

TRAVAUX PRATIQUES

DE

MICROBIOLOGIE GENERALE



**M.P. HAYETTE
P. HUYNEN
C. MEEX**

SOMMAIRE

PREMIERE SÉANCE / THEORIE

A. Etude microbiologique d'un prélèvement pathologique

1. Qu'est-ce qu'une bactérie ?
2. Les bactéries dans le monde vivant
3. Examen macroscopique d'un prélèvement biologique
4. Morphologie des bactéries et levures: examen microscopique
5. Milieux de culture et isolement des bactéries et levures
6. Conditions de culture
7. Manipulations bactériologiques de base
8. Morphologie de la croissance bactérienne

B . Classification des bactéries d'intérêt médical

Méthodes d'identification

C . Agents anti-bactériens

- CMI. Méthodes par dilution, Kirby-bauer, E-test, Vitek-2.
- CMB. Définition

Exemple de méthode d'identification : Streptocoques

PREMIERE SEANCE/ PARTIE PRATIQUE

- Culture sur différents milieux
- Coloration de Gram
- Activités biochimiques
- Etude de la coagulase du staphylocoque
- Réalisation de galeries d'identification
- Réalisation d'un antibiogramme

DEUXIEME SÉANCE/PARTIE PRATIQUE

- Lecture des galeries d'identification
- Lecture des antibiogrammes
- Lecture des antifongigrammes
- Groupage sérologique rapide des Streptocoques

DEUXIEME SÉANCE/PARTIE THEORIQUE

Sérologie

TROISIEME SEANCE

- a. BIOLOGIE MOLECULAIRE
- b. Evaluation des connaissances

PREMIERE SEANCE

A. ETUDE MICROBIOLOGIQUE D'UN PRELEVEMENT PATHOLOGIQUE.

1. QU'EST-CE QU'UNE BACTERIE ?

Une bactérie est un organisme microscopique généralement formé d'une seule cellule. Celle-ci se distingue des cellules de la majorité des autres organismes tant unicellulaires que pluricellulaires par son organisation simplifiée : les cellules bactériennes sont de type **procaryote** tandis que celles des autres organismes sont de type **eucaryote**.

2. LES BACTERIES DANS LE MONDE VIVANT

Les bactéries sont rencontrées dans le sol, l'eau, chez les plantes, les animaux et l'homme (du moins au niveau des régions du corps en relation avec l'extérieur : peau, nez, bouche, pharynx, tube digestif et muqueuses génitales). Les espèces susceptibles d'engendrer des lésions tissulaires et de provoquer des maladies infectieuses intéressent principalement la Microbiologie Médicale.

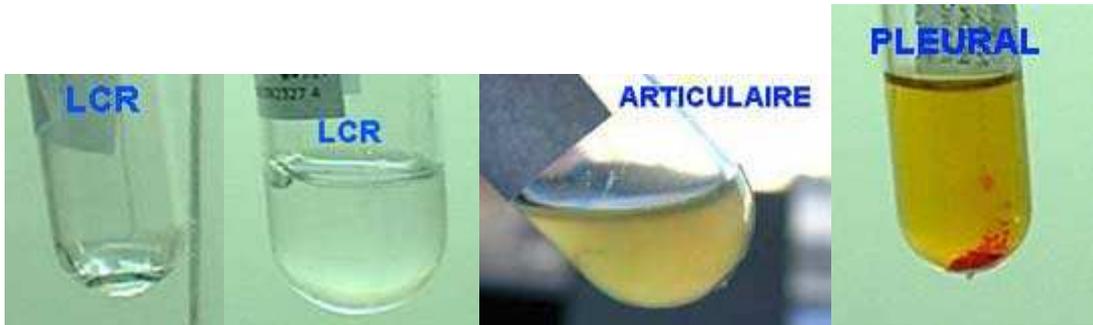
3. EXAMEN MACROSCOPIQUE D'UN PRELEVEMENT BIOLOGIQUE



Toute infection bactérienne s'accompagne, outre la présence de bactéries, de signes biologiques liés à l'inflammation avec l'éventuelle présence de **leucocytes**, notamment de polynucléaires. Ces éléments peuvent entraîner au delà d'un seuil, une modification visuelle, clairement perceptible à l'oeil nu, qui signe une anomalie patente.

Exemple : liquides pathologiques.

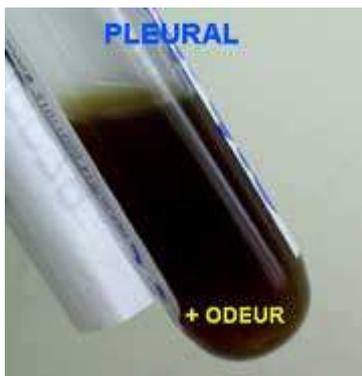
- **Trouble** : urine, LCR, liquide pleural ou articulaire



- **Hématurique** : urine, LCR, liquide pleural ou articulaire

Odeur : on notera celle caractéristique lors d'infections à germes anaérobies dans un liquide pleural

Consistance : Exemple d'une selle diarrhéique.



4. MORPHOLOGIE DES BACTERIES ET LEVURES : EXAMEN MICROSCOPIQUE.

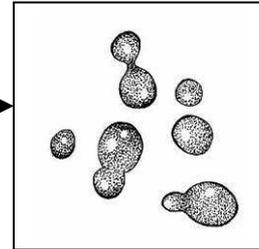
Les bactéries ont des tailles allant des cellules «naines » de 0,2 microns ou même moins à des cellules «géantes » longues de 500 microns, mais la plupart ont une dimension comprise entre 1 et 10 microns.

Elles peuvent le plus souvent être observées au microscope ordinaire (grossissement de 1000 fois environ) sans avoir subi de préparation particulière (examen à l'état frais, entre lame et lamelle, de bactéries mises en suspension dans un liquide) ou après coloration.

Les **levures** sont des champignons unicellulaires dont la taille varie de 2 à 20 μm . La taille des champignons est donc supérieure à celle des bactéries ce qui permet facilement de les distinguer.

Les levures peuvent se présenter sous plusieurs formes :

Forme ronde ou ovale : levures et spores.



Forme pseudofilamenteuse : chaînes de levures formant des filaments (différentes espèces de *Candida*)

Forme filamenteuse : formation de vrai mycelium (*C. albicans*)

4.1. Microscope optique :

Souvent, on ne notera aucune anomalie macroscopique, d'où la nécessité de rechercher des microorganismes (bactéries, parasites, levures) et des éléments cellulaires (leucocytes) au **microscope optique**.

Cet examen est également utile pour préciser la nature des anomalies macroscopiques observées.



L'examen microscopique permet de distinguer différents types morphologiques des bactéries:

- **Forme sphérique**. La forme sphérique caractérise les coques ou cocci.

Ces bactéries se subdivisent elles-mêmes en :

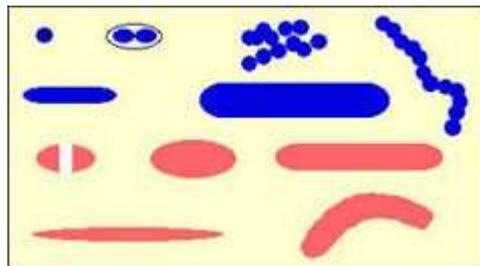
- diplocoques : cellules disposées par paires et présentant parfois un aspect effilé ou réniforme plus ou moins accentué ;
- streptocoques : cellules disposées en chaînettes ;
- tétrades : groupement de 4 cellules en carré sur un même plan ;
- sarcines : cubes réguliers de 8 cellules ou de multiples de 8 ;
- staphylocoques : cellules réunies en amas irréguliers ou grappes.

