

Famille des Enterobacteriaceae

1. Généralités

Caractères de la famille :

- Bacilles, Gram (-)
- Oxydase (-)
- Aérobie, anaérobie facultatif
- Fermentant le glucose
- Réduisant les nitrates en nitrites
- Poussant sur milieu ordinaire

Tous ces caractères doivent être vérifiés pour affirmer qu'il s'agit d'une entérobactérie; la galerie minimale pour faire le diagnostic de famille comportera obligatoirement :

- 1 gélose nutritive : caractères culturels, morphologiques et recherche de l'oxydase;
- 1 milieu Viande-Foie : étude du type respiratoire
- 1 milieu Hugh-Leifson : étude de la voie d'attaque du glucose;
- 1 milieu Mannitol-Mobilité (ou 1 Bouillon nitrate) pour l'étude de la réduction des nitrates en nitrites.

Principaux genres :

- Salmonella, Citrobacter, (Edwardsiella)
- Escherichia, Shigella
- Klebsiella, Enterobacter, Serratia, (Hafnia)
- Proteus, Morganella, Providencia
- Yersinia

Rmq: la présentation ci-dessus correspond aux 5 groupes classiquement définis chez les entérobactéries (groupes numérotés de I à V). Ces groupes ont été établis pour des raisons pratiques : les différents genres qui les composent partagent des caractères communs ; mais ils n'ont aucune signification taxonomique.

Biotopes :

Ce sont pour la plupart des hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux, où ils se comportent en commensaux (E. coli) ou en pathogènes (Salmonella, Shigella).

Ils se trouvent également dans le milieu extérieur (sol, eau, végétaux, aliments).

Bien que la plupart des espèces vivent et se multiplient dans ces 2 habitats, certaines sont plus adaptées à l'un des 2: ainsi E. coli est avant tout une bactérie intestinale (témoin de contamination fécale); par contre Serratia est essentiellement une bactérie de l'environnement.

Pouvoir pathogène :

On distingue :

- des espèces à fort potentiel pathogène, considérées comme des pathogènes stricts. Elles sont caractérisées par leurs facteurs de virulence (capacité d'adhésion aux cellules de la muqueuse, capacité d'invasion, capacité de toxinogénèse). Leur présence dans l'organisme (intestin) est anormale et se traduit par des syndromes digestifs (diarrhées).

Il s'agit principalement de Salmonella (Typhi et Paratyphi), Shigella, certains E. coli et Yersinia (enterocolitica).

On peut citer le cas particulier de Yersinia pestis, responsable de la peste et qui n'est pas à tropisme intestinal.

- des espèces occasionnellement pathogènes, qui correspondent aux espèces commensales de notre organisme ou à des bactéries de l'environnement. Elles jouent un rôle pathogène à l'occasion de la rupture d'une barrière immunologique, lors d'une diminution des résistances de l'organisme ou lors d'un déséquilibre de la flore commensale (antibiothérapie). Elles sont responsables d'infections urinaires, méningites, septicémies ...

Rmq: Les exotoxines produites par les Enterobactéries peuvent être classées en 2 grands groupes :

- les entérotoxines (type cholera) qui se fixent sur les enterocytes et déclenchent des modifications internes de l'AMP cyclique (entérotoxine thermolabile de nature protéique) ou du GMP cyclique (entérotoxine thermostable de nature peptidique) provoquant des modifications de la perméabilité ionique, d'où la sortie d'eau (diarrhée). Se rencontrent notamment chez les ECET.

- les cyto-toxines (shigella like) qui provoquent des lésions cellulaires. Se rencontrent notamment chez les ECEP.

2. Tests d'identification biochimique permettant de distinguer les différents genres et espèces

Étude du catabolisme des glucides

1. Nature des sucres fermentés

L'utilisation de différents sucres peut être étudiée, les 2 principaux étant le glucose et le lactose. Pour tous les milieux cités ci-dessous, l'indicateur de pH est le rouge de phénol.

- Tous sucres : eau peptonée au rouge de phénol + cloche de burham, qui permet également de mettre en évidence la production de gaz (présence de gaz dans la cloche). La fermentation du sucre se traduit par le virage au jaune de l'indicateur de pH (acidification).

- Pour le mannitol : milieu mannitol-mobilité. La fermentation du mannitol se traduit par le virage au jaune de l'indicateur de pH (acidification).

- Glucose et lactose : milieu de Kligler (ou Hajna), qui contient les 2 sucres en concentrations différentes (Glc 1‰; Lac 10‰). Le lactose ne peut être utilisé qu'après la consommation totale du glucose (qui réprime l'expression de la β -galactosidase).

En aérobiose (sur la pente) : le glucose est utilisé rapidement (virage "temporaire" au jaune);

- si la souche est lac (+) l'acidification va s'accroître et la pente restera jaune,

- si la souche est lac (-) l'utilisation des peptones conduira à une alcalinisation du milieu et la pente deviendra rouge.

En anaérobiose (dans le culot): la fermentation du glucose est plus lente et il n'est pas totalement consommé en 24 h :

- si la souche est glc (+) l'acidification provoquera un virage de l'indicateur de pH et le culot virera au jaune, (La production de gaz se traduit par l'apparition de bulles dans la gélose).

- si la souche est glc (-) le culot restera rouge.

Rmq: la non-utilisation du lactose peut être due à l'absence de perméase ou à l'absence de β -galactosidase. Pour préciser ce point on peut effectuer une recherche de la β -galactosidase en mettant en présence la souche et un substrat chromogène : l'orthonitrophényl- β -galactoside (ONPG). L'apparition d'une coloration jaune (orthonitrophénol) en 30min à 24h indique que la souche est β -gal (+).

