus aureus* ; (B) la réaction négative a été produite par *Streptococcus pyogenes*.

**II.2.1.2.1.2. D'oxydase (Leber et al., 2016)****a. Objectif du test de l'oxydase**

Déterminer la capacité de l'organisme à produire l'enzyme cytochrome oxydase.

*b. Principe du test d'oxydase*

Le test d'oxydase est conçu pour détecter spécifiquement la présence du système enzymatique terminal de la respiration aérobie appelé cytochrome C oxydase ou cytochrome  $a_3$ . La cytochrome C oxydase est le dernier accepteur d'électrons  $H_2$  dans un mécanisme respiratoire aérobie composé d'un certain nombre d'enzymes qui s'oxydent et se réduisent alternativement en donnant ou acceptant des électrons dérivés de  $H_2$ .

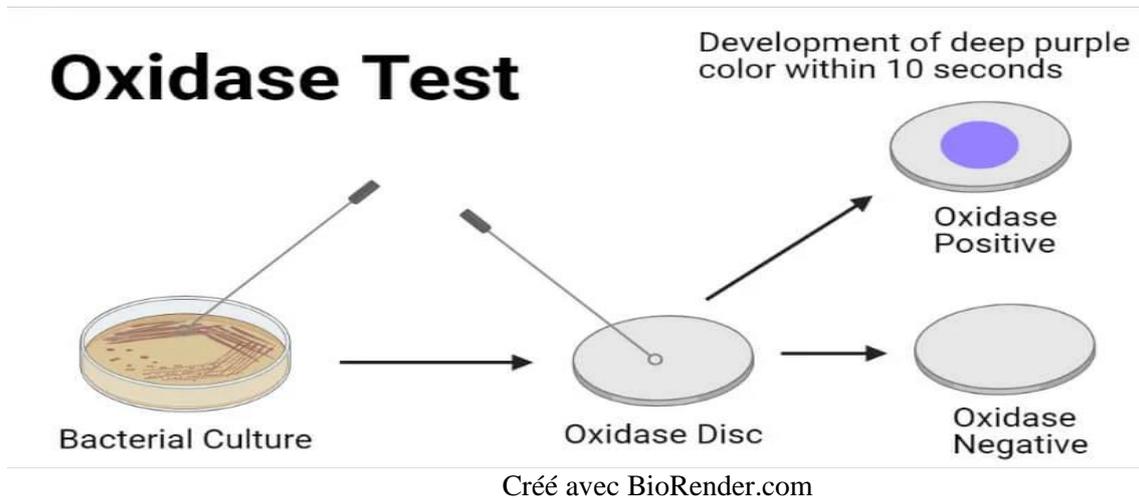
La capacité d'un organisme à produire la cytochrome C oxydase peut être déterminée en utilisant le réactif dihydrochlorure de tétraméthyl-p-phénylènediamine imprégné dans le disque filtrant. Le réactif sert de substrat artificiel donnant des électrons et s'oxydant ainsi en un composé violet foncé en présence de l'enzyme oxydase et d' $O_2$  libre. Le développement d'une coloration rose, puis marron, et enfin violet foncé après avoir frotté l'organisme dans le disque d'oxydase contenant le réactif indique une réaction positive. La réaction positive implique la conversion de la tétraméthyl-p-phénylènediamine incolore et réduite en une forme oxydée de couleur violet foncé en présence de la cytochrome C oxydase. L'absence de changement de couleur indique le résultat négatif du test.

*c. Procédure du test de l'oxydase*

- Prendre un papier filtre imbibé du substrat dihydrochlorure de tétraméthyl-p-phénylènediamine.
- Humidifiez le papier avec de l'eau distillée stérile.
- Prélevez la colonie à tester avec une anse en bois ou en platine et étalez-la dans le papier filtre.
- Observez la zone inoculée du papier pour constater un changement de couleur vers le bleu foncé ou le violet en 10 à 30 secondes.

Où

- Prenez un disque d'oxydase disponible dans le commerce contenant le réactif.
- Choisissez la colonie isolée à tester et frottez-la dans le disque.
- Observez le changement de couleur dans les 10 secondes



***Figure 5 : Test oxidase (Microbe Notes., 2020).***

*d. Interprétation des résultats du test de l'oxydase :*

**Test positif :** Développement d'une couleur violette profonde dans les 10 secondes

**Test négatif :** Absence de couleur

*e. Limites du test à l'oxydase*

Il a été démontré que les réactifs utilisés dans le test à l'oxydase s'auto-oxydent, ce qui peut donner lieu à des résultats faussement positifs.

Les boucles en nickel, en acier et autres peuvent donner des résultats faussement positifs, il est donc important de n'utiliser que des boucles de transfert en platine ou inertes, comme les bâtonnets de bois stériles couramment utilisés dans les laboratoires d'enseignement.

Les bactéries cultivées sur des milieux contenant des concentrations élevées de glucose présentent une activité oxydase inhibée, il est donc recommandé de tester les colonies cultivées sur des milieux sans excès de sucre, comme la gélose nutritive.

*f. Contrôle de qualité du test d'oxydase*

**Positif :** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

**Négatif :** *Escherichia coli* ATCC 25922

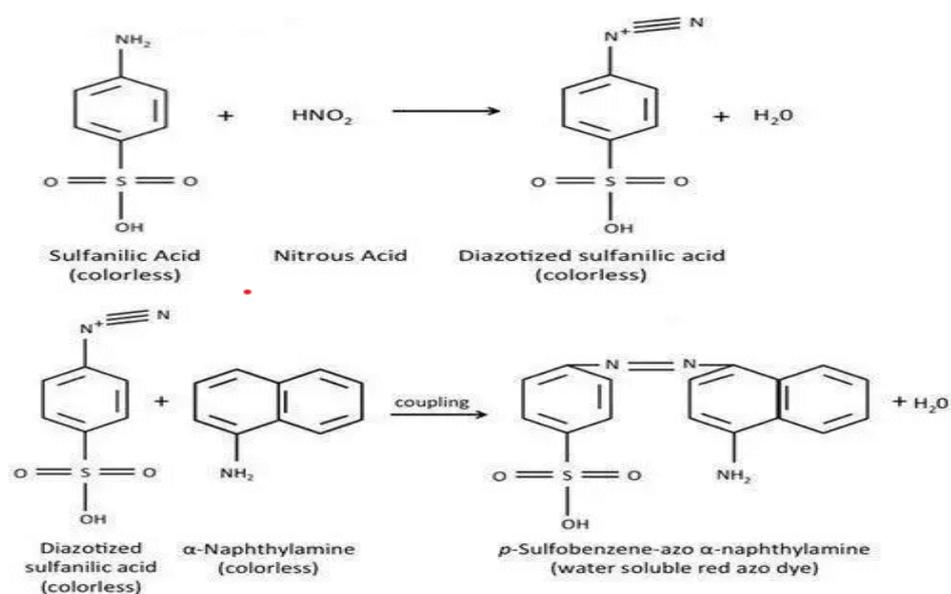
### II.2.1.2.1.3. Réduction du nitrate (Tille *et al.*, 2014)

#### a. Objectifs

Déterminer la capacité de réduction des nitrates (production de l'enzyme nitrate réductase) des bactéries testées. Identifier les bactéries testées sur la base du profil biochimique.

#### b. Principe du test de réduction des nitrates

Les organismes réducteurs de nitrates produisent une enzyme nitrate réductase, qui réduit le nitrate en nitrite. Le nitrite ainsi formé réagit avec l'acide acétique et forme de l'acide nitreux. L'acide nitreux est diazoté avec l'acide sulfanilique pour former un sel de diazonium incolore (acide sulfanilique diazoté). L'acide nitrite-sulfanilique incolore, lorsqu'il est combiné avec la diméthyl-naphtylamine ( $\alpha$ -naphtol), forme un colorant azoïque rouge soluble dans l'eau (*p*-Sulfobenzène-azo-naphtylamine),



**Figure 6:** Principe du test de réduction des nitrates.

Certains organismes peuvent réduire davantage les nitrites en d'autres composés azotés. Dans ce cas, il n'y a pas de formation de couleur rouge bien que le composé nitrate soit réduit par les bactéries. De même, s'il n'y a pas de réduction des nitrates, il n'y a pas non plus de formation de la couleur rouge. Pour différencier ces deux cas, on ajoute de la poussière de zinc pour détecter le nitrate non réduit. Le zinc ajouté réduit le nitrate en nitrite et entraîne la formation d'un colorant azoïque de couleur rouge.

*c. Exigences*

Le bouillon de nitrate est utilisé pour tester la capacité des bactéries à réduire le nitrate.

*d. Composition :*

Peptone 20 grammes (Si les bactéries à tester sont fastidieuses, utilisez 25 grammes de poudre de bouillon d'infusion cardiaque à la place de la peptone).

- Nitrate de potassium 2 grammes
- Eau distillée 1000 ml

*e. Préparation :*

- Mélangez les composants susmentionnés dans les proportions indiquées (si vous utilisez de l'agar prêt à l'emploi, mesurez et mélangez avec de l'eau distillée dans la quantité exacte indiquée par le fabricant) et agitez bien pour dissoudre complètement le mélange.
- Transférer 4 ml du milieu dans un tube à essai de 16 × 125 mm (ou plus de milieu en fonction du volume du tube à essai ou de la quantité suffisante pour couler le tube de Durham). Serrer le bouchon à vis (ou boucher le tube avec un bouchon de coton) et l'autoclaver à 121°C et à une pression de 15 lbs pendant 15 minutes.

*f. Produits chimiques/réactifs*

Acide sulfanilique à 0,8% comme réactif A. 0,5% -naphthol comme réactif B et poussière de zinc métallique pur sont nécessaires.

- Préparation de l'acide sulfanilique à 0,8% (réactif A)
  - Acide sulfanilique 0,8 gramme
  - Eau distillée 70 ml
  - Acide acétique glacial 30 ml

Mélangez l'acide sulfanilique avec l'eau distillée et chauffez-le pour le dissoudre complètement. Refroidissez le mélange puis ajoutez lentement l'acide acétique (à une température de 2 à 8°C, vous pouvez le conserver jusqu'à 3 mois).

- Préparation du -naphthol à 0,5% (Réactif B)
  - Naphtol (N, N-diméthyl-  $\alpha$ -naphthylamine) 0,5 grammes
  - Eau distillée 70 ml
  - Acide acétique glacial 30 ml.

Mélanger l'acide acétique glacial avec l'eau distillée et ajouter lentement l'-naphtol et mélanger complètement en agitant. (Stocker à 2 - 8°C, vous pouvez conserver jusqu'à 3 mois)

*g. Équipement*

- Tubes à essai
- Compte-gouttes
- EPI et autre matériel général de laboratoire Tubes de Durham
- Autoclave Brûleur Bunsen
- Porte-tubes à essai Micropipette
- Boucle d'inoculation
- Disque de nitrate (uniquement pour la méthode du disque pour le test de réduction du nitrate des bactéries anaérobies)

*h. Organisme à tester (échantillon de bactéries)*

- Contrôles positifs : *E. coli* ATCC 25922, positif au nitrate, négatif au gaz.
- *P. aeruginosa* ATCC 27853 positive au nitrate et positive au gaz.
- Contrôle négatif : *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, négatif au nitrate.

*i. Procédure du test de réduction des nitrates*

Pour les tests de réduction des nitrates, trois méthodes, la méthode du tube, la méthode du disque et la méthode rapide, sont couramment utilisées. Parmi ces méthodes, la méthode du tube est la méthode de test la plus fréquemment utilisée.

**Méthode des tubes**

- Autoclavez les tubes à essai avec le bouillon de nitrate et inversez le tube de Durham et laissez-les refroidir à température ambiante.
- Dans un tube, inoculer la bactérie à tester (échantillon) d'une colonie isolée de culture fraîche (24 heures) à l'aide d'une boucle d'inoculation (ou déposer 2/3 gouttes de bouillon contenant une culture de l'organisme à tester pendant la nuit).
- Incuber le tube à une température appropriée pendant la période de temps requise.
  - Bacilles à Gram négatif ne fermentant pas le glucose à 25-30°C pendant 24 heures à 5 jours.
  - Autres bactéries à 35 ±2°C pendant 24 heures à 5 jours.
  - *Campylobacter spp.* À 35 ±2°C pendant au moins 3 jours dans des conditions anaérobies ou microaérobies.

- Après 24 heures, recherchez une croissance visible et des bulles de gaz à l'intérieur du tube de Durham. S'il n'y a pas de gaz ni de croissance visible, incubez le tube pendant les 24 heures suivantes (ou plus selon la bactérie testée).
  - Si du gaz est présent dans le tube de Durham dans la culture de bactéries non fermentant le glucose, rapportez le test comme positif pour la réduction du nitrate et la production de gaz.
  - S'il n'y a pas de gaz dans le tube de Durham ou si la bactérie testée fermente le glucose, transférez 0,5 ml de culture bien mélangée dans un autre tube à essai propre (pas nécessairement stérile).
    - Ajouter 3 gouttes de réactif A et bien mélanger en agitant doucement.
    - Ajouter 3 gouttes de réactif B et bien mélanger en secouant doucement.
    - Observez le développement de la couleur rouge dans les 2 minutes.
  - Si aucune couleur rouge ne se développe, ajoutez une petite quantité de poussière de zinc et observez le développement de la couleur rouge dans les 10 minutes.
  - S'il n'y a pas de formation de gaz ni de développement de la couleur rouge après l'addition des deux réactifs A et B, réincubez les tubes et testez en conséquence après 48 heures et le 5<sup>ème</sup> jour.

### **Méthode du disque**

- Utilisée uniquement pour les organismes anaérobies.
- Sur une culture fraîche (24 heures ou une nuit) de l'organisme à tester, placez un disque de nitrate dans la zone de forte croissance et incubez en anaérobiose pendant 24 à 48 heures.
- Placez le disque de nitrate sur une lame de verre ou une plaque de Pétri propre (pas nécessairement stérile).
  - Ajouter 1 goutte du réactif A.
  - Ajoutez 1 goutte du réactif B.
- Observez le développement de la couleur rouge dans les 2 minutes.
- Si aucune couleur rouge ne se développe, ajoutez une petite quantité de poussière de zinc et observez le développement de la couleur rouge dans les 5 minutes.