- **Forme cylindrique, en bâtonnet** . On distingue deux types :

- bacilles : bâtonnets droits avec extrémités arrondies, carrées, effilées, fusiformes, ou présentant un renflement à un ou aux deux pôles ;
- vibrions : bâtonnets en forme de croissant ou de faucille.

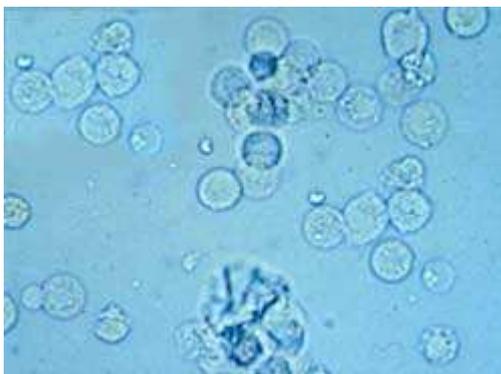
- **Forme hélicoïdale ou spiralée**. Ces bactéries qui ont l'aspect de filaments spiralés peuvent être différenciées par leur longueur, le nombre et l'amplitude de leurs ondulations.

- **Forme ramifiée**. Certaines bactéries, comme les actinomycètes, peuvent présenter des ramifications.



4.1.1.Examen à l'état frais :

Sans avoir subi de coloration particulière : une préparation est obtenue avec le dépôt d'une goutte du liquide biologique entre lame et lamelle, puis on observe au microscope la **présence éventuelle de bactéries** (coque, diplocoque, coccobacille, bacille...) ou de **levures**, ainsi que la présence ou non de **globules rouges** et de **globules blancs**.



ex. : sédiment urinaire

4.1.2 Examen après coloration :

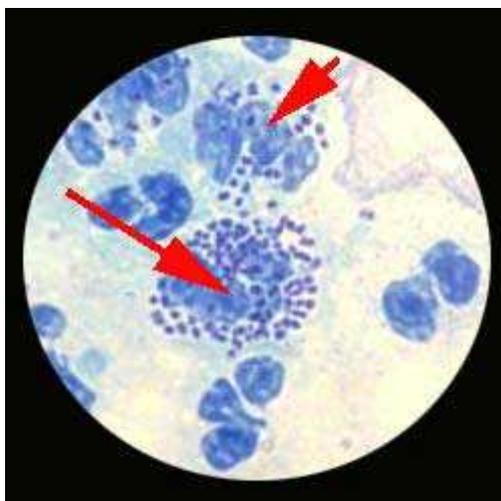
(Observer d'abord au faible grossissement, ensuite passer au 1000x).

a- Préparation d'un frottis.

Le liquide à examiner est prélevé au moyen d'une oese ou d'un autre instrument, et déposé sur une lame de verre propre. La suspension est étendue avec la boucle sur une surface d'un à deux centimètres carrés de façon à obtenir un mince film de cellules (suspension faiblement laiteuse) et ensuite séchée. Le frottis est alors fixé en le passant dans une flamme, puis est refroidi.

b- Coloration :

- Coloration simple: Le frottis fin est traité par un seul colorant basique (bleu de méthylène). Cette technique est simple et rapide (ex : diplocoques en grain de café intracellulaires).



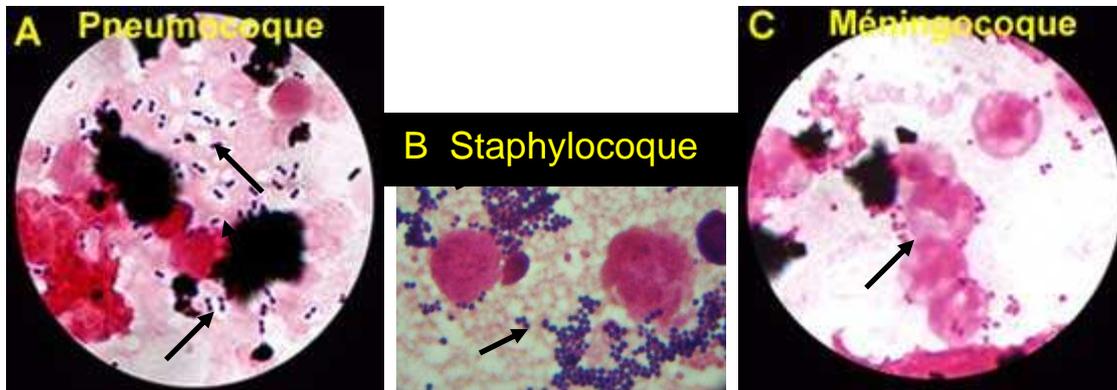
- Coloration de Gram.

Les bactéries non décolorées par l'alcool sont dites à **Gram positif** ; elles apparaissent en **violet** tandis que les bactéries à **Gram négatif**, décolorées par l'alcool et recolorées par le colorant de contraste, apparaissent en **rose**.

Ces deux comportements résultent d'une différence fondamentale de composition et de structure de la paroi. Contrairement à la paroi des bactéries à Gram négatif, celle

des bactéries à Gram positif interpose une barrière empêchant la décoloration par l'alcool du cytoplasme qui est le siège de la réaction.

Remarque : les levures apparaissent également en violet après une coloration de gram.



▪ Colorations acido-alcoolo-résistantes :

Les colorations acido-alcoolo-résistantes utilisent les propriétés particulières de la paroi des bactéries :

Ziehl.

Les bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR), compte tenu de la composition de leur paroi, sont détectés spécifiquement. Il s'agit du groupe des mycobactéries dont le bacille tuberculeux (Bacille de KOCH/BK).

Méthode : coloration à la fuschine phéniquée, décoloration acido-alcoolique, contre-coloration au bleu.

Interprétation : les BAAR apparaissent colorés en rouge, sur un fond bleu.

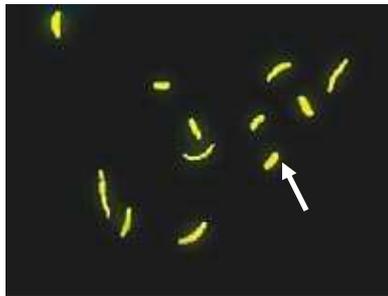


4.2. Microscope à fluorescence :

Il existe deux types de coloration en fluorescence :

- **Fluorescence directe** : le micro-organisme est coloré directement avec un fluorochrome

Exemple : coloration à l'auramine : l'utilisation d'un colorant fluorescent, l'auramine, permet de colorer spécifiquement les mycobactéries, qui apparaissent alors fluorescentes.



- **Immunofluorescence** : le micro-organisme est coloré indirectement, par l'intermédiaire d'un anticorps, couplé à un fluorochrome (*voir plus loin*).

