

TD6. Identification biochimiques des microorganismes (Api 20)

Remarque

Avant de commencer l'identification par API 20 il faut préciser le type de la cellule bactérienne (cocci ou bacille) et la couleur (Gram) (le résultat de TP 3). Testé avec une oxydase les bacilles a gram négative et une catalases pour les cocci a gram +

Recherche de l'oxydase :

Le terme d'oxydase désigne une enzyme recherchée en bactériologie systématique. La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique (cytochrome-oxydase). Certains bactériologistes préfèrent parler de cytochrome-oxydase plutôt que d'oxydase.

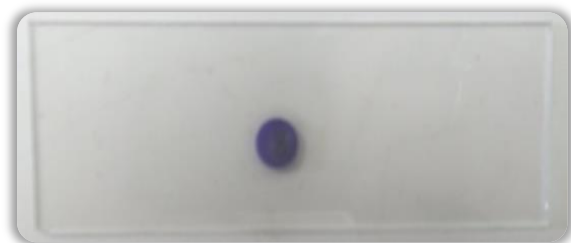
La recherche de l'oxydase s'effectue avec des disques prêts à l'emploi du commerce. Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque. La présence d'une oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette. Les entérobactéries ont une oxydase négative.

Mise en évidence d'une catalase :

C'est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée que l'on plonge ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme. Les streptocoques ont une catalase négative en revanche les staphylocoques positifs.



Catalase +



Oxydase +

I- L'API 20 E :

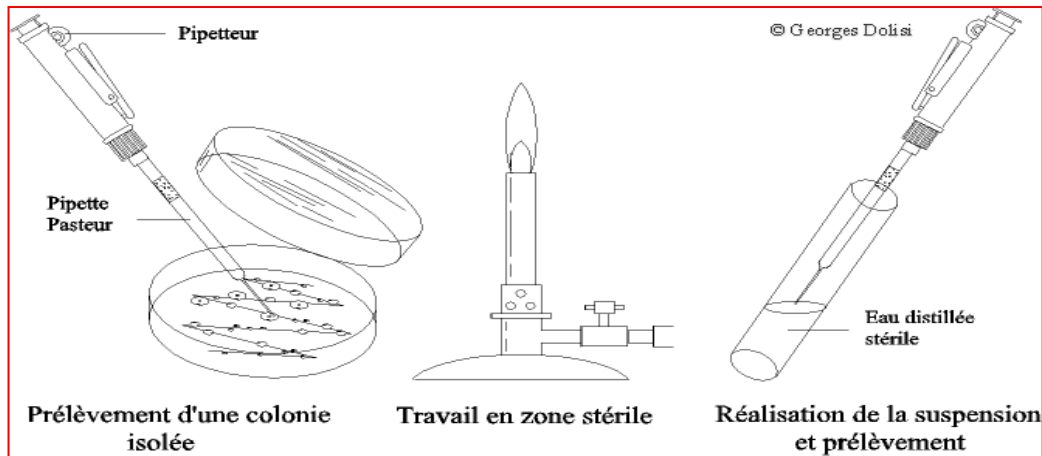
• Présentation :

Le système **API 20 E** est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les **Entérobactéries**, elles comparent **20** testes biochimiques.

• Technique :

Préparation de la galerie : réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles de la boîte pour créer une atmosphère humide, puis déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum : prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé et la mettre dans un tube d'eau distillée stérile, on réalisant une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle de Mc Ferland).



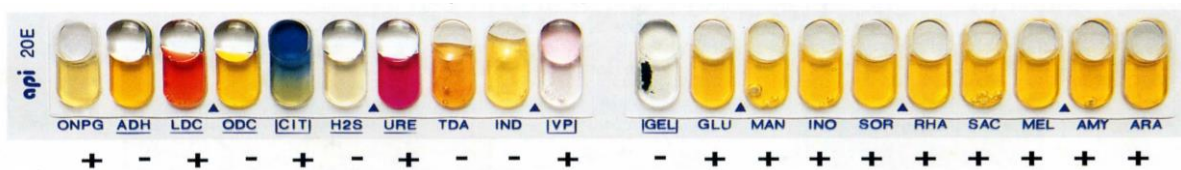
Incubation de la galerie :

Remplir en posant la pipette contre la paroi de la cupule.