### **Méthode rapide**

- Elle n'est peut-être pas aussi efficace que la méthode du tube, mais elle peut être utilisée pour obtenir des résultats rapides si l'organisme est censé être un réducteur rapide de nitrate et se multiplier rapidement (avoir un temps de génération très court).
- Ajoutez 0,5 ml de bouillon de nitrate dans un tube à essai propre, passez-le à l'autoclave pendant 15 minutes à une pression de 15 livres et à 121°C, puis laissez-le refroidir à température ambiante.

- Inoculer le tube avec un fort inoculum de culture bactérienne fraîche.
- Incuber à 35°C pendant 2 heures.
  - Ajouter 2 gouttes de réactif A et 2 gouttes de réactif B et bien mélanger.
- Observer le développement de la couleur rouge dans les 2 minutes.
- Si aucune couleur rouge ne se développe, ajouter une petite quantité de poussière de zinc et observer le développement de la couleur rouge dans les 5 minutes.

j. *Résultats et interprétation du test de réduction des nitrates*

- Formation de bulles de gaz (même une seule bulle) dans la culture de bactéries non fermentant le glucose = réduction du nitrate positive, gaz positif.
- Formation d'une couleur rouge après l'ajout de réactifs et présence de gaz dans le tube de Durham = réduction des nitrates positive, gaz positif.
- Formation d'une couleur rouge après l'ajout de réactifs et l'absence de gaz dans le tube de Durham = réduction des nitrates positive, gaz négatif.
- Pas de formation de couleur rouge après l'addition des réactifs A et B et pas de formation de couleur rouge après l'addition de poussière de zinc = réduction des nitrates positive (le nitrate est réduit en nitrite, et le nitrite est réduit en d'autres composés azotés).
- Pas de formation de couleur rouge après l'ajout des réactifs A et B, mais formation de couleur rouge après l'ajout de poussière de zinc = réduction des nitrates négative.

k. *Contrôle de la qualité*

Pour vérifier la qualité du milieu et des réactifs, nous pouvons utiliser des organismes de contrôle positif et négatif comme mentionné précédemment. Pour ce qui est de l'organisme à tester, étiqueter les tubes à essai en tant que "contrôle positif, gaz positif", "contrôle positif, gaz négatif", et "contrôle négatif" et inoculer les tubes avec *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, et *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 respectivement. Suivez toutes les procédures mentionnées ci-dessus et lisez le résultat final après l'ajout des réactifs et de la poussière de zinc.

*P. aeruginosa* ATCC 27853 doit donner des résultats positifs au nitrate (formation de couleur rouge) et positifs au gaz.

*E. coli* ATCC 25922 doit donner des résultats positifs au nitrate (formation de couleur rouge) et négatifs au gaz.

*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 doit donner un résultat négatif au nitrate (pas de formation de couleur rouge).

### **Bactéries présentant un résultat positif**

*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter spp*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Citrobacter spp*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *S. aureus*, etc.

### **Bactéries présentant un résultat négatif**

*Acinetobacter spp*, *Streptococcus spp*, *Mycobacterium bovis*, *M. africanum*, etc.

#### *l. Précautions à prendre*

- Stérilisez correctement le milieu avant de l'utiliser, stérilisez la zone de travail, travaillez dans une zone stérile, portez les EPI appropriés et suivez les règles de sécurité du laboratoire.
- Soyez prudent lorsque vous utilisez du -naphthol, car il est cancérigène.
- Utilisez la quantité appropriée de milieu dans un tube à essai en fonction de la taille du tube à essai disponible et du tube de Durham. Le tube de Durham doit être complètement immergé dans le bouillon.
- Il ne doit pas y avoir de bulles de gaz dans les tubes de Durham avant le test.
- N'ajoutez pas trop de poussière de zinc. Elle ne doit pas dépasser la quantité qui adhère à l'extrémité du bâtonnet applicateur (comme un cure-dent).

#### *m. Applications du test de réduction des nitrates*

- Comprendre les caractéristiques biochimiques des bactéries pour les identifier phénotypiquement.
- Différencier *Moraxella catarrhalis* de *Neisseria spp*. Et *Kingella spp*. De *Neisseria spp*. (*N. gonorrhoeae* et *K. denitrificans*).
- Confirmation et identification des *Enterobacterales*.
- Différenciation de *Mycobacterium spp*.
- Différenciation et identification de *Corynebacterium spp*.

#### *n. Limites du test de réduction du nitrate*

Il n'est pas suffisant pour l'identification des espèces bactériennes. Il ne constitue qu'une partie du test biochimique ; d'autres tests sont donc nécessaires pour une identification complète.

Nécessité d'un milieu spécial contenant du nitrate (comme le bouillon de nitrate) mais exempt de nitrite, même en petite quantité.

Il est difficile de remarquer la croissance des organismes dans le bouillon de nitrate.

Nécessité d'une vérification par l'ajout de poussière de zinc pour éviter la communication de résultats faussement négatifs si le nitrite est encore réduit en d'autres composés azotés.

Risque élevé de résultat faussement positif si la poussière de zinc est ajoutée en plus grande quantité.

Nécessité de savoir si l'organisme est un fermenteur de glucose avec production de gaz ou non avant de procéder au test de réduction des nitrites et d'établir un rapport.

Comme il s'agit d'une méthode basée sur la culture, il faut au moins 24 heures à 5 jours avant d'obtenir un résultat négatif.

### II.2.1.3. Test oxydatif-fermentatif (Leboffe *et al.*, 2006)

#### a. Objectif

Le test d'oxydation-fermentation est utilisé pour déterminer si les bactéries gram-négatives métabolisent les hydrates de carbone par oxydation, par fermentation ou sont Nonsacchrolytiques et n'ont donc pas la capacité d'utiliser les glucides présents dans le milieu.

#### b. Théorie

Le test d'oxydation-fermentation permet de déterminer si certains bâtonnets à Gram négatif métabolisent le glucose par fermentation ou par respiration aérobie (oxydation) (MacFaddin *et al.*, 2000), (Winn *et al.*, 2006). Au cours du processus anaérobie de fermentation, le pyruvate est converti en divers acides mixtes en fonction de la nature de l'organisme. Pyruvate est converti en une variété d'acides mixtes selon le type de fermentation. La forte concentration d'acide produite pendant la fermentation fait passer l'indicateur bleu de bromthymol dans les milieux OF du vert au jaune en présence ou en l'absence d'acide vert au jaune en présence ou en l'absence d'oxygène (MacFaddin *et al.*, 2000), (Winn *et al.*, 2006). Certaines bactéries gram-négatives non fermentaires métabolisent le glucose au moyen de la respiration aérobie et ne produisent donc que de l'oxygène respiration aérobie et ne produisent donc qu'une petite quantité d'acides faibles au cours du cycle de Krebs et de l'entropie acides faibles au cours du cycle de Krebs et d'Entner Doudoroff (glycolyse) (Winn *et al.*, 2006). L'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu concentration accrue de glucose dans le milieu augmente la production de ces acides faibles à un niveau qui peut être détecté par l'indicateur

bleu de bromthymol. Pour améliorer encore la détection de ces acides faibles ce milieu contient une concentration réduite de peptones. Cela permet de réduire la production d'amines à partir de l'échantillon réduit la production d'amines provenant du métabolisme des acides aminés d'acides aminés, ce qui réduit l'effet neutralisant de ces produits (Winn *et al.*, 2006). Un tampon de phosphate dipotassique est ajouté pour favoriser davantage la détection des acides.

c. *RECETTE*

- Milieu de base OF de Hugh et Leifson (MacFaddin *et al.*, 2000), (Winn *et al.*, 2006).
  - Peptone (tryptone) 2,0 g
  - Chlorure de sodium 5,0 g
  - Glucose (ou autre hydrate de carbone) a 10.0 g
  - Bleu de bromthymol 0,03 g
  - Agar 3,0 g
  - Phosphate dipotassique 0,30 g
  - Porter à 1 litre avec de l'eau distillée. Le pH doit être ajusté à 7,1 avant l'autoclavage
- Après autoclavage du milieu à 121°C pendant 15 minutes, une solution de 10 % d'hydrates de carbone stérilisée par filtration est ajoutée au milieu stérilisé par filtration d'une solution d'hydrates de carbone à 10 % (MacFaddin *et al.*, 2000), (Winn *et al.*, 2006). Est dans le milieu à une concentration finale de 1 %. Le milieu stérile contenant l'hydrate de carbone est aliquoté aseptiquement dans des tubes à essai stériles et refroidi sans être incliné, sous forme de piqûres (Leboffe *et al.*, 2006). Certaines procédures prévoient l'ajout de 10 g/litre d'hydrate de carbone au milieu avant la stérilisation Le milieu est ensuite dissous en le chauffant à ébullition sur une plaque chauffante ou à la vapeur pendant 20 minutes avant d'être aliquoté à la vapeur pendant 20 minutes avant d'être aliquoté dans des tubes à essai. Le milieu en tube est ensuite étuvé pendant 20 minutes au lieu d'être stérilisé à l'autoclave afin d'éviter la décomposition des glucides. Le milieu de base OF est disponible dans le commerce sous forme prémélangée auprès des sociétés de fournitures biologiques. La source d'hydrates de carbone n'est pas incluse et doit être ajoutée comme indiqué ci-dessus. Doit être ajoutée comme indiqué ci-dessus.

d. PROTOCOLE

Test d'oxydation-fermentation en milieu OF avec glucose

**A. Inoculation du milieu**

Deux tubes de milieu oxydo-fermentaire sont inoculés par piqûre à "mi-fond" (Winn *et al.*, 2006) ou à ¼ de pouce du fond (MacFaddin *et al.*, 2000) avec le test "jusqu'à la moitié du fond (Winn *et al.*, 2006) ou à ¼ de pouce du fond (MacFaddin *et al.*, 2000) avec l'organisme testé.

L'organisme à tester. Recouvrir l'un des deux tubes avec 1 cm d'huile minérale (Winn *et al.*, 2006) (Fig.7, 8, 9). Ce recouvrement empêche la diffusion de l'oxygène dans le milieu et crée une condition anaérobie dans le tube.

**B. Conditions d'incubation**

L'incubation à 35°C pendant 48 heures est recommandée pour la plupart des bâtonnets Gram Négatif (Leboffe *et al.*, 2006), (MacFaddin *et al.*, 2000). Les bactéries à croissance lente peuvent nécessiter 3 à 4 jours avant que les résultats puissent être observés (MacFaddin *et al.*, 2000)

**C. Interprétation des résultats**

**1. Résultats fermentaires**

Les bactéries capables de fermenter le glucose donnent un résultat fermentaire, comme l'indique par la production d'acide à la fois dans le tube ouvert (aérobie) et dans le tube couvert d'huile (Anaérobie). L'acide produit (pH 6,0) fait passer l'indicateur de pH, le bleu de bromthymol, du vert au jaune. Passe du vert au jaune. La consistance semi-solide du milieu permet également de détecter la motilité. Noter la croissance floue à l'écart de la ligne de stab (Fig. 7) (Winn *et al.*, 2006)



**Figure 7 : Test oxydo-fermentaire (American Society for Microbiology © 2016)**

Test oxydo-fermentaire inoculé avec *Escherichia coli*. La production d'acide dans le tube ouvert et dans le tube recouvert d'huile indique un résultat fermentaire. La croissance trouble dans l'ensemble est positive pour la motilité

## 2. Résultats de l'oxydation

Les bactéries non fermentaires qui métabolisent le glucose par le biais du métabolisme oxydatif donnent un résultat oxydatif. Ce résultat est indiqué par une faible production d'acide dans le tube ouvert. L'acide produit (pH 6,0) modifie l'indicateur de pH le bleu de bromthymol, passe du vert au jaune (MacFaddin *et al.*, 2000), (Winn *et al.*, 2006) Après une incubation de 24 heures 24 heures, un changement de pH est observé à la surface du tube ouvert, là où la croissance en présence d'oxygène se produit où l'on observe une croissance en présence d'oxygène (Blair *et al.*, 1970) (Fig. 8 a). Lors d'une incubation prolongée (plus de 48 heures), la réduction de la concentration de l'agar dans le milieu permet la croissance en présence d'oxygène agar dans le milieu permet la diffusion éventuelle de l'acide faible dans tout le tube dans l'ensemble du tube (Fig. 8 c). Aucun changement de couleur ni aucune réaction ne se produisent dans le tube recouvert d'huile.



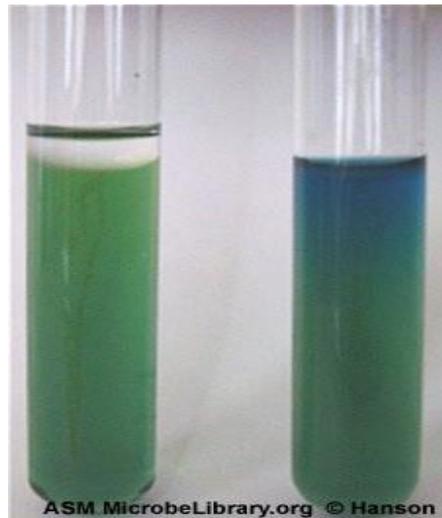
**Figure 8 :** Test oxydo-fermentaire inoculé avec *Pseudomonas aeruginosa* (American Society for Microbiology © 2016)

La production d'acide dans le tube ouvert et non dans le tube recouvert d'huile indique un résultat oxydatif. D'huile indique un résultat oxydatif. (a) *P. aeruginosa* incubé pendant 24 heures. Noter le changement de pH dans la partie supérieure du tube ouvert uniquement. (b) *P. aeruginosa* incubée pendant 48 heures. Noter la diffusion de l'acide dans le tube. (c) *P. aeruginosa* incubée pendant 5 jours. Noter la diffusion de l'acide dans tout le tube. Le résultat est meilleur s'il est lu dans les 24 à 48 heures.