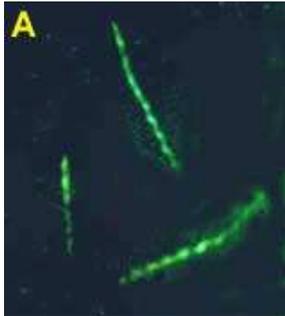
Le fluorochrome absorbe la lumière ultraviolette et la réémet à une longueur d'onde supérieure, dans la partie visible du spectre. La couleur de la lumière réémise varie selon la nature du fluorochrome utilisé. Par exemple, la fluorescéine absorbe la lumière UV à la longueur d'onde de 495 nm et la réémet sous forme d'une lumière visible jaune-vert (d'une longueur d'onde de 525 nm).



4.3. Microscopie à fond noir (condenseur spécial) :

Il s'agit de rechercher des bactéries trop fines pour être visibles au microscope optique. Cette recherche n'est pas d'usage courant.

Exemple : diagnostic microscopique de la syphilis : recherche de la présence de *Treponema pallidum* sur un prélèvement de sérosité de chancre (A).



La classification la plus simple des bactéries qui repose sur leur morphologie peut se doubler d'un critère de différenciation fondé sur leur comportement après coloration par les méthodes de Gram ou de Ziehl-Neelsen. Cependant, pour bien les identifier et les définir, il est indispensable de les cultiver afin de rechercher d'autres caractères.

5. LES MILIEUX DE CULTURE ET L'ISOLEMENT DES BACTERIES ET LEVURES.

Définition : milieux nutritifs pour les bactéries et levures, permettant leur croissance. Il existe deux formes de milieux : liquides et solides.

A. Les milieux synthétiques.

Ce sont des milieux dont la composition qualitative et quantitative est connue exactement. Ils permettent l'étude précise des besoins nutritifs des bactéries.

B. Les milieux empiriques.

Ces milieux sont préparés à partir de produits naturels dont on ne connaît pas la composition avec précision.

L'exemple le plus simple est celui du **bouillon nutritif ordinaire** dont la formule est la suivante : extrait de viande de bœuf 3 g, peptone 5 g, chlorure sodique 8 g et eau distillée ad 1.000 ml. Ce milieu, qui couvre les besoins nutritifs d'un grand nombre de bactéries d'intérêt médical, peut être utilisé directement ou servir à la préparation de milieux spéciaux.



➤ Milieux enrichis :

Ils sont utilisés pour la culture des espèces exigeantes sur le plan nutritionnel. Ils sont enrichis par l'adjonction d'extraits d'organes (cœur ou cerveau), de sang (cheval ou mouton), etc.

Exemple :

gélose enrichie au sang de mouton (5%) qui permet la croissance de la plupart des bactéries (Gram + et Gram -) y compris les plus exigeantes au point de vue nutritionnel.



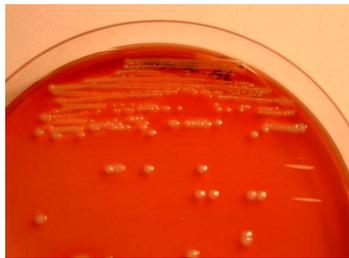
gélose au sang

➤ Milieux sélectifs :

L'incorporation dans un milieu d'un produit déterminé permet quelquefois la croissance d'une ou plusieurs espèces mais empêche le développement des autres : il s'agit alors d'un milieu sélectif.

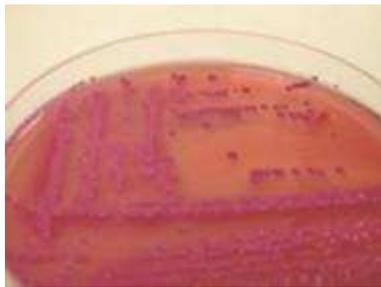
Exemples :

1. l'association acide nalidixique-colimycine (CNA) inhibe la flore bactérienne à Gram négatif mais est sans effet sur les Gram positif.



Staphylococcus. aureus sur gélose CNA

2. Le milieu de MacConkey renferme des sels biliaires et du crystal violet qui inhibent le développement des bactéries à Gram positif mais non celui de nombreux Gram négatifs, dont les entérobactéries et les *Pseudomonas*.



Klebsiella pneumoniae sur gélose Mac Conkey

3. Le milieu Sabouraud + antibiotiques

Les champignons peuvent pousser sur la plupart des milieux utilisés en bactériologie. Mais il existe des milieux dont la composition est spécifiquement adaptée à leurs besoins nutritifs.

Milieux spécifiques sélectifs :

- Sabouraud + antibiotiques : permet d'inhiber la croissance des bactéries.
- Sabouraud + antibiotiques + anti-moisissures : inhibe en plus le développement de certaines moisissures. Utilisé pour la recherche de dermatophytes.

➤ Milieux d'identification :

Ce sont des milieux qui sont employés pour la mise en évidence d'une activité enzymatique.

Exemple :

Le milieu de MacConkey contient du lactose et du rouge neutre qui permet de distinguer les bactéries qui utilisent le lactose car l'assimilation du sucre entraîne une acidification (colonies roses).

Remarque : le milieu de MacConkey est à la fois un milieu sélectif et d'identification

Exemples de milieux solides coulés en boîte de Pétri selon le produit pathologique et la demande :

- **Pus, liquides de ponction** : milieux enrichis au sang (frais, cuit=chocolat) et milieux sélectifs
- **Expectoration** : milieux enrichis au sang (frais, cuit) et milieux sélectifs
- **Urines** : milieu polyvalent pour identifier les bactéries gram positif et Gram négatif (CLED®...).



Entérobactéries sur gélose CLED

6. CONDITIONS DE CULTURE

Certaines conditions d'environnement jouent un rôle important pour la croissance. La **concentration en éléments nutritifs** du milieu de culture ne peut pas être trop élevée car beaucoup de bactéries sont inhibées dans un milieu hypertonique.

La plupart des bactéries d'intérêt médical croissent à un **pH** compris entre 6,5 et 7,5 et à une température voisine de 35°C.

Enfin, les **besoins gazeux** sont importants à satisfaire. Selon les cas, la culture devra ou pourra être réalisée à l'air libre, dans une atmosphère enrichie en gaz carbonique ou dans une enceinte appauvrie en oxygène. En effet, certains germes sont aérobies stricts ou anaérobies stricts, tandis que d'autres sont micro aérophiles , aérobies-anaérobies facultatifs, anaérobies aérotolérants ou encore capnophiles.



7. MANIPULATIONS BACTERIOLOGIQUES DE BASE

Les outils du bactériologiste :

Le **fil droit** et la **boucle de fil** (encore appelée anse ou oese) sont formés d'un fil en nickel-chrome, d'une longueur de 5 à 8 cm, fixé à un manche métallique. Ces instruments permettent de transférer des bactéries à partir d'une colonie ou d'un milieu liquide vers une gélose ou un bouillon. Ils sont stérilisés par la chaleur

immédiatement avant leur utilisation et refroidis en évitant tout contact avec des objets non stériles.

Dès la fin de la manipulation, ils doivent à nouveau être stérilisés afin de ne pas contaminer la table de travail et le milieu ambiant.



Les écouvillons qui sont constitués par une petite boule d'ouate ou de dacron fixé à l'extrémité d'une tige de bois, de métal ou de plastic, sont généralement enveloppés dans du papier avant stérilisation. Ils servent principalement à réaliser le prélèvement des échantillons et l'inoculation riche des milieux gélosés.