- Remplir les tubes et les cupules des tests du type **ICITI**.
- Remplir les tubules des tests du type **ADH** et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l'**anaérobiose**.
- Remplir uniquement les tubules des tests restants.

Remarque : il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après l'incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (GAZ +).

- Refermer la boîte d'incubation. Incuber à 37°C pendant 18 – 24 heures.



Galerie API20E

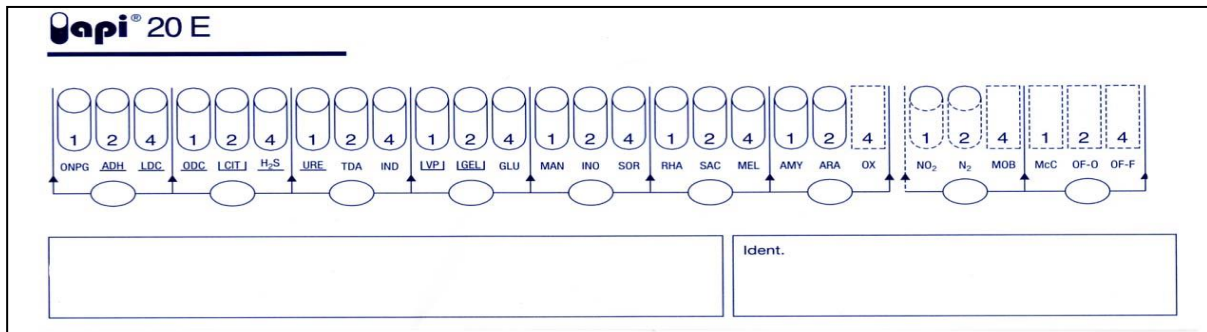
Résultats :

Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées, ensuite réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : test VP, TDA, IND...