## 3. Résultats négatifs

Les bactéries non sacchrolytiques donnent un résultat OF négatif. Le résultat négatif est indiqué par l'absence de changement de couleur dans le tube recouvert d'huile et, dans certains

cas une augmentation du pH (pH 7,6) faisant passer le bleu de bromthymol du vert au bleu (MacFaddin *et al.*, 2000 ; Winn *et al.*, 2006). Dans la partie supérieure du tube bleu (MacFaddin *et al.*, 2000 ; Winn *et al.*, 2006). Dans la partie supérieure du tube ouvert. L'augmentation du pH est due à production d'amines par les bactéries qui décomposent la peptone (protéine) dans le milieu (Baron *et al.*, 1990 ; Leboffe *et al.*, 2006). D'autres bactéries donnent un résultat négatif indiqué par l'absence de croissance ou de changement de couleur dans le milieu (Baron *et al.*, 1990 ; Leboffe *et al.*, 2006). Croissance ou un changement de couleur du milieu (Leboffe *et al.*, 2006 ; MacFaddin *et al.*, 2000 ; Winn *et al.*, 2006) (Fig. 9).



**Figure 9:** Test oxydo-fermentaire inoculé avec *Alcaligenes* (American Society for Microbiology © 2016)

L'absence de changement de couleur dans le tube recouvert d'huile et le changement de couleur vers l'alcalinité dans le tube ouvert indiquent un résultat négatif. Alcaline dans le tube ouvert indique un résultat négatif. *A. faecalis* ne peut pas n'utilise pas le glucose de manière fermentaire ou oxydative. Le bleu en haut du tube ouvert est dû à la production d'amines tube ouvert est dû à la production d'amines résultant du métabolisme des protéines dans le milieu dans le milieu.

### **Le test d'oxydation-fermentation utilisant des hydrates de carbone autres que le glucose**

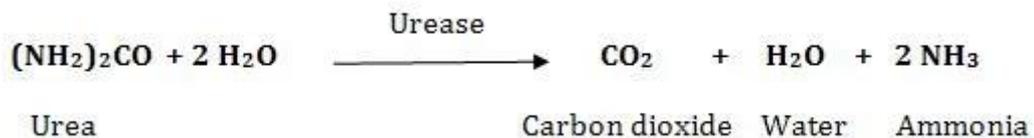
Les bâtonnets gram-négatifs non fermentescibles qui ont donné un résultat un résultat oxydatif lors d'un test au glucose OF peuvent être soumis à d'autres tests visant à déterminer leur capacité à métaboliser d'autres hydrates de carbone par voie oxydative capacité à métaboliser d'autres hydrates de carbone par oxydation. Le glucose est Le glucose est remplacé par du maltose, du lactose, du mannitol ou du saccharose dans le milieu et un seul tube par hydrate de carbone est utilisé un seul tube par hydrate de carbone est inoculé. Il convient d'utiliser un inoculum Il convient d'utiliser un inoculum important, car bon nombre de ces non-fermenteurs ont une croissance lente (MacFaddin *et al.*, 2000) Comme le résultat détecté est

basé sur la respiration aérobie, aucune huile minérale ou couche d'agar n'est utilisée. D'huile minérale ou de couche d'agar. Un résultat positif est indiqué par une production d'acide et un changement de pH dans la partie supérieure de la gélose un changement de pH dans la partie supérieure du tube après 24 heures. Certains non-fermenteurs à croissance lente non fermenteurs à croissance lente peuvent mettre plusieurs jours à produire suffisamment d'acide pour être détectés par le bromthymol pour être détectés par le bleu de bromthymol (MacFaddin *et al.*, 2000), (Winn *et al.*, 2006).

#### II.2.1.4. D'hydrolyse de l'urée (Bermejo *et al.*, 2000)

##### a. Principe du test de l'uréase

L'urée est le produit de la décarboxylation des acides aminés. L'hydrolyse de l'urée produit de l'ammoniac et du CO<sub>2</sub>. La formation d'ammoniaque alcalinise le milieu et le changement de pH est détecté par le changement de couleur du rouge de phénol, qui passe de l'orange clair à un pH de 6,8 au magenta (rose) à un pH de 8,1. Les organismes rapidement positifs à l'uréase transforment tout le milieu en rose en 24 heures. Les organismes faiblement positifs peuvent prendre plusieurs jours, et les organismes négatifs ne produisent aucun changement de couleur ou jaunissent à la suite de la production d'acide.



##### b. Test rapide à l'uréase (RUT)

Le test rapide à l'uréase (RUT) est un test populaire pour le diagnostic d'*Helicobacter pylori*. Il s'agit d'un test rapide, bon marché et simple qui détecte la présence d'uréase dans ou sur la muqueuse gastrique. Il est également connu sous le nom de test CLO (*Campylobacter-like organism test*). Ce test utilise une procédure appelée endoscopie gastrique et biopsie pour prélever des cellules de la muqueuse gastrique.



**Figure 10 :** Test rapide à l'uréase (© 2023 MicrobiologyInfo.com)

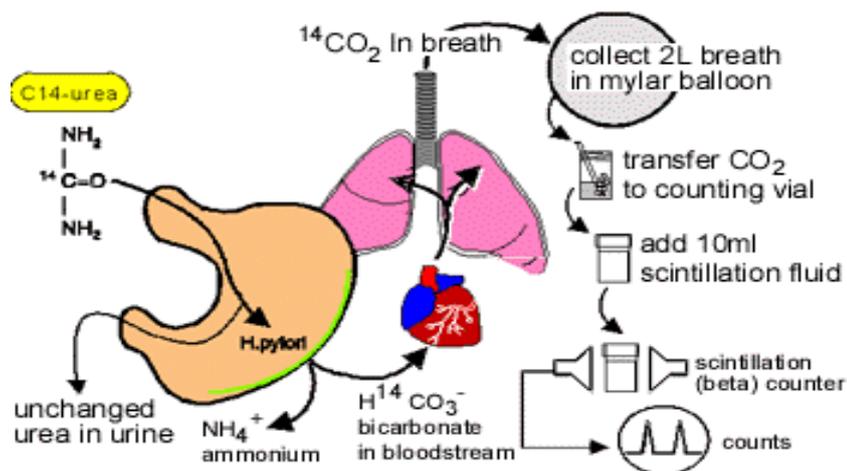
Le test est réalisé lors d'une gastroscopie. Une biopsie de la muqueuse est prélevée dans l'antrum de l'estomac et placée dans un milieu contenant de l'urée et un indicateur tel que le Test rapide à l'uréase (RUT)

Test rapide à l'uréase (RUT) rouge de phénol. L'uréase produite par *H. pylori* hydrolyse l'urée en ammoniac, ce qui augmente le pH du milieu et fait passer la couleur de l'échantillon du jaune (NÉGATIF) au rouge (POSITIF).

Le test peut également être utilisé pour fournir une évaluation informelle de l'exactitude du résultat histopathologique et les divergences doivent donner lieu à une révision de l'histopathologie et à des discussions avec le pathologiste.

### c. Test respiratoire à l'urée

Le test respiratoire à l'urée est un test non invasif courant qui permet de détecter *Helicobacter pylori* en se basant également sur l'activité de l'uréase. Il s'agit d'un test très sensible et spécifique.



**Figure 11 :** Test respiratoire à l'urée (© 2023 MicrobiologyInfo.com)

Le patient ingère de l'urée marquée de manière radioactive (carbone 14 radioactif ou carbone 13 non radioactif). En cas d'infection, l'uréase produite par *Helicobacter pylori* hydrolyse l'urée pour former de l'ammoniac et du bicarbonate marqué qui est expiré sous forme de CO<sub>2</sub>. Le CO<sub>2</sub> marqué est détecté soit par un compteur à scintillation (carbone 14) et une spectrométrie de masse à rapport isotopique, soit par une spectrométrie de corrélation de masse (carbone 13).

*d. Utilisation du test de l'uréase*

Ce test est utilisé pour différencier les organismes en fonction de leur capacité à hydrolyser l'urée à l'aide de l'enzyme uréase. Ce test peut être utilisé dans le cadre de l'identification de plusieurs genres et espèces d'*Enterobacteriaceae*, y compris *Proteus*, *Klebsiella* et certaines espèces de *Yersinia* et *Citrobacter*, ainsi que certaines espèces de *Corynebacterium*. Il est également utile pour identifier *Cryptococcus spp*, *Brucella*, *Helicobacter pylori* et de nombreuses autres bactéries produisant l'enzyme uréase. Directement, ce test est effectué sur des échantillons de biopsie gastrique pour détecter la présence de *H. pylori*.

*e. Milieux utilisés dans le test de l'urée*

Gélose à l'urée de Christensen

*f. Composition*

Ingrédients par litre d'eau désionisée :

Final pH 6.7 +/- 0.2 at 25 degrés C.

**Tableau 6 : Ingrédients utilisés dans le test de l'urée**

<b>Composition</b>	
Urea	20.0 mg
Sodium Chloride	5.0 mg
Monopotassium Phosphate	2.0 mg
Peptone	1.0 mg
Dextrose	1.0 mg
Phenol Red	0.012 mg
Agar	15.0 mg

*g. Préparation*

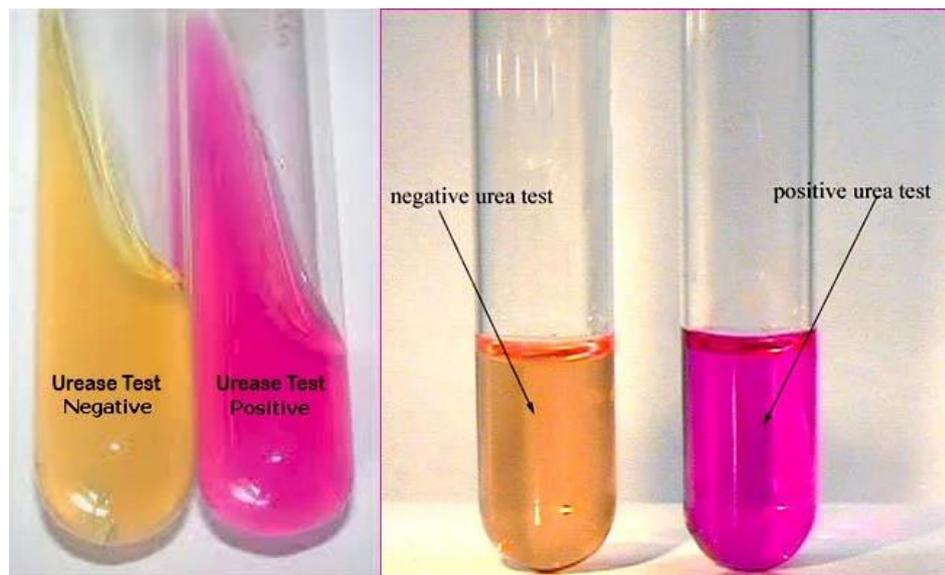
- Dissoudre les ingrédients dans 100 ml d'eau distillée et stériliser par filtration (pores de 0,45 mm).
- Suspendre l'agar dans 900 ml d'eau distillée, faire bouillir pour dissoudre complètement.
- Stériliser à l'autoclave à 121 degrés C et 15 psis pendant 15 minutes.

- Refroidir l'agar à 50-55 degrés C.
- Ajouter aseptiquement 100 ml de base d'urée stérilisée par filtration à la solution d'agar refroidie et mélanger soigneusement.
- Distribuer 4 à 5 ml par tube stérile (13 x 100 mm) et incliner les tubes pendant le refroidissement jusqu'à ce qu'ils soient solidifiés.

*h. Procédure du test à l'uréase*

- Ensemencer la surface d'une gélose à l'urée avec une partie d'une colonie bien isolée ou inoculer la gélose avec 1 à 2 gouttes d'une culture d'une nuit de bouillon d'infusion de cœur de cerveau.
- Laisser le bouchon ouvert et incuber le tube à 35-37 °C à l'air ambiant pendant 48 heures à 7 jours.
- Observer le développement d'une couleur rose jusqu'à 7 jours.

*i. Interprétation des résultats du test de l'uréase*



**Figure 12 :** Résultats du test de l'uréase (© 2023 MicrobiologyInfo.com)

**Réaction positive :** Développement d'une couleur magenta intense à rose vif en 15 min à 24h.

**Exemples :** *Proteus spp*, *Cryptococcus spp*, *Corynebacterium spp*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia spp*, *Brucella spp*, etc.

**Réaction négative :** Pas de changement de couleur.

**Exemples :** *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, etc.

j. *Contrôle de qualité du test de l'uréase*

**Réaction positive :** *Proteus vulgaris* (ATCC13315)

**Faiblement positif :** *Klebsiella pneumoniae* (ATCC13883)

**Négatif :** *Escherichia coli* (ATCC25922)

k. *Limites du test à l'uréase*

Certains organismes décomposent rapidement l'urée (*Brucella* et *H. pylori*), tandis que d'autres réagissent lentement. Il est recommandé d'effectuer des tests biochimiques et/ou sérologiques sur des colonies provenant d'une culture pure pour une identification complète. Pour faciliter la croissance et la réaction d'hydrolyse de l'urée, ne pas utiliser d'inoculum provenant d'une suspension de bouillon. Après des temps d'incubation prolongés, une réaction alcaline faussement positive peut être observée. Pour écarter ce risque, vérifier le test avec un témoin (un tube de gélose à l'urée non inoculé) en même temps que le tube inoculé pendant une incubation prolongée. Ne pas chauffer les géloses à l'urée, car l'urée se décompose très facilement sous l'effet de la chaleur. Pour détecter les espèces *Proteus*, les géloses à l'urée doivent être examinées dans les 6 heures suivant l'inoculation pour détecter une réaction. La gélose à l'urée ne doit pas être utilisée pour déterminer le taux quantitatif de l'activité uréasique, car la capacité et le taux d'hydrolyse des organismes varient. Le fait de ne pas incuber ce milieu avec des bouchons desserrés peut entraîner des résultats erronés. L'urée est sensible à la lumière et peut subir une autohydrolyse. Conserver à l'abri de la lumière entre 2 et 8°C.

### II.2.1.5. Tests de décarboxylation (Tille *et al.*, 2014)

a. *Définition du test de la décarboxylase*

Le test de la décarboxylase sur milieu de base est utilisé pour distinguer les bactéries en fonction de leur capacité à décarboxyler les acides aminés.

Moeller a rapporté la première application pratique du test de la décarboxylase des acides aminés pour l'identification des micro-organismes.

Les travaux de Moeller étaient basés sur les expériences menées par Gale, Gale et Epps sur les enzymes bactériennes de dégradation des acides aminés, les décarboxylases.