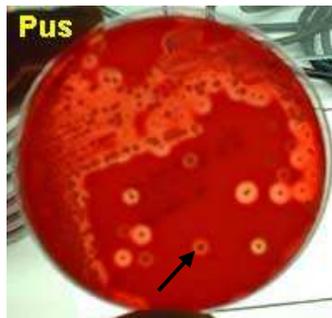
Inoculation d'un milieu gélifié

Pour inoculer un milieu solide, on recourt à des procédés qui diffèrent selon le but poursuivi. La **méthode des stries** permet d'obtenir des colonies distinctes à partir d'un inoculum liquide ou solide. Une boucle de fil portant l'inoculum est déplacée selon un mouvement de va-et-vient à la surface du milieu. Cinq séries de stries sont habituellement effectuées successivement en prenant soin après chaque tracé de flamber l'oese, puis de la laisser refroidir et de faire débuter chaque nouvelle série de stries dans le tracé de la précédente.



La boîte de Pétri est alors mise à incuber couvercle dirigé vers le bas afin d'éviter que des gouttes de condensation ne tombent sur la gélose.

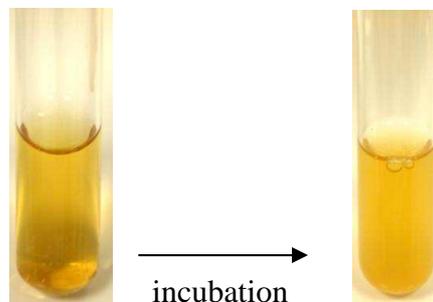
Ce mode opératoire dilue progressivement l'inoculum par appauvrissement mécanique de sorte que les colonies pourront être très nombreuses et confluentes au niveau des premières stries, puis de moins en moins serrées et finalement parfaitement isolées.



8. MORPHOLOGIE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

L'aspect de la croissance bactérienne est très différent en milieu liquide ou sur milieu solide :

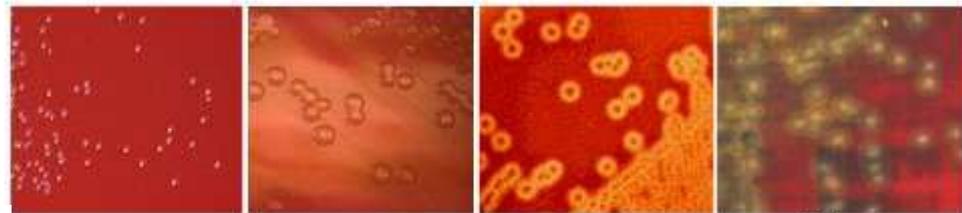
- *Croissance en milieu liquide*. A la fin de la phase exponentielle, le nombre de bactéries est élevé, de l'ordre de 10^8 à 10^9 cellules par ml de milieu et parfois plus encore. L'accumulation des cellules peut troubler uniformément le milieu, former des agglomérats, un sédiment, un voile superficiel ou présenter l'une ou l'autre combinaison de ces aspects morphologiques.



- *Croissance sur milieu solide*. A la surface des milieux de culture solides, les descendants de chaque cellule restent groupés et s'accumulent en de petites

masses visibles à l'œil nu, appelées colonies bactériennes. Celles-ci sont très rapprochées au point de former un tapis ou plus ou moins séparées les unes des autres selon le nombre de germes déposés sur le milieu.

On notera l'aspect des colonies, la taille, la bordure, la surface (lisse, rugueuse), la coloration (pigment jaune pour *Staphylococcus aureus*, pigment violet pour *Serratia marcescens*), la présence d'une hémolyse sur gélose sang.



**Types
d'hémolyse :**

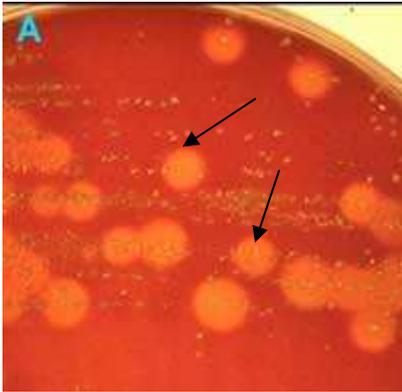
Absence d'hémolyse

beta

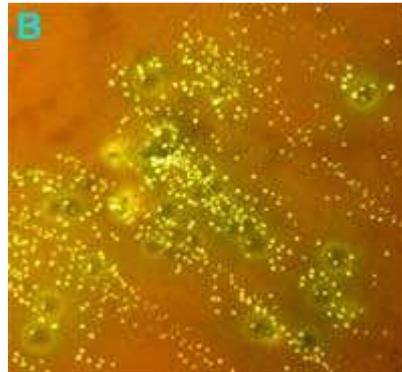
alpha

Exemples d'isolement:

Prélèvement de gorge : nombreuses colonies β -hémolytiques (gélose au sang frais)



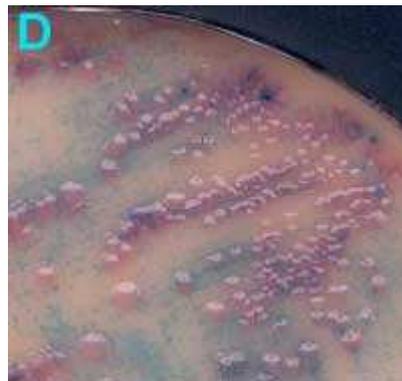
Expectoration : nombreuses colonies alpha-hémolytiques et muqueuses évoquant un pneumocoque ; petites et brillantes évoquant une souche de *Haemophilus influenzae* (gélose au sang cuit ou gélose chocolat)



Urine : nombreuses colonies de deux types d'entérobactéries : colonies muqueuses et colonies irrégulières



Urine : colonies de plusieurs types différents



B. CLASSIFICATION DES BACTERIES D'INTERET MEDICAL

Les principaux groupes de bactéries d'intérêt médical peuvent déjà être définis sur base de quelques caractères seulement : morphologie, affinités tinctoriales, présence de spores, mobilité, croissance en aérobiose et/ou en anaérobiose, production de catalase, test de la cytochrome-oxydase, utilisation du glucose par oxydation et/ou par fermentation.

La recherche d'autres propriétés bactériennes, principalement la capacité de produire des enzymes et de métaboliser des substrats divers, permet de poursuivre l'identification, de préciser le nom d'espèce et même parfois de distinguer certaines particularités au sein de l'espèce.

A cette fin, on peut avoir recours à des **méthodes conventionnelles** (exemple : mise en évidence de l'utilisation d'un sucre par incorporation de ce sucre et d'un indicateur de pH dans un milieu de culture).

On peut aussi utiliser des **systèmes commercialisés** prêts à l'emploi. Par exemple : bioMérieux s.a., Marcy l'Etoile, France, proposent différents types de galeries miniaturisées adaptés chacun à un groupe de bactéries préalablement défini.

Les cultures pures

Les prélèvements pathologiques peuvent contenir différents micro-organismes qu'il faudra isoler avant d'en effectuer l'identification. La méthode des stries permettant d'obtenir des colonies distinctes à partir d'un inoculum liquide ou solide, il sera dès lors très facile de prélever une seule colonie de chaque type pour procéder à l'identification.

