

TD sur l'orientation des bacilles Gram⁻

Exercice 1 : Niveau Débutant

Objectif : Orienter l'identification des bacilles Gram négatif à partir de la coloration de Gram et du test enzymatique.

Consigne

Vous disposez de trois souches bactériennes isolées à partir de prélèvements cliniques et présentées sur GTS incubée 24h à 37°C en atmosphère normale. Une coloration de Gram et un test enzymatique ont été réalisés.

Souche	Coloration de Gram	Test enzymatique	Milieu utilisé
A	Bacille Gram -	Positif	GTS incubée 24h à 37°C en atmosphère normale
B	Bacille Gram -	Négatif	GTS incubée 24h à 37°C en atmosphère normale
c	Bacille Gram -	Négatif	GTS incubée 24h à 37°C en anaérobiose.

1. Quel est le test enzymatique réalisé ?
 2. Lister le matériel nécessaire à la réalisation de ce test enzymatique.
 3. À partir des résultats obtenus, proposer une orientation d'identification pour chaque souche en justifiant la réponse.
-

Exercice 2 : Niveau Intermédiaire

Objectif : Prendre en compte le type respiratoire en plus de la coloration de Gram et du test enzymatique pour affiner l'orientation.

Consigne

Les mêmes souches que précédemment ont été analysées pour leur type respiratoire.

Souche	Coloration de Gram	Test oxydase	Type respiratoire
A	Bacille Gram -	Positif	Aérobie strict
B	Bacille Gram -	Négatif	Anaérobie facultatif
C	Bacille Gram -	Négatif	Anaérobie strict

1. Complétez l'orientation d'identification en tenant compte du type respiratoire.
 2. **Question technique :** Pourquoi est-il essentiel de lire le test oxydase dans les 30 secondes suivant l'application du réactif ? Que se passe-t-il si la lecture est retardée ?
-

Exercice 3 : Niveau Avancé

Objectif : Intégrer le contexte clinique dans l'orientation d'identification bactérienne.

Consigne

Vous travaillez sur trois échantillons issus de patients hospitalisés. Voici les résultats obtenus :

Souche	Coloration de Gram	Test oxydase	Type respiratoire	Contexte clinique
A	Bacille Gram -	Positif	Aérobie strict	Infection respiratoire sévère chez un patient immunodéprimé sous assistance respiratoire
B	Bacille Gram -	Négatif	Anaérobie facultatif	Infection urinaire communautaire
C	Bacille Gram -	Négatif	Anaérobie strict	Infection intra-abdominale post-chirurgicale

1. Identifiez les genres bactériens les plus probables pour chaque souche en tenant compte du contexte clinique.
2. Proposez la suite logique de la démarche d'identification pour chaque souche.
3. **Question technique :** Expliquez le principe biochimique du test oxydase. Quel est le rôle du cytochrome c oxydase dans la réaction observée et sa localisation cellulaire ?

Correction

Correction de l'Exercice 1 : Niveau Débutant

1. Quel est le test enzymatique réalisé ?

Le test enzymatique réalisé est le **test oxydase**. Test à réaliser pour les bactéries Gram⁻. Ce test permet de détecter la présence de la **cytochrome c oxydase**, une enzyme de la chaîne respiratoire présente chez certaines bactéries Gram négatif.

2. Liste du matériel nécessaire à la réalisation du test oxydase

- Colonie isolée sur milieu de culture de préférence sans fermentation de sucre (ex. GTS incubé 24h à 37°C).
- Réactif oxydase.
- Papier filtre à imprégner de réactif oxydase.
- Pipette Pasteur ou anse en plastique (éviter l'anse métallique qui peut donner de faux positifs).
- Chronomètre pour respecter le temps de lecture.

3. Orientation d'identification en fonction des résultats obtenus

Souche	Coloration de Gram	Test oxydase	Milieu utilisé	Orientation d'identification
A	Bacille Gram -	Positif	AS ou AAF	<i>Pseudomonas et apparentés, Vibrio et apparentés</i>
B	Bacille Gram -	Négatif	AS ou AAF	<i>Enterobacteriaceae, Acinetobacter, Stenotrophomonas.</i>
C	Bacille Gram -	Négatif	ANS ou AAF	<i>Enterobacteriaceae ou Bacteroides (bactérie anaérobie stricte)</i>

Correction de l'Exercice 2 : Niveau Intermédiaire

1. Complétez l'orientation d'identification en tenant compte du type respiratoire

Souche	Coloration de Gram	Test oxydase	Type respiratoire	Orientation d'identification
A	Bacille Gram -	Positif	Aérobie strict	<i>Pseudomonas et apparentés</i>
B	Bacille Gram -	Négatif	Anaérobie facultatif	<i>Enterobacteriaceae</i>
C	Bacille Gram -	Négatif	Anaérobie strict	<i>Probable : Bacteroides</i>

2. Question technique : Pourquoi est-il essentiel de lire le test oxydase dans les 30 secondes suivant l'application du réactif ?

La lecture doit être réalisée dans les 30 secondes, car :

- Une réaction bleue/violette rapide indique un test oxydase positif.

- Une réaction retardée (au-delà de 30 secondes) peut être **un faux positif** dû à l'oxydation du réactif en contact prolongé avec l'air.

Correction de l'Exercice 3 : Niveau Avancé

1. Identification des genres bactériens les plus probables en tenant compte du contexte clinique

Souche	Coloration de Gram	Test oxydase	Type respiratoire	Contexte clinique	Genre et espèce suspectés
A	Bacille Gram -	Positif	Aérobie strict	Infection respiratoire sévère chez un immunodéprimé	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B	Bacille Gram -	Négatif	Anaérobie facultatif	Infection urinaire communautaire	<i>Escherichia coli</i>
C	Bacille Gram -	Négatif	Anaérobie strict	Infection intra-abdominale post-chirurgicale	<i>Bacteroides fragilis</i>

2. Suite logique de la démarche d'identification pour chaque souche

- **Souche A (*Pseudomonas aeruginosa*)** : identification MALDI-TOF ou GTS + api 20 NE incubée à 30°C atmosphère normale.
- **Souche B (*Escherichia coli*)** : : identification MALDI-TOF ou GTS + api 20 E incubée à 37°C atmosphère normale.
- **Souche C (*Bacteroides fragilis*)** : identification MALDI-TOF ou Gélose au sanh + api 20 A incubée à 37°C atmosphère anaérobie (jarre ou sac + sachet fixateur d'oxygène).

3. Question technique : Expliquez le principe biochimique du test oxydase. Quel est le rôle du cytochrome c oxydase dans la réaction observée et sa localisation cellulaire ?

Principe biochimique du test oxydase

Le test oxydase repose sur la détection de l'activité de la **cytochrome c oxydase**, une enzyme impliquée dans la chaîne de transport des électrons des bactéries aérobies.

- Le réactif utilisé est un substrat **chromogène**.
- Si la bactérie possède la cytochrome c oxydase, celle-ci va **oxyder le chromogène**, entraînant un **changement de couleur rapide en bleu/violet**.
- L'absence de réaction indique l'absence de cytochrome c oxydase et un métabolisme respiratoire différent.

Localisation cellulaire du cytochrome c oxydase

- Cette enzyme est située au niveau de la **chaîne respiratoire** localisée dans la **membrane plasmique** des bactéries.