Moeller a remarqué que les *Enterobacteriaceae* produisaient de la lysine, de l'arginine et de l'ornithine décarboxylase. Il s'agissait d'un paramètre important pour d'autres tests biochimiques visant à distinguer les bactéries de celles qui leur sont étroitement apparentées.

Calquist a également mis au point un milieu qui utilise la réaction lysine-décarboxylase pour distinguer *Salmonella arizonae* et *Citrobacter*.

« Falkow » a développé plus tard le milieu lysine-décarboxylase pour distinguer les *Salmonelles* des *Shigelles* en utilisant les résultats fiables et valides.

Le BIS recommande ce milieu pour la détection de l'activité d'hydrolase ou décarboxylase de *Vibrio Cholerae*.

Les bactéries entériques fermentent le dexrose, ce qui entraîne un pH acide. Les bactéries qui produisent de la lysine, de l'ornithine ou de l'arginine fabriquent des produits alcalins qui augmentent le pH.

Après 24 à 96 heures, le résultat sera une réaction alcaline de couleur pourpre pour les bactéries produisant de la décarboxylase et un pH acide (jaune) pour les bactéries n'en produisant pas.

Pour éviter une fausse alcalinisation, les tubes inoculés doivent être protégés de l'air en recouvrant le milieu d'huile stérile. Inoculer des tubes de contrôle fabriqués à partir de milieux de base.

Seul l'isolement de cultures pures doit être utilisé pour les tests biochimiques.

Bien que les réactions de la décarboxylase puissent être indicatives d'un genre ou d'une espèce particulière, elles ne peuvent pas être utilisées pour déterminer l'identification définitive de ces organismes.

#### *b. Principe du test de la décarboxylase*

Le test de la décarboxylase est utilisé pour déterminer la production de décarboxylase et la décarboxylation des acides aminés chez les bactéries, en particulier dans la famille des espèces *Enterobacteriaceae*, ce test simple permet déterminer si une bactérie est capable de produire une d'hydrolase ou une décarboxylase. Ces enzymes sont utilisées pour éliminer le groupe carboxyle des acides aminés et former des amines.

Les décarboxylases sont utilisées pour éliminer les groupes carboxyles des acides aminés tels que la lysine et l'ornithine, tandis que la d'hydrolase est utilisée pour la décarboxylation de l'arginine, en plus de la décarboxylase.

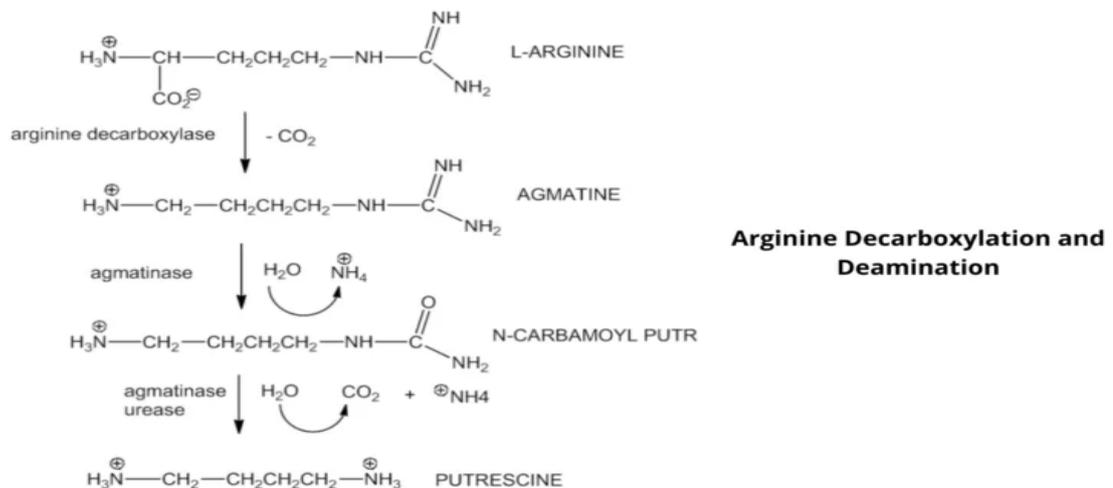
Le milieu de la décarboxylase est composé d'extrait de bœuf et de digestions peptiques de tissus animaux, qui fournissent des nutriments azotés aux organismes.

Le milieu contient du glucose, un hydrate de carbone fermentable.

Le violet de bromocrésol et le rouge de crésol sont des indicateurs de pH qui changent de couleur dans des conditions acides ou alcalines. Ils permettent de détecter la fermentation du glucose et la décarboxylation des acides aminés.

Le pyridoxal est le cofacteur de la décarboxylase. Pour favoriser la fermentation, la décarboxylation ou la dihydrolyation sont des processus anaérobies. Par conséquent, chaque tube est recouvert d'huiles minérales stériles pour protéger le milieu de l'oxygène.

L'ensemencement du milieu par une bactérie capable de fermenter le glucose produit de l'acide, ce qui entraîne une baisse du pH. L'indicateur de pH change également la couleur du milieu en jaune.



**Figure 13 :** *La décarboxylation de la lysine et ornithine et arginine (© 2023 Microbiologynote.com)*

*c. Objectif du test de la décarboxylase*

L'objectif de ce test est de savoir si cette bactérie est capable de synthétiser l'enzyme de décarboxylase. Ainsi, ce test permet de différencier entre les *Enterobacteriaceae* en fonction de leur pouvoir de production de cette enzyme : Déterminer si un organisme peut produire une enzyme décarboxylase, et distinguer les membres des *Enterobacteriaceae* en fonction de leur capacité à produire des enzymes décarboxylases.

*d. Milieux, réactifs et fournitures utilisées*

Milieu : Milieu de base pour le test de la décarboxylase. D'autres milieux comme le milieu Motilité-indole-ornithine (MIO) et la gélose à la lysine et au fer peuvent également être utilisés.

Réactifs utilisés : Huile minérale, Vaspar, paraffine liquide ou vaseline, maintenue à 56°C sous forme liquide.

Autres : Bâtonnets ou boucles d'inoculation stériles, incubateur à 35°C

**Tableau 7 : Composition de la base du milieu d'essai de la décarboxylase**

<b>Bouillon de base</b>	<b>(G/litre)</b>
<b>Peptone</b>	5 g
<b>Extrait de bœuf</b>	5 g
<b>Glucose</b>	0.5 g
<b>Pourpre de bromocrésol</b>	0.01 g
<b>Rouge de crésol</b>	0.005 g
<b>Pyridoxal</b>	0.005 g
<b>Eau distillée</b>	1 L

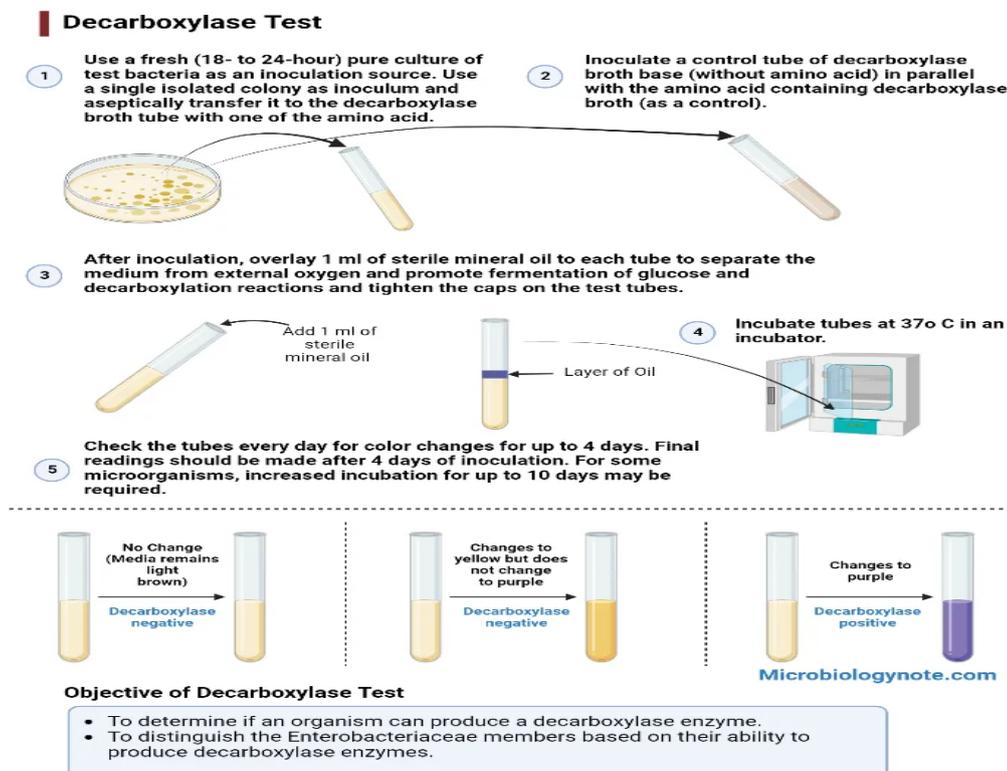
Préparer différents bouillons de décarboxylase avec l'un des trois acides aminés L suivants : Arginine 10g (1%) ; Lysine 20g (2%) et Ornithine 10g (1%).

*e. Préparation des milieux*

- Préparer d'abord le bouillon de base en faisant bouillir les six premiers ingrédients dans 1 litre d'eau distillée.
- La solution doit être chauffée doucement jusqu'à ce qu'elle soit complètement dissoute.
- Pour obtenir différents bouillons de décarboxylase, vous pouvez ajouter de là L'arginine, de la L-lysine ou de là L'ornithine.
- Mélanger les ingrédients en remuant fréquemment. Porter à ébullition.
- Ajuster le pH une fois-là L'ornithine ajoutée. Le pH final du milieu doit atteindre 6,0 + 0,02 à 25 °C.
- Pour une hauteur de colonne d'environ 3,5 cm, distribuer 5 ml dans des tubes à bouchon à vis (tubes de 12,5 cmx1,5 cm).
- Pendant 15 minutes à 15 pps, stériliser le milieu à 120 °C.
- Le bouillon préparé doit être de couleur brun clair. Il doit être conservé à 8 °C à l'abri de la lumière directe du soleil.

## f. Procédure du test de la décarboxylase

- Inoculation
- Comme source d'inoculation, utiliser une culture fraîche (18 à 24 heures) de la bactérie à tester.
- Transférer aseptiquement une colonie isolée dans le tube de bouillon de décarboxylase avec l'un des acides aminés.
- Inoculer un tube de bouillon de décarboxylase de contrôle (sans acide aminé) et le tube contenant le bouillon de décarboxylase (comme contrôle).
- Inoculer les tubes avec 1 ml d'huile stérile. Cela permet de séparer le milieu de l'oxygène. Elle favorisera la fermentation du glucose, les réactions de décarboxylation et scellera les bouchons des tubes à essai.



**Figure 14 :** Test de décarboxylase (© 2023 Microbiologynote.com)

## Incubation

- Incuber les tubes dans un incubateur à 37 °C.
- Pour que les changements de couleur durent jusqu'à quatre jours, veillez à vérifier les tubes chaque jour.

Après 4 jours d'inoculation, les lectures finales doivent être effectuées. Certains microorganismes peuvent nécessiter un temps d'incubation plus long, allant jusqu'à 10 jours.

## g. Interprétation des résultats du test de la décarboxylase

Pour détecter les signes de fermentation ou de décarboxylation, vérifier la couleur du milieu tous les jours pendant au moins 10 jours. Les milieux de base de Moeller non ensemencés et les milieux contenant un acide aminé sont brun clair.

**Test négatif à la décarboxylase :** Si la couleur du milieu ne change pas, cela signifie que l'organisme ne fermente pas le glucose.

**Test négatif à la décarboxylase :** Un milieu qui vire au jaune indique qu'il a fermenté le glucose. Cependant, l'organisme n'est pas positif à la décarboxylase (-) pour cet acide aminé. L'apparition d'un bouillon jaune indique une fermentation du glucose, mais pas une décarboxylation.

**Test positif à la décarboxylase :** Une couleur pourpre indique que le milieu a été décarboxylé et a formé des amines (sous-produits alcalins). C'est le signe que l'organisme est (+) pour l'acide aminé. Si le milieu ne vire pas au violet, cela signifie que l'acide aminé n'a pas encore été décarboxylé. L'organisme n'a pas non plus produit d'enzymes décarboxylases

**Tableau 8 :** Test de la décarboxylase

Couleur des médias	Réaction bactérienne
Pas de changement (le support reste brun clair)	Décarboxylase négative (-)
Passe au jaune mais ne passe pas au violet	Décarboxylase négative (-)
Passe au violet	Décarboxylase positive (+)



**Figure 15 :** Milieux décarboxylase avec *Klebsiella pneumoniae* (Source : [www.asm.org](http://www.asm.org))

Milieux décarboxylase de Moeller. A : Base non inoculée, B : Base inoculée avec *Klebsiella pneumoniae*, C : Bouillon d'arginine inoculé avec *K. pneumoniae*, D : Bouillon de lysine inoculé avec *K. pneumoniae*, E : Bouillon d'ornithine inoculé avec *K. pneumoniae*. La couleur violette dans le tube D indique que *K. pneumoniae* est positif à la lysine décarboxylase, tandis que la couleur jaune dans les tubes C et E (absence de couleur violette) indique qu'il est négatif à l'arginine et à l'ornithine décarboxylase.



**Figure 16 :** Milieux décarboxylase avec *Klebsiella oxytoca* (Source : [www.asm.org](http://www.asm.org))

Milieux décarboxylase de Moeller. A : Base non inoculée, B : Base inoculée avec *Klebsiella oxytoca*, C : Bouillon d'arginine inoculé avec *K. oxytoca*, D : Bouillon de lysine inoculé avec *K. oxytoca*, E : Bouillon d'ornithine inoculé avec *K. oxytoca*. La couleur violette dans le tube D indique que *K. oxytoca* est positif à la lysine décarboxylase, tandis que la couleur jaune dans les tubes C et E (absence de couleur violette) indique qu'il est négatif à l'arginine et à l'ornithine décarboxylase.



