

Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux

## INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

## PRINCIPE

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

## PRESENTATION

### Coffret de 25 tests (réf. 20 100)

- 25 galeries API 20 E
- 25 boîtes d'incubation
- 25 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

### Coffret de 100 tests (réf. 20 160)

- 100 galeries API 20 E (4x25 galeries)
- 100 boîtes d'incubation
- 100 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

## COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 20 E est reportée dans le Tableau de Lecture de cette notice.

## REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

### Réactifs

- API NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (Réf. 20 230) ou API Suspension Medium, 5 ml (Réf. 20 150)
- API 20 E coffret de réactifs (Réf. 20 120) ou réactifs individuels : TDA (Réf. 70 402)  
JAMES (Réf. 70 542)  
VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422)  
NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Réactif Zn (Réf. 70 380)
- Oxydase (Réf. 55 635\*)  
\* référence non commercialisée dans certains pays : utiliser un réactif équivalent.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Catalogue Analytique API 20 E (Réf. 20 190) ou logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

## Matériel

- Pipettes ou PSlpettes
- Protège-ampoule
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

## REACTIFS COMPLEMENTAIRES

- API OF Medium (Réf. 50 110) :  
Test pour la détermination du métabolisme fermentatif ou oxydatif du glucose.
- API M Medium (Réf. 50 120) :  
Test pour la détermination de la mobilité des bactéries aéro-anaérobies.

## PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

## CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries sont présentes dans une poche en aluminium avec sachets déshydratants.

Après ouverture de celle-ci (\*), conserver les galeries restantes avec les déshydratants en refermant la poche à l'aide de la barrette de fermeture (présente dans le coffret) : placer l'extrémité de la poche entre les deux pièces de la barrette et les clamer soigneusement, à fond, sur toute leur longueur. Les galeries peuvent ainsi être conservées **10 mois après ouverture de la poche**, à 2-8°C (ou jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage, si celle-ci est antérieure).

(\* *Recommandation pour l'ouverture de celle-ci* : couper juste en dessous de la soudure, en maintenant la poche droite, pour éviter d'endommager les sachets déshydratants.

## ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 E ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté à la culture des *Enterobacteriaceae* et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux selon les techniques usuelles de bactériologie.

## MODE OPERATOIRE

### Test oxydase

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21<sup>ème</sup> test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

### Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

**NOTE** : API 20 E doit être utilisé avec des *Enterobacteriaceae* et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux. Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 E. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

### Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**NOTE** : la plupart des espèces de *Vibrio* sont halophiles. En cas de suspicion d'un *Vibrio*, réaliser la suspension bactérienne dans API NaCl 0,85 % Medium.

## Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :
  - pour les tests [CIT], [VP] et [GEL], remplir tube et cupule,
  - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
  - pour les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

## LECTURE ET INTERPRETATION

### Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
  - Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
  - Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
  - Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant après 10 minutes doit être considérée **négative**.
- NOTE** : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.
- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :
  - Réincuber la galerie 24 heures (± 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
  - Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).
  - Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification).

### Interprétation

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

- Détermination du profil numérique :
  - Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21<sup>ème</sup> test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.
- Identification :
  - Elle est réalisée à partir de la base de données (V4.1)
  - \* à l'aide du Catalogue Analytique :
    - Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
  - \* à l'aide du logiciel d'identification **apiweb**™ :
    - Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

Par ailleurs dans certains cas, le profil à 7 chiffres étant insuffisamment discriminant, les tests complémentaires suivants sont nécessaires :

- Réduction des nitrates en nitrites (NO<sub>2</sub>) et en azote (N<sub>2</sub>) : ajouter 1 goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 5 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive** (NO<sub>2</sub>). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) : ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté **jaune** indique une réaction **positive** (N<sub>2</sub>) à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est **orange-rouge**, la réaction est **négative**, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc.

Cette réaction est intéressante pour les bacilles à Gram négatif oxydase positive.

**NOTE :** Pour les mêmes raisons que le test indole (se référer à la note du paragraphe "Lecture de la galerie"), le test de réduction des nitrates doit être réalisé en dernier.