L'identification de la majorité des bactéries habituellement rencontrées est alors précisée dans un délai de 24 à 48 h :

- **A l'aide de tests d'orientation rapide** : oxydase, catalase,... (voir « exercice pratique »)

- **Par ensemencement d'une galerie biochimique adaptée :**
Identification par un ensemble de réactions du métabolisme intermédiaire à l'aide de galeries de caractères :



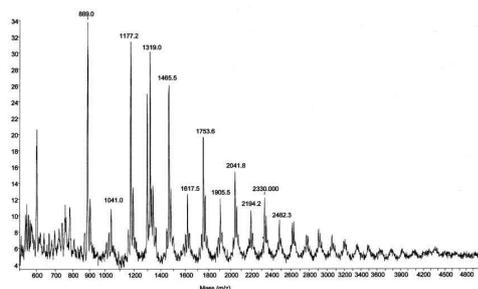
- **Recherches complémentaires :** il peut être nécessaire de déterminer les **propriétés antigéniques** par des réactions d'agglutination sur lame à l'aide d'immun sérums (streptocoques, ...).
- Il existe des **automates**, qui réalisent des identifications :
 - Vitek-2 : Identification à partir d'une culture pure en ~5 à 15h

Identification automatisée par tests colorimétriques basés sur les caractères biochimiques du micro-organisme.



- MALDI-TOF : Identification à partir d'une culture pure en ~10 minutes

Identification par spectrométrie de masse : Ionisation du micro-organisme par un laser, séparation des ions obtenus en fonction de leur masse et charge. Obtention d'un spectre de masse dont les pics correspondent à des protéines spécifiques de chaque micro-organisme. Comparaison du spectre obtenu avec les spectres présents dans la librairie de spectres et identification du micro-organisme.



C. LES AGENTS ANTIBACTERIENS

Les agents antibactériens peuvent être bactéricides ou bactériostatiques. Chaque agent peut être caractérisé par un spectre d'activité plus ou moins large selon le nombre d'espèces bactériennes.

Certaines bactéries sont naturellement sensibles ou résistantes aux antibiotiques. Il existe deux types de résistance :

- les résistances naturelles,
- les résistances acquises par mutation ou par acquisition d'un gène de résistance.

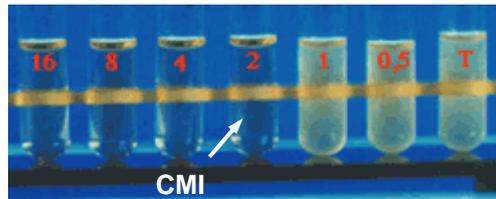
C'est pourquoi, il s'avère utile d'évaluer *in vitro* la sensibilité d'une bactérie isolée dans un prélèvement pathologique à certains antibiotiques.

Il existe plusieurs méthodes :

Détermination de la concentration minimale inhibitrice : CMI

1- La méthode par dilution :

Elle permet de déterminer la plus petite concentration (exprimée en microgrammes/ml) capable d'inhiber la croissance de la bactérie considérée (concentration minimale inhibitrice ou CMI). Cette méthode de référence est une technique lourde qui tend à être supplantée par le système Etest.



2- La méthode par diffusion en gélose ou méthode de Kirby-Bauer:

Fondée sur des gradients de concentration, c'est la méthode manuelle la plus couramment utilisée. Elle est fondée sur le fait qu'un disque imprégné d'antibiotique et «déposé» sur une gélose nutritive préalablement inoculée par la suspension bactérienne à tester, va diffuser suivant un gradient de concentration, et que la bactérie ne se développera pas en présence de concentrations égales ou supérieures à la concentration minimale inhibitrice.

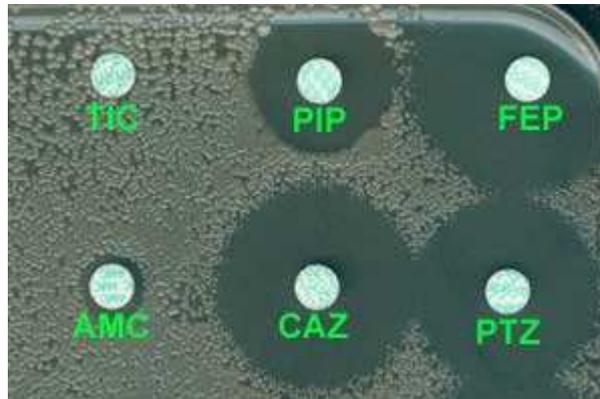
Le procédé emploie des disques de 6 millimètres de diamètre dont le papier a été imprégné d'un antibiotique à concentration connue.

Méthode :

A partir d'une suspension de bactéries, on inocule de manière standardisée une gélose nutritive. On dépose ensuite sur cette gélose des disques imprégnés d'antibiotique, qui va libérer un gradient progressivement décroissant d'antibiotique au fur et à mesure de l'éloignement du disque (diffusion centrifuge).

Après incubation et croissance, on peut observer une zone circulaire d'inhibition autour du disque dont le diamètre sera plus ou moins grand suivant la sensibilité de la souche à l'antibiotique.

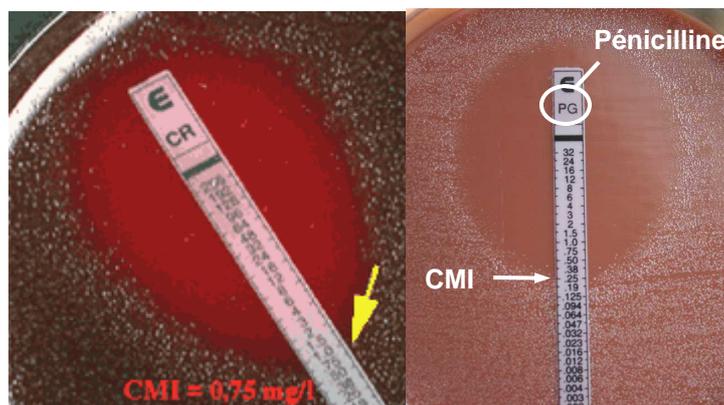
Une table de concordance entre les diamètres d'inhibition et l'interprétation de la sensibilité (sensible – intermédiaire – résistant) est alors utilisée afin d'interpréter les résultats.



TIC = Ticarcilline, PIP = Pipéracilline ; FEP = Céfépime ; AMC = Amoxicilline-Ac.clavulanique ; CAZ = Ceftazidime ; PTZ = Pipéracilline-Tazobactam

3- Le système Etest :

Celui-ci comprend une bandelette mince et inerte avec un gradient exponentiel d'antibiotique sur une face, le code de l'antibiotique et une échelle de lecture sur l'autre face. Les bandelettes sont appliquées sur la surface d'une gélose inoculée. Après la période d'incubation requise pour que la croissance de la bactérie devienne visible (± 18 h), on peut lire une ellipse d'inhibition. Au point d'intersection de l'ellipse et de la bandelette, la concentration de l'antibiotique testé interrompt la croissance de la bactérie et cette valeur correspond à la CMI.