**Figure 17 :** Milieux décarboxylase *Enterobacter cloacae* (Source : [www.asm.org](http://www.asm.org))

Milieux décarboxylase de Moeller. A : Base non inoculée, B : Base inoculée avec *Enterobacter cloacae*, C : Bouillon d'arginine inoculé avec *E. cloacae*, D : Bouillon de lysine inoculé avec *E. cloacae*, E : Bouillon d'ornithine inoculé avec *E. cloacae*. La couleur violette dans les tubes C et E indique que *E. cloacae* est positif à l'arginine et à l'ornithine décarboxylase, tandis que la couleur jaune dans le tube D (absence de couleur violette) indique qu'il est négatif à la lysine décarboxylase.



**Figure 18 :** Milieux décarboxylase avec *E. coli* (Source : [www.asm.org](http://www.asm.org))

Milieux de décarboxylase de Moeller. A : Base non inoculée, B : Base inoculée avec *E. coli*, C : Bouillon d'arginine inoculé avec *E. coli*, D : Bouillon de lysine inoculé avec *E. coli*, E : Bouillon d'ornithine inoculé avec *E. coli*. La couleur violette dans les tubes C, D et E indique que cette souche d'*E. coli* est positive à l'arginine, à la lysine et à l'ornithine décarboxylase.

*h. Résultat du test de la décarboxylase pour certains organismes*

**Tableau 9 : Résultat du test de la décarboxylase**

Organisme testé	Test de décarboxylase de la lysine	Test de décarboxylation de l'arginine	Test de décarboxylase de l'ornithine
<i>Escherichia coli</i>	Résultat positif	Résultat positif	Résultat positif
<i>Enterobacter cloacae</i>	Résultat négatif	Résultat positif	Résultat positif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Résultat positif	Résultat négatif	Résultat négatif
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Résultat positif	Résultat négatif	Résultat négatif
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Résultat positif	Résultat négatif	Résultat positif
<i>Proteus vulgaris</i>	Résultat négatif	Résultat négatif	Résultat négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Résultat négatif	Résultat positif	Résultat négatif
<i>S. serotype typhi</i>	Résultat positif	Réaction positive retardée ou réaction négative, couleur jaune	Résultat négatif
<i>Serratia marcescens</i>	Résultat positif	Résultat négatif	Résultat positif
<i>Shigella flexneri</i>	Résultat négatif	Réaction positive retardée ou réaction négative, couleur jaune	Résultat négatif
<i>Vibrio cholerae</i>	Résultat négatif	Résultat positif	Résultat positif

*i. Précautions*

- Chaque isolat doit être inoculé dans un tube contenant un milieu de base sans acide aminé pour servir de contrôle de croissance ou de référence négative.
- Avant l'incubation, recouvrir le bouillon d'huile minérale stérile. Le milieu peut devenir alcalin à cause de l'exposition à l'air, ce qui entraîne des faux positifs.
- Les acides aminés ne sont pas les mêmes dans les différents bouillons. Veillez à les étiqueter afin de savoir quel acide aminé se trouve dans chaque tube.
- L'interprétation des tests doit se faire après au moins 24 heures d'incubation.
- Certains microorganismes peuvent nécessiter un temps d'incubation plus long, pouvant aller jusqu'à 10 jours ouvrables.

- En raison d'une stérilité incomplète, l'autoclavage de l'huile minérale ne doit pas être effectué. Il arrive que de l'eau/condensation soit introduite dans l'huile et que la vapeur ne pénètre pas aussi bien. C'est pourquoi la stérilité n'est pas toujours atteinte. Beaucoup recommandent de sécher de petites quantités de vapeur ou de filtrer de l'huile minérale réchauffée. Toutefois, l'autoclavage n'est pas recommandé. Des cas d'explosion de mélanges vapeur/huile ont été signalés.
- Deux milieux ont été utilisés pour différencier certains membres des *Enterobacteriaceae*. La LIA (Lysine Iron. Agar), utilisée pour distinguer les espèces de salmonelles, peut être utilisée. Elle détecte le sulfure d'hydrogène et la décarboxylation de la lysine. Le milieu MIO (Motilité, Indole Ornithine) a été recommandé pour tester la motilité, la production d'indole et l'activité ornithine-décarboxylase des bacilles entériques.

j. *Souches de contrôle*

- Positives :
  - Lysine : *Klebsiella pneumoniae*
  - Ornithine : *Enterobacter cloacae*
  - Arginine : *Enterobacter cloacae*
- Négatif :
  - Lysine : *Enterobacter cloacae*
  - Ornithine : *Klebsiella pneumoniae*
  - Arginine : *Klebsiella pneumoniae*

k. *Limites du test de la décarboxylase*

Avant l'incubation, l'interprétation du test doit être effectuée dans les 18 à 24 heures. Une interprétation plus précoce pourrait conduire à des résultats erronés. Une incubation de 10 à 12 heures est suffisante pour déclencher la fermentation du glucose. L'environnement acide créé par la fermentation entraîne la formation d'une couleur jaune. Une fois l'environnement acide établi, les enzymes décarboxylases ne peuvent plus être produites. Avant d'interpréter la réaction, agiter doucement le tube si deux couches de couleur apparaissent.

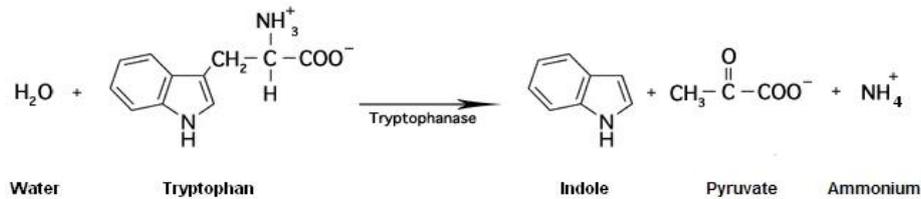
Les microorganismes qui ne fermentent pas le glucose peuvent présenter une faible activité décarboxylase, ce qui entraîne une production insuffisante des amines nécessaires à la conversion du système indicateur de pH. Toutefois, certains non-fermenteurs produiront suffisamment d'amines pour que la couleur pourpre du milieu de base soit plus intense que dans un tube non inoculé. Une couleur grise pourrait indiquer une diminution de l'indicateur plutôt qu'une production alcaline. Le violet de bromocrésol peut être utilisé pour faciliter l'interprétation de la réaction. Les bactéries non fermentaires doivent être positives à l'arginine et négatives à la lysine et à l'ornithine.

### II.2.1.6. Tests de désamination

#### II.2.1.6.1.1. D'indole (Michael *et al.*, 1982)

##### a. Principe

Le test d'indole détermine la capacité d'un organisme à produire de l'indole à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane. Le tryptophane est hydrolysé par la tryptophanase pour produire trois produits possibles : l'indole, pyruvate et l'ion ammonium



**Figure 19 : Principe de test d'indole**

##### b. Réaction du test d'indole

La détection de l'indole repose sur la réaction chimique entre l'indole et le réactif de Kovac (alcool isoamylique, para-Diméthylaminobenzaldéhyde, acide chlorhydrique concentré) dans des conditions acides :

- Le para-Diméthylaminobenzaldéhyde réagit avec l'indole présent dans le milieu pour former un colorant rouge rosindole.
- L'alcool isoamylique forme un complexe avec le colorant "rosindole", ce qui provoque sa précipitation. L'alcool restant et le précipité remontent alors à la surface du milieu.

##### c. Procédure et résultats

Deux méthodes sont décrites : Méthode en tube et conventionnelle qui identifie, après une incubation pendant une nuit, les organismes producteurs d'indole faibles.

Spot indole test : détecte les organismes producteurs rapides d'indole

#### 1- Méthode conventionnelle en tube :

La principale exigence pour un milieu de test d'indole approprié est qu'il contienne une quantité suffisante de tryptophane (Bouillon tryptone, milieu eau peptonée exempte d'indole, milieu Urée-indole, bouillon tryptophane peptonée, milieu de motilité sulfure-indole (SIM)...).

- Inoculer le bouillon tryptophane (ou peptone) avec l'organisme à tester et incuber à 37°C pendant 24 à 48h
- Ajouter 0,5 ml (5 gouttes) de réactif de « Kovác » et agiter doucement
- Examiner la couche supérieure de liquide après environ 1 min

**Résultat :** Un résultat positif est indiqué par la présence d'une couleur rouge ou rouge-violet dans la couche d'alcool de surface du bouillon. Un résultat négatif apparaît en jaune. Un résultat variable peut également se produire, affichant une couleur orange en conséquence. Cela est dû à la présence de skatole, également connu sous le nom de méthyl indole ou indole méthylé, un autre produit possible de dégradation du tryptophane.

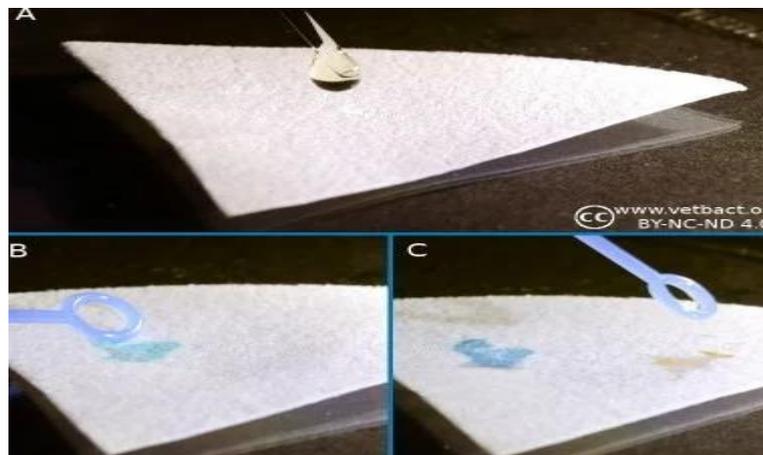


*Figure 20 : Test d'indole Positif et Négatif*

### 2-Spot test :

Placer plusieurs gouttes (1 -1,5 ml) de réactif Indole Spot (1% or 5% p-methylaminobenzaldehyde ou 1% p-dimethylaminocinnamaldhyde) sur un morceau de papier filtre.

Étaler une colonie pure isolée (à partir d'une culture de 18 à 24 heures) sur la surface saturée du papier filtre à l'aide d'une boucle stérile, puis examiner immédiatement



*Figure 21 : Indole Spot test*

**Résultat :** Selon le réactif utilisé pour le test spot indole, les couleurs résultantes diffèrent. Si vous utilisez du p-méthylaminobenzaldéhyde, la présence d'indole est indiquée par une couleur rouge et si vous utilisez du p-diméthylaminocinnamaldéhyde, une couleur bleu-vert est observée.

d. Test d'indole positif et négatif

**Tableau 10 :** Bactérie d'indole positif et négatif

Bactéries	Indole positif	Indole variable	Indole négatif
<i>Escherichia spp.</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia fergusonii</i>	/	<i>Escherichia albertii</i>
<i>Shigella spp.</i>	/	<i>Shigella boydii</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Salmonella spp.</i>	/	/	<i>Salmonella spp.</i>
<i>Klebsiella spp.</i>	<i>K. oxytoca</i>	/	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Raoultella spp.</i>	<i>R. ornithinolytica</i>	<i>R. planticola</i>	<i>R. terrigena</i>
<i>Serratia spp.</i>	/	<i>S. odorifera</i> biogroup 1, <i>S. odorifera</i> biogroup 2	<i>S. entomophila</i> , <i>S. ficaria</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. liquefaciens</i> group, <i>S. marcescens</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. rubidaea</i>
<i>Citrobacter spp.</i>	<i>C. amalonaticus</i> , <i>C. farmeri</i> , <i>C. koseri</i> , <i>C. murliniae</i> ,	<i>C. braakii</i> , <i>C. freundii</i> , <i>C. sedlakii</i> , <i>C. youngae</i>	<i>C. gillenii</i> , <i>C. werkmanii</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	/	/
<i>Proteus</i>	<i>P. hauseri</i> , <i>P. vulgaris</i>	/	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i>
<i>Providencia</i>	<i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. rustigianii</i> , <i>P. alcalifaciens</i>	/	<i>P. heimbachae</i>
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>	/	/
<i>Yersinia spp.</i>	/	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>
Bacilles à Gram négatif non fermentaire	<i>Elizabethkingia</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Balneatrix</i> , <i>Bergeyella</i> , <i>Empedobacter</i> , <i>Wautersiella</i> , <i>Weeksella</i>	/	<i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Pseudochrobactrum</i>
<i>Actinobacillus spp</i>	/	/	<i>A. lignieresii</i> , <i>A. equuli</i> , <i>A. suis</i> , <i>A. ureae</i> , <i>A. hominis</i>

<i>Actinobacillus spp</i>	/	/	<i>A. lignieresii</i> , <i>A. equuli</i> , <i>A. suis</i> , <i>A. ureae</i> , <i>A. hominis</i>
<i>Aggregatibacter spp</i>	/	/	<i>A.</i> <i>actinomycetemcomitans</i> , <i>A. aphrophilus</i> , <i>A. segnis</i>
<i>Capnocytophaga spp</i>	/	/	<i>C. ochracea</i> , <i>C. sputigena</i> , <i>C. gingivalis</i> , <i>C. granulosa</i> , <i>C. haemolytica</i> , <i>C. canimorsus</i> , <i>C. cynodegmi</i>
<i>Cardiobacterium spp</i>	<i>C. hominis</i> (faible)	<i>C. valvarum</i>	/
<i>Chromobacterium spp</i>	/	<i>C. violaceum</i>	<i>C. haemolyticum</i>
<i>Dysgonomonas spp</i>	<i>D. hofstadii</i> , <i>D. mossii</i>	<i>D.</i> <i>capnocytophagoides</i> , <i>D. gadei</i>	/
<i>Eikenella spp</i>	/	/	<i>E. corrodens</i> <i>K. kingae</i> , <i>K. denitrificans</i> , <i>K. negevensis</i> , <i>K. oralis</i> , <i>K. potus</i>
<i>Pasteurella spp</i>	<i>P. multocida</i> , <i>P. canis</i> , <i>P. dagmatis</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. stomatis</i>	/	/
<i>Streptobacillus spp</i>	/	/	<i>S. moniliformis</i>
<i>Suttonella spp</i>	<i>S. indologenes</i>	/	/
<i>Haemophilus influenzae</i>	Biotype I II V VII	/	Biotype III IV VI VIII
<i>Actinomyces spp.</i>	/	/	<i>Actinomyces spp.</i>
<i>Bacteroides spp.</i>	<i>B. ovatus</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i>	/	<i>B. fragilis</i> , <i>B. vulgatus</i>
<i>Fusobacterium spp.</i>	<i>F. necrophorum</i> , <i>F. nucleatum</i>	<i>F. varium</i>	<i>F. mortiferum</i>
<i>Clostridium spp.</i>	<i>C. sordellii</i> ,	<i>C. tetani</i>	<i>C. tertium</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. innocuum</i> , <i>Clostridium botulinum</i>

*e. Limites et conseils techniques*

- Le test en tube est plus sensible que le Spot test.
- Le réactif d'Ehrlich est un alternatif au réactif de « Kovács », Ehrlich est plus sensible alors que Kovács est plus stable
- Les milieux contenant du glucose ne doivent pas être utilisés pour les tests d'indole en raison de la formation de produits finaux acides qui réduisent la production d'indole.
- La Mueller Hinton Agar ne doit pas non plus être utilisée pour ce test car le tryptophane est détruit lors de l'hydrolyse acide de la caséine.
- Si un bouillon de peptone est utilisé à la place du bouillon de tryptophane, le lot doit être vérifié avec un contrôle positif. C'est parce qu'il existe des variétés de bouillons peptonés, et certaines ne conviennent pas à la production d'indole car elles contiennent trop peu de tryptophane.
- Les organismes à tester par la méthode spot indole doivent être prélevés dans un milieu contenant du tryptophane (par exemple de la gélose au sang) et jamais dans de la gélose MacConkey car ils ont des indicateurs de pH et une pigmentation de colonies lactose-positives qui rendront l'interprétation de la réaction colorée difficile.
- L'indole est un produit diffusible. Pour atténuer la diffusion de l'indole, sélectionnez une colonie bien isolée pour le test spot de l'indole.