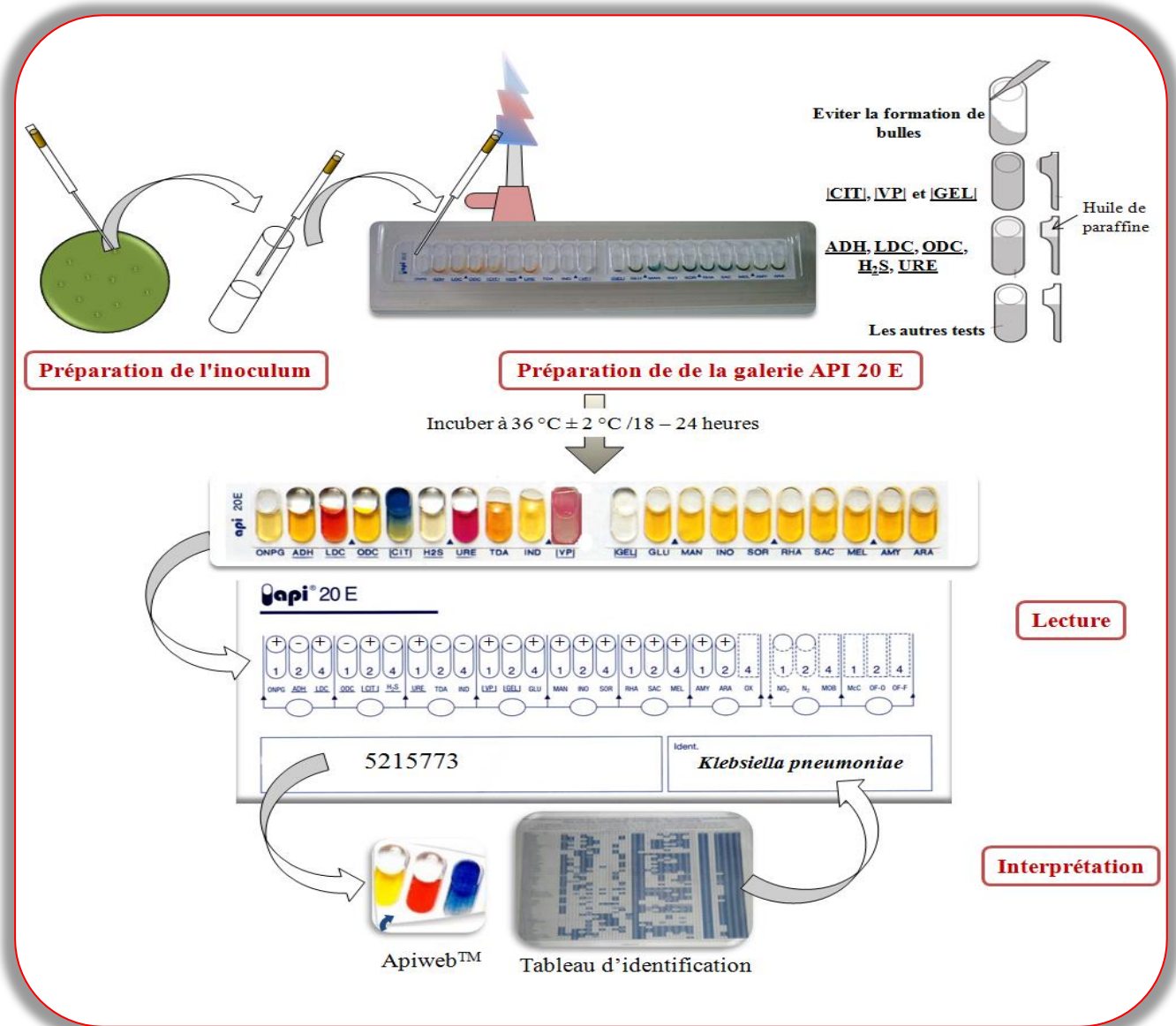
Identification :

Avec le tableau d'identification comparer les résultats afficher sur la fiche des résultats avec celle du tableau ; chaque cellule de ce tableau contient le pourcentage de positivité.

Avec le catalogue analytique : les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1ou2ou4) est positive suivant l'ordre de l'emplacement de la cupule dans le groupe, ensuite on obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification avec un logiciel d'identification.



Fiches des résultats de l'APi20E



Protocole d'identification avec la galerie API 20E.



Profil Biochimique neutre (test à l'eau distillé stérile)

Test pour les étudiants pour qu'ils apprennent à identifier quelques souches selon le guide d'identification.

On prend en premier lieu quelques tests clés tels que (ONPG, CIT, H2S, URE, GEL et GLU) après la comparaison de ces tests avec le guide et trouvé une souche qui répond a ces résultats en continue a comparé les autres tests biochimique

Une souche est retenus si elle répond a plus de 80% des teste comparés



Profil biochimique de la souche *Escherichia coli*.



Profil biochimique de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.



Profil biochimique de la souche *Aeromonas hydrophila* gr. 1



Profil biochimique de la souche *Shigella* spp.



Profil biochimique de la souche *Salmonella* spp.

Il existe des autres API 20 système tel que les Api streptocoques, Api Staphylocoques Api NE, Api C AUX et autres

Tableau : Lecture de l'API 20 E

Tests	Composants	QTE (mg/cup.)	Réactifs / Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- β Dgalactopyranoside	0,223	β -galactosidase (Ortho NitroPhényl- β DGalactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé
CIT	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu
H₂S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incolore / grisâtre	dépot noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	TDA / immédiat	
				jaune	marron- rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	JAMES / immédiat	
				incolore vert pâle / jaune	rose
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				incolore / rose pâle	rose / rouge
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	Fermentation oxydation(GLUcose)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitrol)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAMnose)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARABinose)	bleu / bleu-vert	jaune