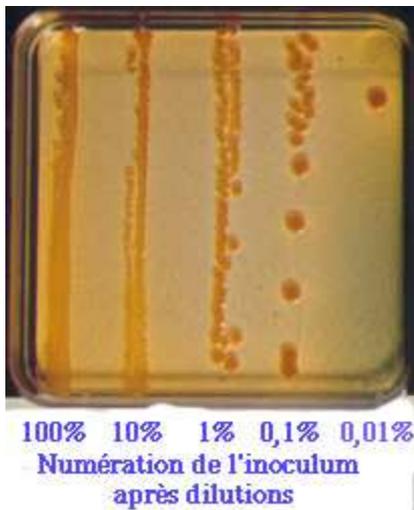
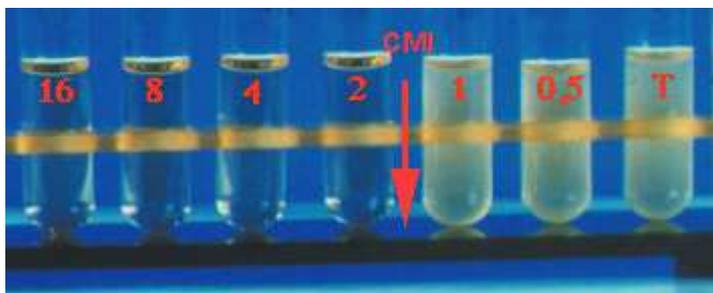
4- Automate : Vitek-2

Antibiogramme automatisé : A l'aide de cartes « antibiogramme » adaptées à chaque type de bactéries, VITEK-2 mesure la croissance bactérienne dans un puits de

contrôle et dans les puits contenant des antibiotiques à différentes concentrations.
Détermination de la CMI.

Détermination de la concentration minimale bactéricide: CMB

- **Définition :** La plus faible concentration d'antibiotique capable d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries d'un inoculum (< 0,01% de survivants)
- Valeur indicatrice du **pouvoir bactéricide** d'un antibiotique
- Sa détermination consiste à mesurer les survivants (%) dans les tubes sans croissance visible (aux concentrations respectives de 2, 4 et 8 mg/l dans l'exemple) et à comparer semi-quantitativement à la gamme témoin obtenue au temps 0 par dilution de base 10.



- Notion importante, notamment dans les infections sévères.

Lorsque la CMI est proche de la CMB, un antibiotique peut être considéré comme bactéricide.

EXEMPLE DE METHODE D'IDENTIFICATION : STREPTOCOQUES.

1. Les antigènes bactériens de surface.

La mise en évidence d'antigènes bactériens de surface peut contribuer à l'identification de certaines espèces bactériennes, et peut présenter un intérêt, notamment épidémiologique.

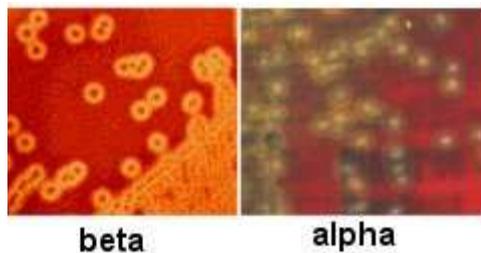
Groupes sérologiques

La classification de Lancefield permet de subdiviser les streptocoques en 20 groupes par la caractérisation immunologique d'antigènes de surface, habituellement des polysaccharides (polyoside C). Les sérogroupes A, B et D sont les plus importants en médecine.

Certaines espèces ne sont pas typables.

2. Hémolyse

Sur gélose au sang, les colonies peuvent être entourées d'une zone circulaire d'hémolyse. Celle-ci est de type β lorsque l'hémolyse des globules rouges est complète, ce qui entraîne l'apparition d'une zone incolore et transparente. Lorsque l'hémolyse des globules rouges est partielle, on parle d'hémolyse de type α , la zone présente alors une coloration verdâtre.



3. Sensibilité à l'optochine

L'optochine est un composé **antiseptique à action sélective sur *Streptococcus pneumoniae***. La sensibilité à cet antibiotique est un test d'orientation, permettant de différencier les pneumocoques (*S. pneumoniae*) qui sont sensibles, des autres streptocoques.



Streptococcus pneumoniae

4. Sensibilité à la bacitracine

Les streptocoques du groupe A (*S. pyogenes*) se distinguent parmi les streptocoques β hémolytiques par leur sensibilité à un antibiotique : la bacitracine. En effet, **95 % des souches de Streptocoques A sont sensibles à la bacitracine** alors que seulement 4 % des Streptocoques des autres groupes le sont.

La recherche de la sensibilité à la bacitracine, en présence d'un Streptocoque β - hémolytique, constitue ainsi un test d'orientation vers *S. pyogenes*.

**Tests permettant de différencier les principaux streptocoques d'intérêt
médical :**

Espèce	Hémolyse	Groupe sérologique	Optochine	Bacitracine
- <i>S. pyogenes</i>	β	A	Résistant	Sensible
- <i>S. agalactiae</i>	β	B	Résistant	Résistant
- <i>S. bovis et</i> <u>Entérocoques</u>	Variable	D	Résistant	Résistant
- <i>Strepto. viridans</i> (diverses espèces)	α	Non groupable	Résistant	Résistant
- <i>S. pneumoniae</i>	α	Non groupable	Sensible	Résistant

L'EXERCICE PRATIQUE

Identification des bactéries et des champignons présents dans un échantillon clinique :

Bien que la théorie exposée dans ce syllabus ne porte que sur les bactéries, vous observerez également sur les boîtes de Pétri qui vous seront distribuées des colonies de levures et de champignons filamenteux (dont la théorie vous aura été présentée en cours) car cela correspond davantage à la réalité des échantillons cliniques.

1. Culture sur différents milieux :

Gélose au sang :

Avantage de ce milieu : permet la croissance de la plupart des bactéries à Gram + et – même des plus exigeantes au point de vue nutritionnel.

Inconvénient de ce milieu: si plusieurs types de bactéries sont présents dans l'échantillon, il sera impossible d'obtenir une culture pure pour poursuivre l'identification.

Gélose MacConkey :

Permet d'obtenir la croissance des Gram – uniquement (inhibition des Gram+)

Permet de distinguer les colonies utilisant le lactose (roses) de celles qui ne l'utilisent pas (transparentes)

Gélose acide nalidixique-colimycine :

Permet d'obtenir la croissance des Gram + uniquement (inhibition des Gram-)

Gélose sabouraud-chloramphénicol-gentamicine:

Permet la croissance sélective des levures et des champignons filamenteux.
Les bactéries sont inhibées.

1.1. Observer l'aspect des colonies (forme, taille, couleur,...)

1.2. L'utilisation de ces **4 milieux** permet de préciser si l'échantillon contient uniquement des bactéries à Gram+ ou à Gram- ou un mélange des deux ou si l'échantillon contient des levures.

2. Examen direct des colonies après coloration de Gram :

La réalisation d'un frottis bactérien et fongique à partir des différentes colonies obtenues sur les différents milieux utilisés, et leur observation au microscope optique après avoir réalisé une coloration de Gram, confirmeront le type de bactéries ou de champignons contenus dans l'échantillon.

2.1. Préparation du frottis :

- Déposer 1 goutte d'eau stérile sur une lame en verre à l'aide d'une pipette stérile
- Prélever une colonie bactérienne ou fongique à l'aide d'une oese stérile, et la mélanger à la goutte d'eau
- Laisser sécher à l'air ambiant.