### CONTROLE DE QUALITE

Les milieux, galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur avec la souche 1. *Escherichia coli* ATCC® 25922 de préférence ou l'une des souches suivantes :

- |  |            |   |            |
|--|------------|---|------------|
| 2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | ATCC 51331 | 4. <i>Proteus mirabilis</i>                           | ATCC 35659 |
| 3. <i>Enterobacter cloacae</i>         | ATCC 13047 | 5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> | ATCC 35657 |

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	[CIT]	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	[VP]	[GEL]	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> *
1.	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
2.	+	-	V	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	+	+	-	V	+	-	-	-	-	+	-	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	-
4.	-	-	-	+	V	+	+	+	-	-	V	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+
5.	+	-	+	-	+	-	V	-	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

\* Le stade N<sub>2</sub> (+) peut être observé pour les souches ATCC 13047, ATCC 25922 et ATCC 35657.

- Profil obtenu après 24-48 H d'incubation pour la souche ATCC 51331, à partir de colonies cultivées sur gélose Trypcase Soja + sang.
- Profils obtenus après 18-24 H d'incubation pour les autres souches, à partir de colonies cultivées sur gélose Trypcase Soja + sang.
- Suspension bactérienne préparée en API NaCl 0,85 % Medium.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

### LIMITES DU TEST

- Le système API 20 E est destiné à l'identification des *Enterobacteriaceae* et des bacilles à Gram négatif non fastidieux présents dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice) et à eux seuls. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Des discordances par rapport aux techniques conventionnelles peuvent être observées. Elles sont dues aux différences de principe des réactions utilisées en technique API. Des écarts de pourcentages peuvent également être observés et s'expliquent par des variations de substrat.
- Pour certaines espèces (ex. *Klebsiella* ou *Proteus*), des réactions du test glucose initialement positives peuvent parfois devenir négatives (apparition d'une coloration bleu-vert). Dans ce cas, cette réaction doit être considérée comme négative. Les pourcentages indiqués dans le Tableau d'Identification prennent en compte ce genre de phénomène.
- Dans le cas d'identification à *Salmonella* ou *Shigella*, une identification sérologique doit être effectuée pour confirmer l'identification bactérienne.
- Les bacilles à Gram négatif non fermentants, isolés de patients atteints de mucoviscidose, peuvent générer des profils biochimiques atypiques susceptibles d'altérer leur identification.

- Mobilité (MOB) : Inoculer une ampoule d'API M Medium (cf notice).
- Culture sur gélose de MacConkey (McC) : Ensemencer un milieu de Mac Conkey (cf notice).
- Oxydation du glucose (OF-O) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).
- Fermentation du glucose (OF-F) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).

Ces tests complémentaires, mentionnés dans l'introduction (Codage des profils) du Catalogue Analytique, peuvent être utilisés pour constituer un profil à 9 chiffres, identifiable avec le logiciel d'identification.

5 315 173 (57) *Enterobacter gergoviae*

D'autres tests supplémentaires peuvent être proposés en cas de faible discrimination. Se référer au logiciel ou Catalogue Analytique.

### RESULTATS ATTENDUS

### PERFORMANCES

- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.
- *Enterobacteriaceae* : 5514 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
  - 92,80 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
  - 4,61 % des souches n'ont pas été identifiées.
  - 2,59 % des souches ont été mal identifiées.
- autres bacilles à Gram négatif non fastidieux : 2386 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
  - 90,32 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
  - 6,16 % des souches n'ont pas été identifiées.
  - 3,52 % des souches ont été mal identifiées.

## ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
[CIT]	trisodium citrate	0,756	utilisation du CiTrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
H <sub>2</sub> S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H <sub>2</sub> S	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	<u>TDA / immédiat</u>	
				jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	<u>JAMES / immédiat</u>	
				incolore vert pâle / jaune	rose
[VP]	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				incolore / rose pâle	rose / rouge (5)
[GEL]	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAMnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARABinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.

(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).

(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

(5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

## TESTS COMPLEMENTAIRES

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
Réduction des nitrates tube GLU	potassium nitrate	0,076	production de NO <sub>2</sub>	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min	
			réduction au stade N <sub>2</sub>	jaune	rouge
MOB	API M Medium ou microscope		mobilité	orange-rouge	jaune
McC	milieu de MacConkey		culture	immobile	mobile
OF-F OF-O	glucose (API OF Medium)		fermentation : sous huile oxydation : à l'air	absence	présence
				vert	jaune
				vert	jaune

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. IV
TABLE DES SYMBOLES	p. V

bioMérieux, le logo bleu, API et **apiweb** sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.  
ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.  
Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.



 **bioMérieux SA**  
au capital de 12 029 370 €  
RCS LYON 673 620 399  
69280 Marcy-l'Etoile / France  
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
<http://www.biomerieux.com>

**bioMérieux, Inc**  
Box 15969,  
Durham, NC 27704-0969 / USA  
Tél. (1) 919 620 20 00  
Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France