**II.2.1.6.1.2. La phénylalanine désaminase (Tille et al., 2014)**

*a. Objectif*

Déterminer la capacité d'un organisme à désaminer par oxydation la phénylalanine en acide phénylpyruvique.

*b. Principe*

La gélose phénylalanine, également appelée milieu phénylalanine désaminase, contient des nutriments et de la DL-phénylalanine. La phénylalanine sert de substrat aux enzymes, qui sont capables de la désaminer pour former de l'acide phénylpyruvique. L'extrait de levure contenu dans le milieu favorise la croissance des organismes. Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique.

Les microorganismes qui produisent la phénylalanine désaminase éliminent l'amine ( $\text{NH}_2$ ) de la phénylalanine. La réaction aboutit à la production d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et d'acide phénylpyruvique. L'acide phénylpyruvique est détecté en ajoutant quelques gouttes de chlorure ferrique à 10 % qui agit comme un agent chélateur ; un complexe de couleur verte se forme entre ces deux composés, ce qui indique un test positif. Si le milieu reste de couleur paille, l'organisme est négatif pour la production de phénylalanine désaminase.

c. *Milieu :*

- Phénylalanine (2 g),  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (1 g), agar (12 g), par 1000 ml, pH 7,3.
- Extrait de levure (3 g),  $\text{NaCl}$  (5 g),

d. *Méthode*

- À l'aide d'une boulette d'inoculum provenant d'une culture pure de 18 à 24 heures, strier la surface de la lamelle en effectuant un mouvement de queue de poisson ou inoculer la lamelle de phénylalanine avec 1 goutte d'un bouillon d'infusion de cœur de cerveau de 24 heures.
- Incuber la lamelle inoculée en aérobiose à 35 °C pendant 18 à 24 heures.
- Après l'incubation, appliquer 4 à 5 gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 10 % directement sur la suspension.
- Agiter doucement le tube et observer l'apparition d'une couleur verte dans un délai de 1 à 5 minutes.

e. *Résultats attendus*

Positif : Une couleur verte se développe sur la lame après l'ajout de chlorure ferrique dans les 1 à 5 minutes suivant l'application du réactif de chlorure ferrique.

Négatif : Absence de réaction verte. Les résultats négatifs prennent une couleur jaune en raison de la couleur du chlorure ferrique.



**Figure 22 : Résultat de test phénylalanine désaminase**

*f. Utilisation*

Son utilisation est recommandée pour la différenciation des bacilles entériques gram-négatifs sur la base de la capacité des microorganismes à produire de l'acide phénylpyruvique par désamination oxydative. Les genres *Morganella*, *Proteus* et *Providencia* peuvent être différenciés des autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*.

*g. Limites*

Il est recommandé d'effectuer des tests biochimiques, immunologiques, moléculaires ou de spectrométrie de masse sur des colonies issues de cultures pures pour une identification complète.

La réaction colorée verte d'un test positif s'estompe rapidement. Les résultats du test doivent être interprétés dans les 5 minutes suivant l'application du chlorure ferrique, sous peine d'obtenir des résultats faussement négatifs.

**II.2.1.7. Tests de production d'enzymes**

**II.2.1.7.1.1. La production de H<sub>2</sub>S (Cappuccino *et al.*, 2008)**

*a. Objectifs*

Déterminer si le microbe réduit les composés contenant du soufre en sulfures pour produire du sulfure d'hydrogène.

*b. Principe*

Un composé de fer et un composé de soufre sont inclus dans le milieu d'essai pour tester la production de sulfure d'hydrogène.

Le sulfure d'hydrogène est produit si le composé soufré est réduit par la souche bactérienne. Ce test détermine donc si le microbe réduit les composés contenant du soufre en sulfures au cours du processus de métabolisation.

Le H<sub>2</sub>S est produit par certaines bactéries par réduction des acides aminés contenant du soufre, tels que la cystine et la méthionine, ou par réduction des composés sulfurés inorganiques, tels que les thiosulfates, les sulfates ou les sulfites, au cours de la dégradation des protéines ou lorsque la respiration anaérobie transfère les électrons vers le soufre plutôt que vers l'oxygène. Dans les deux cas, il y a production de H<sub>2</sub>S (sulfure d'hydrogène gazeux) qui réagit avec le composé de fer pour former le précipité noir de sulfure ferrique.

La couleur noire agit comme un indicateur de la présence de sulfure d'hydrogène. La détection du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) produit par un organisme est principalement utilisée pour faciliter l'identification de cet organisme particulier.

*c. Milieu*

Ce test peut être réalisé à l'aide de plusieurs milieux, notamment la gélose au fer à trois sucres (TSI), la gélose au fer de Kligler (KIA), le milieu SIM et le papier à l'acétate de plomb. Milieu de motilité indole au sulfite (SIM) pour la détection du H<sub>2</sub>S.

Ce milieu contient du sulfate d'ammonium ferreux et du thiosulfate de sodium, qui servent alors d'indicateurs pour la production de sulfure d'hydrogène. La production de sulfure d'hydrogène peut être détectée lorsque le sulfure ferreux, un précipité noir, est produit à la suite de la réaction du sulfate d'ammonium ferreux avec le gaz H<sub>2</sub>S.

*d. Composition*

Extrait de bœuf 3,0 g Peptone 30,0 g Sulfate d'ammonium ferreux 0,2 g Thiosulfate de sodium 0,025 g Agar 3,0 g pH final (à 25°C) 7,3±0,2 Eau distillée 1000ml

Géloses au fer pour la détection du H<sub>2</sub>S

Ce milieu permet de détecter la production de H<sub>2</sub>S par les *entérobactéries*. Le H<sub>2</sub>S est détecté par le citrate ferrique contenu dans le milieu. Test papier à l'acétate de plomb pour détecter le H<sub>2</sub>S

Lorsqu'une technique sensible de détection de la production de H<sub>2</sub>S est nécessaire, le test du papier acétate de plomb est recommandé.

*e. Procédure*

I. Dans le milieu de motilité indole au sulfite (SIM)

- Inoculer l'organisme dans un tube étiqueté à l'aide d'un couteau.
- Incuber les tubes inoculés à 37°C pendant 24-48 heures.
- Observer la formation d'un précipité noir sur le milieu.

II. Dans la gélose au fer de Kligler (KIA) et la gélose au fer à trois sucres (TSIA)

- Inoculer l'organisme testé dans la KIA et incuber à la température appropriée pendant la nuit.
- Observer si le milieu noircit.

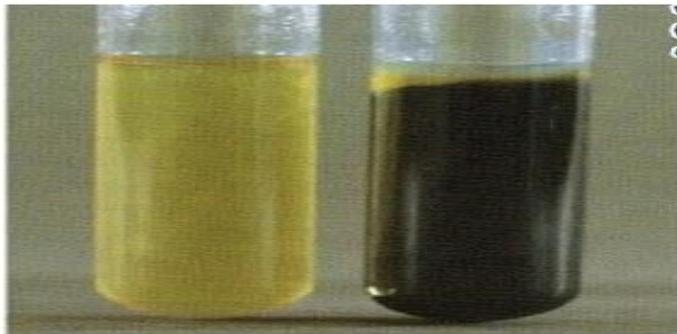
### III. Test du papier à l'acétate de plomb

- Inoculer l'organisme testé dans un tube ou un flacon d'eau peptonée stérile ou de bouillon nutritif.
- Insérer une bande de papier d'acétate de plomb dans le col du flacon ou du tube, au-dessus du milieu, et bien boucher.
- Incuber le milieu inoculé à 35-37 °C et examiner quotidiennement si la partie inférieure de la bande noircit.

#### f. Résultats

**Résultat positif :** noircissement sur le support

**Résultat négatif :** pas de noircissement sur le support



**Figure 23 :** Résultats du test de la production de H<sub>2</sub>S

#### g. Utilisations

Ce test est principalement utilisé pour faciliter l'identification des membres de la famille des *Enterobacteriaceae* et, occasionnellement, pour différencier d'autres bactéries telles que *Bacteroides* et *Brucella* spp. Le test permet d'identifier et de différencier les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (entériques) des autres bacilles Gram. Il est particulièrement utile pour identifier les espèces *Salmonella*, *Francisella* et *Proteus*.

#### h. Limites

La production de H<sub>2</sub>S peut être inhibée par le TSI pour les organismes qui utilisent le saccharose et suppriment le mécanisme enzymatique qui aboutit à la production de H<sub>2</sub>S.

L'acétate de plomb est toxique pour les bactéries et peut inhiber la croissance de certaines d'entre elles. Ne pas laisser le milieu toucher la bandelette.

Il est recommandé d'effectuer des tests biochimiques, immunologiques, moléculaires ou de spectrométrie de masse sur des colonies issues de cultures pures pour une identification complète.

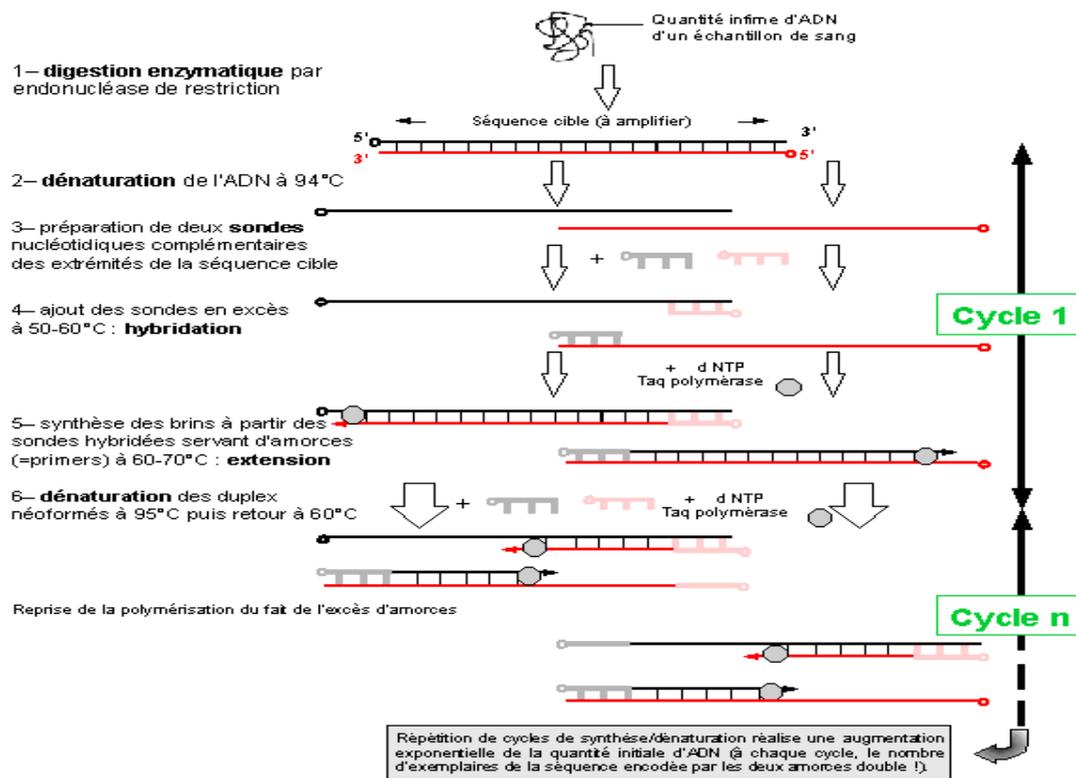
## II.2.2. Tests biochimiques rapides

### II.2.2.1. PCR (Réaction de polymérisation en chaîne)

La PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) est une technique biochimique rapide qui permet de copier rapidement et efficacement de l'ADN. Cette méthode permet d'amplifier des fragments spécifiques d'ADN en utilisant des amorces qui sont complémentaires à des régions spécifiques de l'ADN. La PCR est largement utilisée en recherche, en médecine et dans de nombreux autres domaines. Elle peut être utilisée pour détecter des maladies infectieuses, identifier des marqueurs génétiques associés à des maladies héréditaires et même pour la recherche de la présence de matériel génétique dans les aliments (**Kumar., et al 2017**).

La PCR est un outil très puissant pour la détection de microorganismes pathogènes car elle permet une amplification rapide et spécifique de l'ADN. La PCR en temps réel (RT-PCR) permet également de quantifier l'ADN amplifié en temps réel, ce qui facilite la détection et la quantification des microorganismes pathogènes. Cette technique est utilisée pour le diagnostic de nombreuses maladies infectieuses, telles que la COVID-19, le VIH et l'hépatite C (**Kumar., et al 2017**).