2.2. Réaliser une coloration de Gram :

- Le frottis fixé est coloré pendant 1 minute avec une solution de **violet de crystal**.
- Il est ensuite **rincé** sous un filet d'eau claire
- On ajoute une **solution iodo-iodurée de Lugol** agissant comme «mordant », et le frottis est maintenu dans ce milieu pendant 1 minute.
- Après lavage à l'eau claire,
- on verse goutte à goutte sur la lame inclinée un mélange **alcool-acétone** (pendant 20 secondes).
- Dès que le solvant s'écoule clair, il faut sans tarder arrêter son action par un grand lavage à l'eau et bien égoutter.
- Le frottis est alors soumis à une coloration de contraste en le traitant avec une solution de **safranine** pendant 30 secondes,
- **rincé** soigneusement à l'eau claire
- et **séché** à l'air libre ou délicatement entre deux feuilles de papier buvard.

2.3. Observer le frottis coloré au microscope (40x puis 100x) :

Les bactéries non décolorées par l'alcool sont dites à **Gram positif** ; elles apparaissent en **violet** tandis que les bactéries à **Gram négatif**, décolorées par l'alcool et recolorées par le colorant de contraste, apparaissent en **rose**.

Les levures et filaments mycéliens apparaissent **Gram positif**.

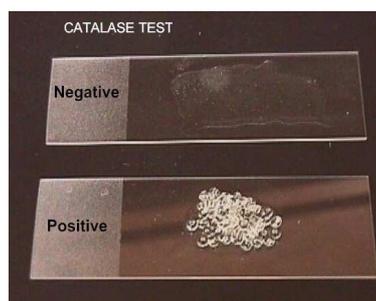
3. Activités biochimiques :

Recherche d'activité enzymatique permettant d'orienter le diagnostic.

Réaliser le test adéquat (catalase ou cytochrome-oxydase) en fonction du type de bactérie que vous avez en culture : coque gram positif ou bacille gram négatif :

3.1- Production de catalase.

- **Principe** : mise en évidence par une production d'oxygène (test positif) lorsque la bactérie est mise en contact avec du peroxyde d'hydrogène.
- **Utilité du test** : différenciation des bactéries de type **coque à Gram +**
- **Mode opératoire** : le test consiste à transférer au moyen d'une oese un fragment de colonie dans une goutte d'eau oxygénée placée sur une lame de verre : la présence de catalase donne lieu à l'apparition de bulles d'oxygène.
- **Interprétation** : *par exemple* : les staphylocoques présentent une réaction positives et sont dits « catalase-positifs » tandis que les streptocoques sont « catalase-négatifs ».



3.2- Production de cytochrome-oxydase.

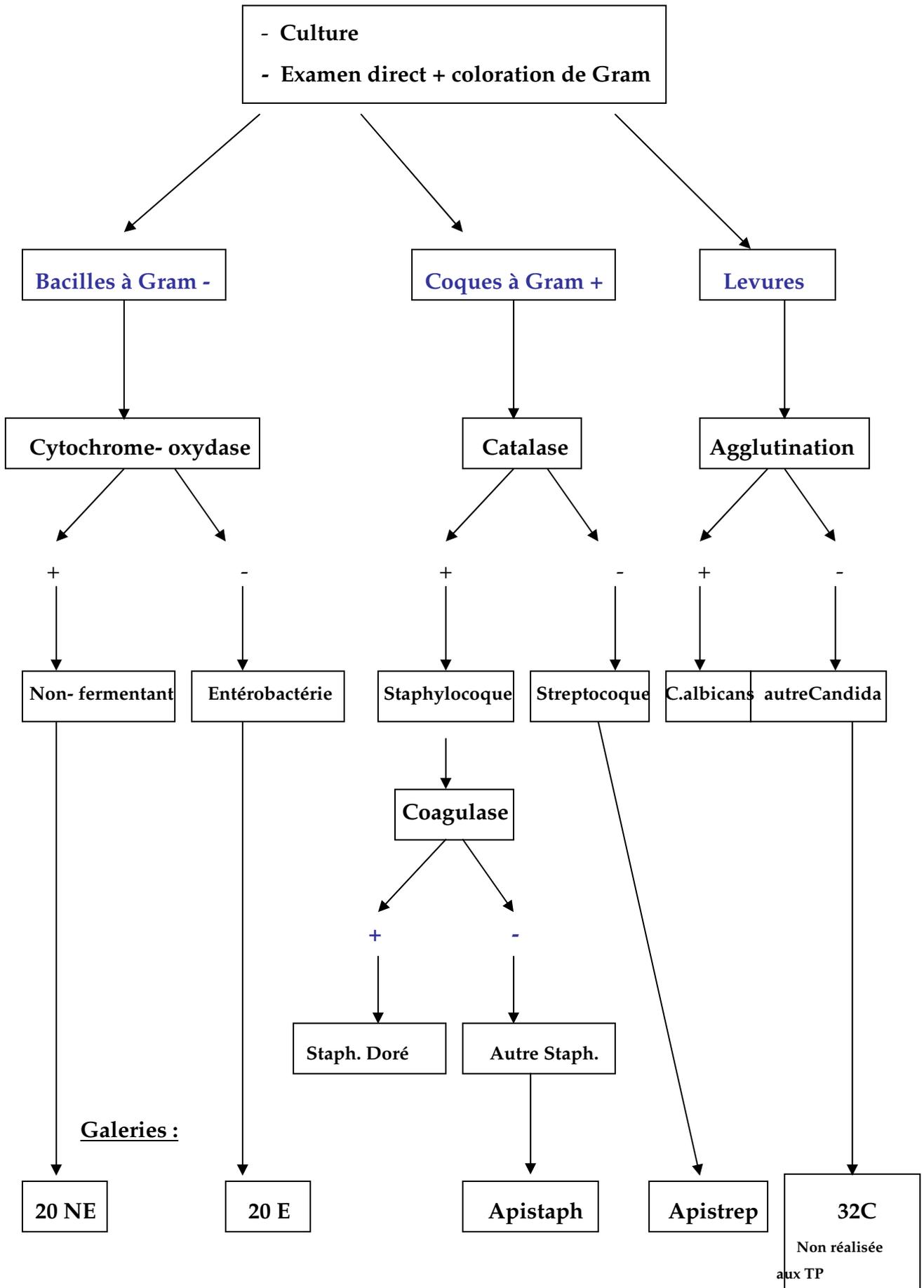
- **Principe** : ce test établit si une bactérie contient un certain type de cytochrome dans sa chaîne respiratoire. L'oxydation de substrat chromogène comme la

tétraméthyl-p-phénylènediamine entraîne l'apparition d'une couleur violette intense.