2. Etude des produits résultant de la fermentation du glucose

C'est la mise en évidence du type fermentaire sur le milieu Clark et Lubs :

- la voie acide mixte conduit à la formation d'une grande quantité d'acide (pH<4,5), elle est révélée par le virage au rouge de l'indicateur de pH ajouté après l'incubation (rouge de méthyl).

- la voie du « butane-diol » conduit à la formation d'acétyl-méthyl-carbinol (AMC = acétoïne), ce produit est révélé par la réaction de Voges Proskauer mettant en jeu de l' α -naphthol et de la soude 16% (apparition d'une teinte rouge).

Rmq: en général les germes sont (RM+, VP-) ou (RM-, VP+) sauf certaines bactéries :

- RM+, VP+ : certaines souches de Proteus mirabilis, Vibrio cholerae (non-enterobactérie)

- RM -, VP- : bactéries oxydatives telles que Pseudomonas (non-enterobactérie)

1. Recherche de la gélatinase

La gélatinase est une protéase responsable de l'hydrolyse de la gélatine, elle transforme ce composé en petites molécules solubles.

La liquéfaction d'un morceau de gélatine traduit donc la présence d'une gélatinase.

Plusieurs techniques existent :

- Gélatine nutritive = technique de référence mais ne s'observe qu'après plusieurs semaines;
- Technique de Kohn = méthode au disque de charbon (disques de gélatine dénaturée où sont incorporés du charbon pulvérulent). L'hydrolyse de la gélatine libère les particules de charbon qui se déposent au fond du tube.
- Technique de Le Minor et Piéchaud = méthode du film photographique (pellicule transparente sur laquelle sont déposés des sels d'argent inclus dans de la gélatine). Même lecture que ci-dessus.

2. Recherche de la production d'indole



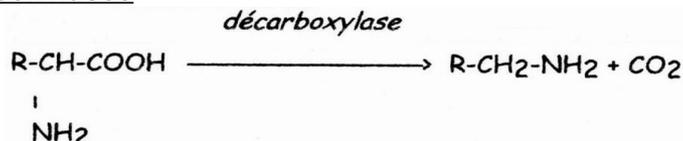
Les milieux utilisés pour cette étude doivent être riches en tryptophane et exempts d'indole préformé : eau peptonce ou milieu urée - tryptophane. Le réactif employé est celui d'Erlich-Kovacs ou James, qui donne un anneau rouge en présence d'indole.

3. Recherche de la production d'H₂S

Le sulfure d'hydrogène est produit lors de la dégradation des acides aminés soufrés ou par réduction du thiosulfate. Il est mis en évidence par la formation d'un précipité de sulfure métallique noir, en présence d'un indicateur :

- sel de fer incorporé dans le milieu : milieu de Kligler, milieu SS, milieu Hektoen.
- papier au sous-acétate de plomb maintenu au dessus de la culture.

4. Recherche des décarboxylases

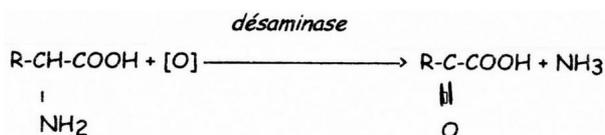


Les principales décarboxylases recherchées sont :

- LDC : lysine → cadavérine
- ODC : ornithine → putrescine
- ADC : arginine → agmatine (cette dernière réaction est le plus souvent masquée par la dégradation de l'arginine par ADH (donne ornithine).

Ces enzymes sont inductibles par un pH acide (et anaérobiose). Leur recherche se fait par la mise en évidence de l'alcalinisation d'un milieu contenant un des acides aminés (Bouillon de Moeller au pourpre de Bromocrésol).

5. Recherche des désaminases



Les principales désaminases recherchées sont :

- TDA : tryptophane → acide indole-pyruvique

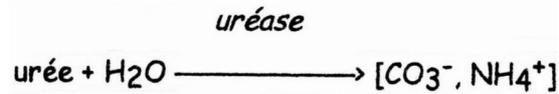
La formation de l'acide acétonique est mise en évidence après culture dans un milieu contenant du tryptophane (milieu urée-indole). par formation d'un complexe brun rouge avec le perchlorure de fer

officinal.

- Ph.D A : phénylalanine → acide phényl pyruvique

La formation de l'acide o-cétonique est mise en évidence de la même façon, dans un milieu contenant de la phénylalanine (gélose à la phénylalanine). Le complexe formé est vert.

6. Recherche de l'uréase



La mise en évidence de l'uréase consiste en la révélation de l'alcalinisation du milieu contenant de l'urée (milieu urée-indole). L'indicateur de pH est le rouge de phénol, il vire au rouge si la souche est uréase +.

Dégradation de certains sels organiques

- Utilisation du citrate de sodium :

Certaines bactéries sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, elles peuvent donc se développer sur un milieu synthétique au citrate de sodium (milieu au citrate de Simmons).

Parmi les bactéries qui ne poussent pas sur ce milieu, certaines sont capables de dégrader le citrate dans un milieu contenant d'autres substances nutritives qui permettent le démarrage de la culture et la synthèse de la perméase nécessaire à l'utilisation du citrate (milieu au citrate de Christensen). Dans ce cas le caractère citrate + se traduit par l'alcalinisation du milieu (virage au rouge du rouge de phénol).

- Dégradation du malonate de sodium :

S'étudie sur milieu de Leifson au malonate de sodium. L'alcalinisation du milieu due à la dégradation du malonate se traduit par un virage au bleu foncé du bleu de bromothymol (normalement jaune-vert).

Cf tableau pour les caractères des différentes espèces.