La PCR est également utilisée pour la génétique moléculaire et la recherche. Cette technique permet de cloner rapidement des fragments d'ADN spécifiques, ce qui est utile pour la production de protéines recombinantes, l'étude de la fonction des gènes et la manipulation génétique (**Kumar., et al 2017**).



**Figure 24 : Schéma de la méthode PCR**

### II.2.2.2. MALDI-TOF MS (Spectrométrie de masse par ionisation/désorption laser assistée par matrice)

La spectrométrie de masse par ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) est une méthode de diagnostic rapide qui permet l'identification de microorganismes à l'aide de leur profil protéique. Cette méthode consiste à ioniser les protéines présentes dans l'échantillon à analyser à l'aide d'un laser et à les séparer en fonction de leur rapport masse/charge en utilisant un champ électrique. Les protéines ainsi séparées sont détectées et leur spectre de masse est enregistré. Ce spectre est ensuite comparé à une base de données de spectres de masse de référence pour identifier l'espèce bactérienne présente dans l'échantillon (Ferroni., *et al* 2019).

La méthode MALDI-TOF MS offre plusieurs avantages par rapport aux méthodes conventionnelles d'identification bactérienne, notamment sa rapidité (les résultats peuvent être obtenus en quelques minutes), sa sensibilité (elle permet de détecter des quantités très faibles de micro-organismes) et sa spécificité (elle permet de distinguer les espèces bactériennes les plus proches les unes d'autres). De plus, elle est facile à mettre en œuvre et ne nécessite pas de formation poussée en microbiologie (Ferroni., *et al* 2019).

La méthode MALDI-TOF MS est aujourd'hui largement utilisée en microbiologie clinique pour l'identification des bactéries responsables d'infections. Elle permet notamment une identification rapide et précise des bactéries impliquées dans les infections nosocomiales, qui sont souvent résistantes aux antibiotiques. Elle est également utilisée en recherche microbiologique pour l'étude de la diversité bactérienne dans différents milieux (Ferroni, et al 2019).

*a. Utilisations idéales de MALDI*

- Mesures précises du poids moléculaire
  - Identification de l'échantillon
  - Détermination de la pureté d'un échantillon
  - Vérification des substitutions d'acides aminés
  - Vérification des modifications post-traductionnelles
- Suivi de la réaction
  - Réactions enzymatiques
  - Modification chimique
  - Digestion des protéines
- Séquençage d'acides aminés et d'oligonucléotides
  - Confirmation de la séquence d'acides aminés
  - Caractérisation de novo de peptides
  - Identification de protéines par recherche dans une base de données avec une séquence "étiquette" d'un fragment protéolytique
  - Caractérisation ou contrôle de la qualité des oligonucléotides
- Structure protéique
  - Repliement des protéines surveillé par échange H / D
  - Formation du complexe protéine-ligand sous conditions physiologiques
  - Détermination de la structure macromoléculaire
- Identification bactérienne et fongique
  - Identification des isolats bactériens et fongiques
- Distribution spatiale des composés au sein de tissus biologiques ou non biologique les systèmes

*b. Nos points forts*

- Précision rapide, sensible, de masse élevée, débit élevé

c. *Limites*

- L'ionisation douce ne convient pas à toutes les molécules. Discrimination de masse pour les polymères à polydispersité large

d. *Spécifications techniques MALDI*

- Informations obtenues :
  - Composition, poids moléculaire et informations structurelles sur les composants individuels
  - Qualitatif et (semi- quantitatif)
- Échantillon type : Solide ou liquide (dissous dans des tampons aqueux ou des solvants tel que DMF ou DCM)
- Gamme de masse : 50 - 100000 g / mol
- Précision de masse :
  - 0.1% (1000 ppm) pour les masses
  - > 4000 g / mol
  - 0.005% (50 ppm) ou mieux pour les masses
  - <4000 g / mol
  - $50 \times 10^{-3}$  g / mol en mode MS / MS
- Sensibilité de masse : Compound et matrice dépendante
- Résolution latérale (imagerie) : 20 x 20 um

**II.2.2.3. VITEK® 2 (système automatisé d'identification et de susceptibilité aux antimicrobiens)**

Le système automatisé VITEK® 2 est une technologie de diagnostic rapide pour l'identification des microorganismes et la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques. Il s'agit d'un système fermé et automatisé qui utilise des cartouches de test pour analyser les échantillons cliniques et fournir des résultats en quelques heures. Le système VITEK® 2 utilise des techniques telles que la turbidimétrie, la fluorimétrie et la colorimétrie pour mesurer la croissance bactérienne et les changements biochimiques en réponse aux antimicrobiens. Les résultats sont interprétés automatiquement et présentés sous forme de profil de sensibilité aux antibiotiques, facilitant ainsi la prise de décision thérapeutique (**Patel et al., 2014 ; Avni et al., 2013**).

Plusieurs études ont montré la précision et la fiabilité du système VITEK® 2 pour l'identification et la sensibilité aux antibiotiques de différents micro-organismes. Par exemple, une étude menée par Patel et al. A comparé les résultats de VITEK® avec ceux d'une méthode de référence pour l'identification et la sensibilité aux antibiotiques de plus de 2 000 souches

bactériennes. Les auteurs ont constaté que le système VITEK® avait une sensibilité et une spécificité globales supérieures à 90 % pour l'identification et la sensibilité aux antibiotiques thérapeutique (Patel *et al.*, 2014 ; Avni *et al.*, 2013).

Une autre étude menée par (Avni., *et al* 2014) A évalué la performance de VITEK® pour l'identification et la sensibilité aux antibiotiques de microorganismes isolés de patients atteints d'infections nosocomiales. Les auteurs ont constaté que le système VITEK® avait une concordance globale de 97,5% pour l'identification et la sensibilité aux antibiotiques thérapeutique (Patel *et al.*, 2014 ; Avni *et al.*, 2013).

En outre, l'utilisation de VITEK® peut entraîner une réduction significative du temps de diagnostic et de la durée de l'hospitalisation, ainsi qu'une réduction des coûts de traitement des infections. Cependant, il est important de noter que comme pour toute technologie de diagnostic, des erreurs peuvent survenir et il est donc important de considérer les résultats de VITEK® en conjonction avec d'autres informations cliniques thérapeutique (Patel *et al.*, 2014 ; Avni *et al.*, 2013).



Les cartes jetables et unitaires permettent d'identifier rapidement et précisément plus de 350 espèces de bactéries et de levures cliniquement pertinentes. Elles sont destinées à être utilisées avec les instruments VITEK®. Identification à partir de deux heures Carte sécurisée : le système jetable scellé et prêt à l'emploi ne nécessite aucun ajout de réactif (Biomerieux.,2022)

**Figure 25 : Cartes d'identification VITEK®**

#### **II.2.2.4. BD Phoenix™ (système automatisé d'identification et de susceptibilité aux antimicrobiens)**

Le système BD Phoenix™ est un autre exemple de système automatisé pour l'identification et la susceptibilité aux antimicrobiens. Il utilise des cartouches en plastique contenant des puits

de culture et des agents antimicrobiens pour déterminer la sensibilité d'un micro-organisme aux antibiotiques. Le système est capable d'identifier un large éventail de bactéries et de champignons, y compris les souches à Gram positif et négatif, et fournit des résultats de susceptibilité dans un délai de 4 à 6 heures (**Patel, et al 2004 ; Christensen, et al 2007 ; Nguyen, et al 2006**).

Le BD Phoenix™ est également équipé de la technologie Smart Cycler pour surveiller la croissance microbienne et la turbidité, ce qui permet une détection plus rapide des microorganismes résistants aux antimicrobiens. Il peut également être utilisé pour des tests d'identification plus spécifiques, tels que la détection de mécanismes de résistance aux antibiotiques (**Patel, et al 2004 ; Christensen, et al 2007 ; Nguyen, et al 2006**).

Le système BD Phoenix™ a été évalué dans plusieurs études et a montré des performances globalement satisfaisantes en termes d'identification et de susceptibilité aux antimicrobiens. Par exemple, une étude menée par Patel et al. A comparé les performances du BD Phoenix™ avec celles de deux autres systèmes automatisés (VITEK 2 et Micro Scan) et a conclu que le BD Phoenix™ avait une sensibilité et une spécificité globales similaires pour l'identification et la susceptibilité aux antimicrobiens des bactéries à Gram négatif (**Patel, et al 2004 ; Christensen, et al 2007 ; Nguyen, et al 2006**).

#### II.2.2.5. PCR en temps réel

La PCR en temps réel (qPCR) est une méthode de détection de l'ADN basée sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) classique, mais avec la capacité de quantifier les produits de PCR en temps réel. Cette technique a révolutionné la détection et la quantification de l'ADN dans de nombreux domaines, y compris la microbiologie. La qPCR permet de détecter et de quantifier des pathogènes dans des échantillons cliniques avec une grande sensibilité et spécificité, et a donc trouvé une utilisation courante en diagnostic clinique (**Bustin, et al 2009**).

Les avantages de la qPCR par rapport à d'autres méthodes de détection de pathogènes incluent sa rapidité, sa sensibilité et sa spécificité. En outre, la qPCR peut être utilisée pour détecter plusieurs pathogènes en même temps dans un seul échantillon, ce qui permet de gagner du temps et de réduire les coûts. La qPCR a également l'avantage d'être plus facile à automatiser, ce qui permet une analyse de haut débit (**Taylor, et al 2015**).

La qPCR est également largement utilisée en recherche fondamentale pour étudier l'expression des gènes et les voies de signalisation cellulaires. Cette technique permet de quantifier avec précision les niveaux d'ARNm dans les cellules et les tissus, ce qui est essentiel pour comprendre la régulation de l'expression des gènes et l'identification de nouveaux médicaments (**Derveaux, et al 2010**).

En termes de technologie, il existe plusieurs plates-formes commerciales pour la qPCR, telles que le système « Roche LightCycler », le système « Bio-Rad CFX », le système « Applied Biosystems QuantStudio », et le système « Qiagen Rotor-Gene ». Les choix de plates-formes dépendent des besoins de l'utilisateur, du nombre d'échantillons à traiter et des budgets disponibles (Hellemans., *et al* 2007).

#### II.2.2.6. Amplification isotherme médiée par boucle (LAMP)

L'amplification isotherme médiée par boucle (LAMP) est une méthode de détection de l'ADN (Notomi., *et al* 2000). Cette méthode utilise des amorces spécifiques pour amplifier l'ADN à une température constante, généralement entre 60°C et 65°C, ce qui élimine le besoin d'une étape de dénaturation. L'amplification se produit par une série de réactions de bouclage qui produisent une grande quantité d'ADN amplifié en quelques minutes.

L'un des avantages de la LAMP est qu'elle peut être utilisée avec des échantillons bruts, sans purification de l'ADN, ce qui peut réduire le temps et les coûts associés aux tests de détection de pathogènes (Mori., *et al* 2013). De plus, la méthode peut être utilisée pour la détection de plusieurs pathogènes simultanément en utilisant des amorces spécifiques à chaque pathogène (Poon., *et al* 2006).

Les applications de la LAMP comprennent la détection de pathogènes dans les échantillons cliniques, tels que la tuberculose, le VIH, la dengue et le paludisme, ainsi que la surveillance environnementale pour la détection de pathogènes dans l'eau, le sol et les aliments (Parida., *et al* 2008 ; Yamazaki., *et al* 2009).

Plusieurs variations de la LAMP ont été développées pour améliorer la sensibilité, la spécificité et la rapidité de la méthode. Par exemple, la LAMP avec des amorces spécifiques pour la région de séquence interne transcrit (ITS) a été utilisée pour l'identification de champignons (Tomlinson., *et al* 2010). et la LAMP avec des amorces pour les régions du génome de l'ARN ribosomal a été utilisée pour la détection de bactéries pathogènes (Wong., *et al* 2012).

#### II.2.2.7. Biosensors (biocapteurs)

Les biosensors, également appelés biocapteurs, sont des dispositifs analytiques qui combinent un élément biologique spécifique, tel qu'une enzyme, un anticorps ou un récepteur, avec un élément de transduction de signal, tel qu'un transducteur électrochimique ou optique, pour détecter et quantifier des substances biologiques ou chimiques dans un échantillon (Turner., *et al* 2013).

Les biocapteurs ont de nombreuses applications dans divers domaines, tels que la médecine, la surveillance environnementale, l'agriculture et l'industrie alimentaire. Par exemple, les biocapteurs peuvent être utilisés pour détecter des marqueurs biologiques spécifiques dans les échantillons de sang pour le diagnostic de maladies, tels que le diabète, le cancer et les maladies cardiovasculaires (Marathe., *et al* 2019 ; Sun., *et al* 2019). Ils peuvent également être utilisés pour détecter des pathogènes dans les échantillons alimentaires, tels que la *salmonelle* et *E. coli*, pour garantir la sécurité alimentaire (Zhang., *et al* 2018). En outre, les biocapteurs peuvent être utilisés pour détecter des contaminants environnementaux, tels que les métaux lourds et les pesticides, dans l'eau, le sol et l'air (Mishra., *et al* 2020).

Les biocapteurs peuvent être classés en fonction du type d'élément biologique utilisé, tel que les enzymes, les anticorps, les cellules, les acides nucléiques et les organismes entiers. Par exemple, les biocapteurs enzymatiques utilisent des enzymes immobilisées pour catalyser une réaction spécifique et produire un signal détectable, tandis que les biocapteurs à base d'anticorps utilisent des anticorps immobilisés pour reconnaître spécifiquement les cibles d'intérêt (Singh., *et al* 2021).

Les biocapteurs ont plusieurs avantages par rapport aux méthodes de détection conventionnelles, tels que la rapidité, la sensibilité, la spécificité et la facilité d'utilisation. Cependant, il y a encore des défis à relever pour améliorer la performance des biocapteurs, tels que la stabilité de l'élément biologique, la spécificité de la réaction et la miniaturisation des dispositifs (Krishnan., *et al* 2021).

## Partie III. **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

### III.1. Conclusion

En conclusion, l'identification microbiologique est cruciale pour comprendre les microbes et leurs effets sur la santé humaine, l'agriculture et l'environnement. L'utilisation des tests biochimiques conventionnels, largement utilisés depuis des décennies pour caractériser les microorganismes, est une composante des méthodes traditionnelles d'identification microbiologique. Cependant, ces techniques peuvent prendre du temps et être laborieuses.

Les progrès technologiques ont conduit au développement de nouvelles méthodes plus rapides et plus précises pour l'identification des microorganismes, notamment la PCR, la SM MALDI-TOF, le VITEK® 2, le BD Phoenix TM, la PCR en temps réel, l'amplification isotherme en boucle et les biocapteurs. La vitesse, la sensibilité, la spécificité et le coût de ces méthodes sont tous nettement meilleurs que ceux des méthodes traditionnelles.

Ces méthodes rapides ont cependant leurs limites, notamment en ce qui concerne les coûts initiaux d'achat et de formation, la complexité et la nécessité de connaissances spécialisées pour interpréter les résultats. Les méthodes rapides peuvent également ne pas être suffisamment sensibles pour détecter certains types de microorganismes, et elles peuvent produire des faux positifs ou négatifs.

Compte tenu de l'objectif de l'analyse et des types de microorganismes, il est important de sélectionner la technique d'identification la plus appropriée. Pour obtenir des résultats plus précis et fiables, une combinaison de méthodes traditionnelles et rapides peut être utilisée.

## Partie IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Anderson DJ**, Weber DJ, Rutala WA. Infectious diseases epidemiology. In : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th Ed. Philadelphia, PA : Elsevier ; 2020.

**Avni T**, et al. Performance of the Vitek 2 system in the rapid identification and susceptibility testing of gram-negative bacteria from bloodstream infections. *Int J Infect Dis.* 2013 Oct;17(10):e858-6. <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/vitek-2-cartes-identification>

**Baron, E., and S. Finegold.** 1990. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 8th ed. The Mosby Company, St. Louis, MO.

**Bartelt, M.** 2000. Diagnostic bacteriology, a study guide. F. A. Davis Co., Philadelphia, PA.

**Batista-García, R. A., Hernández-Cortés, G., & Rodríguez-Herrera, R.** (2015). Microbial identification : the state of the art through the biochemistry lens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 563-604. Doi : 10.1128/MMBR.00010-15

**Bermejo F**, Boixeda D, Gisbert JP, Sanz JM, Defarges V, Alvarez Calatayud G, Martín de Argila C. *Gastroenterol Hepatol.* 2000 Jun-Jul ;23(6) :269-74. **Site** : <https://microbiologyinfo.com/urease-test-principle-media-procedure-and-result/>

**Blair, J., E. Lennette, and J. Truant.** 1970. Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC.

**Brooks GF**, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 28th ed. New York, NY : McGraw Hill Education ; 2019.

**Bustin SA, Benes V, Garson JA**, et al. The MIQE guidelines : minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr ;55(4) :611-22.

Cappuccino J.G. and Sherman N. 2008. Microbiology : A Laboratory Manual, 8th ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA, USA. Site : <https://microbiologyinfo.com/hydrogen-sulfide-test/>

**Chow CK, Lock K, Teo K**, et al. Environmental and societal influences acting on cardiovascular risk factors and disease at a population level : a review. *Int J Epidemiol.* 2009 ;38(6) :1580-1594. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp193>

**Christensen PA**, et al. Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and enterococci. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):2072-7.

**Clarke, H., and S. T. Cowan.** 1952. Biochemical methods for bacteriology. *J. Gen. Microbiol.* 6:187–197.

**Cowan, S. T., & Steel, K. J.** (1993). Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press.

**Cowan, S. T., and K. J. Steel.** 1965. Identification of medical bacteria. University Press, Cambridge, MA.

**Cowan, S., and K. Steele.** 1965. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, New York, NY.

**Derveaux S, Vandesomepele J, Hellemans J.** How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 2010 Apr ;50(4) :227-30.

**Doern GV.** Antimicrobial susceptibility testing : special needs for fastidious organisms and difficult-to-detect resistance mechanisms. In : Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2011.

**Duke, P. B., and J. D. Jarvis.** 1972. The catalase test—a cautionary tale. *J. Med. Lab Technol.* 29(2):203–204.

**Dunbar, J., Ticknor, L. O., & Kuske, C. R.** (2000). Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2943-2950. Doi : 10.1128/AEM.66.6.2943-2950.2000

**Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C.** Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*. 1997 ;315(7109) :629-634. <https://doi.org/10.1136/bmj.315.7109.629>

**Ferroni, A., & Suarez, S.** (2019). La spectrométrie de masse MALDI-TOF : principes, applications et perspectives. *Journal de Mycologie Médicale*, 29(1), 14-23. [\\*https://www.eurofins.fr/materials-and-engineering-sciences/nos-techniques/maldi/](https://www.eurofins.fr/materials-and-engineering-sciences/nos-techniques/maldi/)

**Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS.** *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 14th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier; 2014.

**Forbes, B. A., D. F. Sahm, and A. S. Weissfeld.** 2007. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby Company, St. Louis, MO.

**Gagnon, M., W. Hunting, and W. B. Esselen.** 1959. A new method for catalase determination. *Anal. Chem.* 31:144.

**Giraldo, A., & García-García, R.** (2019). Current challenges in the identification of microorganisms in infectious diseases. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 37(9), 607-613. Doi : 10.1016/j.eimc.2018.06.010

**Haramoto, E., Katayama, H., & Oguma, K.** (2016). Detection of human enteric viruses in reclaimed water and air samples by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4299-4306. Doi : 10.1128/AEM.00670-16

**Havelaar AH**, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, Praet N, Bellinger DC, de Silva NR, Gargouri N, Speybroeck N, Cawthorne A, Mathers C, Stein C, Angulo FJ, Devleesschauwer B ; World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* 2015 Dec 3 ;12(12) : e1001923. Doi : 10.1371/journal.pmed.1001923.

**Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesomepele J.** qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007 ;8(2) : R19.

**Higgins JP, Green S.** *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions.* John Wiley & Sons, 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470712184>

**Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T.** (Eds.). (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology.* Lippincott Williams & Wilkins.

**Hugh, R., and E. Leifson.** 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. *J. Bacteriol.* 66 :24–26.

**Jüni P, Witschi A, Bloch R, Egger M.** The hazards of scoring the quality of clinical trials for meta-analysis. *Jama.* 1999 ;282(11) :1054-1060. <https://doi.org/10.1001/jama.282.11.1054>

**Kahlmeter, G.** (2014). The 2014 Garrod Lecture : EUCAST—Are we heading towards international agreement ? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(11), 2877-2889. Doi : 10.1093/jac/dku304

**Koneman EW**, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 6th ed. Philadelphia, PA : Lippincott Williams & Wilkins ; 2006.

**Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn Jr, W. C.** (2006). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.* Lippincott Williams & Wilkins.

**Krishnan, S., & Mani, V.** (2021). Biosensors and their applications : a review. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 17(1), 1-15.

**Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K.** (2017). MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549. **Figure :** <http://aces.ens-lyon.fr/biotic/biomol/techgen/html/schempr.htm>

**Leber, Amy L.,** editor in chief. (2016). *Clinical microbiology procedures handbook* (Fourth edition). Washington, DC : ASM Press 1752 N St., N.W., [2016] **Site :** *Microbe Notes.* (2020). Oxidase Test- Principe, procédure et interprétation des résultats. <https://microbenotes.com/oxidase-test/>

**Leboffe, M., and B. Pierce.** 2006. *Microbiology laboratory theory and application*, 2nd ed. Morton Publishing Company, Englewood, CO.

- Li DW, Kendrick B.** Biodeterioration of stone in tropical environments : an overview. *Biodeterioration and Biodegradation*. 1995 ;31 :135-152. Doi : 10.1016/0964-8305(95)00047-3.
- MacFaddin, J. F.** 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- MacFaddin, J. F.** 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd ed. Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Mahon, C. R., D. C. Lehman, and G. Manuselis.** 2011. *Textbook of diagnostic microbiology*, 4th ed. W. B Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Marathe, S. A., & Singh, R. P.** (2019). Development of biosensors for clinical diagnostics : recent advances and challenges. *Bioengineering*, 6(4), 94.
- McLeod, J. W., and J. Gordon.** 1923. Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria: with a scheme for classification based on these properties. *J. Pathol. Bacteriol.* **26**:326–331.
- MICHAEL MILLER Spot Indole Test :** Evaluation of Four Reagents 1982 Apr ;15(4) :589-92. Doi : 10.1128/jcm.15.4.589-592.1982. **Site :** <https://microbiologie-clinique.com/test-indole.html>
- Miettinen IT, Zacheus OM.** Methodologies for evaluating microbiological water quality : a review. *Journal of Environmental Monitoring*. 2007 ;9(12) :1203-1214.
- Mishra, R. K., Kumar, A., & Kumar, P.** (2020). Recent advances in biosensors for environmental monitoring : a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(6), 104278.
- Møller, J. K., & Uldum, S. A.** (2013). Epidemiology of human *Campylobacteriosis*. In *Campylobacter Ecology and Evolution* (pp. 99-121). Caister Academic Press.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., et al.** (2013). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(4), 817-822.
- Murray, Baron, Pfaller, Tenorev and Tenover:** *Manual of clinical Microbiology* (1999) , 7th Edition. **Site :** <https://docplayer.fr/34882352-Enteropluri-test-systeme-pour-l-identification-des-Enterobacteriaceae-et-d-autres-bacteries-a-gram-negatif-oxydases-negatives.html>
- Nguyen MH, et al.** Performance of the BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2006 Jan ;44(1) :200-3.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., et al.** (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63.

- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., et al.** (2008). Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 365-367.
- Patel R,** et al. Comparative evaluation of three automated systems for susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan ;42(1) :431-4.
- Patel R,** et al. Performance of the VITEK 2 Compact and VITEK 2 Systems for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Enterobacteriaceae* with Varying Susceptibility Mechanisms. *J Clin Microbiol.* 2014 Aug ;52(8) :2729-37.
- Patel R.** Biochemical and molecular methods for the diagnosis of infectious diseases. In : Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman-Cecil Medicine*. 26th ed. Philadelphia, PA : Elsevier Saunders ; 2020.
- Poon, L. L. M., Wong, B. W. Y., Ma, E. H. T., et al.** (2006). Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria : detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clinical Chemistry*, 52(2), 303-306.
- Rantsiou K,** Kathariou S, Winkworth CL, Skandamis PN. Biopreservation : History, Applications, Perspectives. In : Gänzle MG, editor. *Microbial Food Safety : Current Challenges and Future Directions*. Cham (CH) : Springer ; 2019. Chapter 5.
- Roxby, S., and C. Hopper.** BMB 305 manual for media and reagent preparation notes. University of Maine, Department of Biochemistry Microbiology and Molecular Biology, Orono, ME.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O,** van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency : linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009 Mar ;37(6) : e45. Doi : 10.1093/nar/gkp045. Epub 2009 Feb 12. PMID : 19208673 ; PMCID : PMC2665237.
- Sandhu G,** Kline BC, Stockmann C. The Role of Clinical Microbiology Laboratories in the Diagnosis of Infectious Diseases. *Mayo Clin Proc.* 2017 Dec ;92(12):1853-1867. Doi : 10.1016/j.mayocp.2017.06.026.
- Singh, R., & Pundir, C. S.** (2021). An overview on biosensors technology : principles, applications, and futurs prospects. In *Biosensors Technology* (pp. 3-34). Springer, Singapore.
- South Bend Medical Foundation.** 2010. Catalase test protocol. South Bend Medical Foundation, South Bend, IN.
- Sun, X., Jiang, X., & Yang, Y.** (2019). Advances in the development of biosensors for the detection of tumor markers. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33(9), e22959.

- Taylor SC, Carbonneau J, Shelton DN, Boivin G.** Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR : Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *J Virol Methods*. 2015 Sep 1 ;222 :1-9.
- Taylor, W. I., and D. Achanzar.** 1972. Catalase test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *J. Appl. Microbiol.* **24**:58–61.
- Thomas, M.** 1963. A blue peroxide slide catalase test. *Mon. Bull. Min. Health* **22**:124–125.
- Tille, P. M., & Forbes, B. A.** (2014). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (Thirteenth edition.). St. Louis, Missouri : Elsevier. **Site** : *Microbe Notes*. (2020). <https://microbenotes.com/nitrate-reduction-test-objectives-principle-procedure-and-results/>
- Tille, P. M., & Forbes, B. A.** (2014). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (Thirteenth edition.). St. Louis, Missouri : Elsevier. **Site** : <https://microbiologynote.com/decarboxylase-test/>
- Tille, P. M., & Forbes, B. A.** (2014). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (Thirteenth edition.). St. Louis, Missouri : Elsevier. **Site** : <https://microbiologyinfo.com/phenylalanine-agar-test/>
- Tomlinson, J. A., Boonham, N., Dickinson, M., et al.** (2010). Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology*, 51(6), 650-657.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL.** *Microbiology : An Introduction*. 13th ed. San Francisco, CA : Pearson Education ; 2019.
- Turner, A. P. F.** (2013). Biosensors : sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184-3196.
- Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG.** Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2010 ;309(1) :1-7.
- Wheelis, M.** 2008. *Principles of modern microbiology* Jones Bartlett Publishers, Inc., Sudbury, MA.
- Winn, W. C., Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., & Procop, G. W.** (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Winn, W., S. Allen, W. Janda, E. Koneman, G. Procop, P. Schreckenberger, and G. Woods.** 2006. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. **Site** : <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Oxidative-Fermentative-Test-Protocol.pdf?ext=.pdf>
- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., et al.** (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) : a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 112(2), 215-223.

**Yamazaki, W., Miura, T., Ito, M., et al.** (2009). Development of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of the bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports*, 28(3), 407-415.

**Zhang X,** Xu J, Zhang P, Liu Q, Wang Y. Rapid diagnosis of emerging infectious diseases : Current status and prospects for the future. *J Transl Med.* 2020 Mar 2 ;18(1) :166. Doi : 10.1186/s12967-020-02314-6.

**Zhang, J., Huang, W., Guo, H., et al.** (2018). Recent advances in biosensors for detecting foodborne pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 151, 69-8