- **Utilité du test** : identification phénotypique selon la production d'enzyme : différenciation des **bacilles à Gram –**
- **Mode opératoire** : on utilise une bandelette de papier imprégnée du réactif, le N diméthyl paraphénylène diamine, sur laquelle un fragment de colonie est étalé au moyen d'une oese. Les espèces contenant l'oxydase donnent en 30 secondes au maximum une réaction positive, de coloration violette.
- **Interprétation** : certaines bactéries non fermentantes comme le *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) sont cytochrome- oxydase positive tandis que les Entérobactéries, ne réagissent pas (cytochrome- oxydase négative)

Des étapes réalisées précédemment (observation des milieux de culture, lecture du frottis bactérien après coloration, réalisation des tests oxydase OU cytochrome oxydase), vous connaissez le type de bactérie en présence :

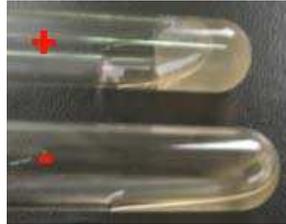
- soit Staphylocoque
- Soit Streptocoque
- Soit entérobactérie
- Soit bacille gram négatif non fermentant
- Soit levure



4. Identification des Staphylocoques : coagulase.

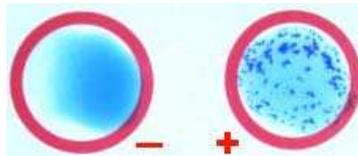
Ce test, mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma, est le principal test caractérisant *S. aureus*. Il permet donc de différencier le Staphylocoque doré des Staphylocoques- coagulase négative.

Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma de lapin et de la souche à tester. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90°C.



En pratique, la détection de la coagulase est obtenue par un **test d'agglutination**.

Plusieurs tests d'agglutination détectant un ou plusieurs antigènes ou récepteurs de surface (récepteur pour le fibrinogène, protéine A, antigènes capsulaires) sont commercialisés.



Le test de la coagulase permet l'identification de 99% des souches de *S. aureus* mais certaines souches ne produisent pas de coagulase. L'identification de l'espèce est dans ce cas réalisée par d'autres tests.

→ réaliser un test de coagulase sur les deux souches de Staphylocoques.

5. Identification des bactéries au moyen de galerie de caractères

Il est possible d'identifier les bactéries selon des caractères biochimiques liés à la production d'enzymes spécifiques de l'espèce. Le système API consiste en une galerie d'identification comportant un certain nombre de tests biochimiques standardisés et miniaturisés. Il existe différents types de galeries miniaturisées adaptés chacun à un groupe de bactéries préalablement défini, par exemple les

entérobactéries, streptocoques, les staphylocoques, les bacilles à Gram – non entérobactéries et non fastidieux, etc.

→ Ces galeries permettent ainsi l'identification phénotypique des bactéries, en associant les différents caractères biochimiques.

Lors des TP, vous avez le choix entre 4 types de galeries d'identification. Vous devez choisir la galerie qui vous permettra d'identifier précisément la bactérie :

- galerie pour l'identification des Streptocoques
- galerie pour l'identification des Staphylocoques
- galerie pour l'identification des Entérobactéries
- galerie pour l'identification de B- non fermentants.

Méthode : la galerie comporte des microtubes contenant des substrats déshydratés.

- Inoculer ces microtubes avec une suspension bactérienne, **en respectant scrupuleusement le mode d'emploi** qui vous est fourni lors des TP.

- Incuber les galeries à l'étuve (37°C) pendant 24 à 48 h selon le type de galerie.

Révélation de la galerie (lors de la 2^{ème} séance de TP, voir plus loin).

6. Identification des levures

Levures : agglutination des antigènes de *Candida albicans*, espèce la plus fréquemment isolée dans les levures d'intérêt médical.

Déposer une goutte de diluant sur une lame puis réaliser une suspension avec une fraction d'une colonie prélevée à l'öse puis déposer le latex sensibilisé avec des anticorps monoclonaux spécifiques de l'espèce *C. albicans* sur la suspension. Appliquer un mouvement de rotation à la suspension pendant deux à trois minutes.

Agglutination = *C. albicans*

Absence d'agglutination = *C. non albicans* (autre espèce). Dans ce cas l'étude est complétée par la réalisation d'une galerie de type API 32C qui permet d'identifier toutes les espèces de levures.

Les galeries 32c et d'autres techniques d'identification des levures seront détaillées au TP2.

7. Etude de la sensibilité aux agents antibactériens

A. Méthode de Kirby-Bauer.

La réalisation d'un antibiogramme exige des conditions expérimentales rigoureusement définies. Il faut :

- utiliser un milieu de culture conforme standardisé, tel le milieu de Mueller-Hinton agar (ordinaire pour les gram négatifs ou enrichi de sang pour les gram positifs) qui doit être réparti à raison de 25 ml pour la boîte ronde de 90 mm et séché avant emploi (addition éventuelle de 5 % de sang de cheval ou de mouton pour assurer la croissance des bactéries exigeantes);
- préparer une suspension bactérienne dans l'eau distillée stérile à partir de quelques colonies isolées sur milieu gélosé de manière à obtenir un trouble à peine visible (de densité égale au point 0,5 sur l'échelle de McFarland);
- tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer par rotation contre la paroi du tube et le frotter doucement sur toute la surface du milieu en tournant la boîte trois fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum;
- Répartir le disque à la pince en appuyant légèrement pour faciliter l'adhérence (les disques peuvent être différenciés grâce à l'impression sur chacun d'eux d'un sigle et de la charge);
- incuber la boîte renversée dans un délai raisonnable, en général pendant 24 à 48 heures. Ensuite, lecture et interprétation des diamètres d'inhibition de la croissance bactérienne (Résistant, Intermédiaire, Sensible) lors de la prochaine séance de TP.

B. Système E-test. Il faut :

- préparer chacune des suspensions bactériennes (densité égale au point 0,5 sur l'échelle de McFarland) dans une solution stérile de NaCl à 0,9 %;

- ensemencer les milieux : (Mueller Hinton ordinaire ou enrichi de sang) par écouvillonnage selon la technique préconisée dans la méthode de Kirby-Bauer;
- prendre chaque bandelette avec une pince (ne toucher que la partie haute indiquée par le code de l'antibiotique), appliquer à l'aide d'une pince et incuber. Ensuite, lecture et interprétation lors de la prochaine séance de TP.

8. Etude de la sensibilité aux antifongiques

Visualisation de fungitest et sensititre au TP2.

L'EXERCICE PRATIQUE : SUITE

1. Identification de la bactérie.

Révélation des caractères d'identification

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs :

a. Galerie Entérobactéries « API 20E » :

Après incubation à 35-37°C, révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- TDA (Tryptophane DéAminase): ajouter une goutte de réactif TDA ; une couleur marron rougeâtre indique une réaction positive
- IND (INDole production): ajouter une goutte de réactifs Kovacs. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.
- VP (Voges Proskauer : production d'Acétoïne): ajouter une goutte des réactifs VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive.
- noter toutes les réactions spontanées ou induites par l'addition de réactifs en se référant aux instructions du tableau.

b. Galerie non- Entérobactéries « API 20NE » :

Après incubation à 30°C, révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- NO₃ (réduction des Nitrates): ajouter une goutte de réactif NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃ ;
 - après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive

- une réaction négative peut être due à la production d'azote : ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃ : une cupule restée INCOLORE après 5 minutes indique une réaction POSITIVE
- TRP (TRYptophane): ajouter une goutte de réactifs Kovacs. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.
- Tests d'assimilation : observer la croissance bactérienne : une cupule trouble indique une réaction positive
- noter toutes les réactions spontanées ou induites par l'addition de réactifs en se référant aux instructions du tableau.

c. Galerie Streptocoques « API 20 STREP » :

Après incubation à 35-37°C, révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- VP (Voges Proskauer : production d'Acétoïne): ajouter une goutte de réactif VP 1 et VP 2
- HIP (Acide HIPpurique): ajouter 2 gouttes de NIN
- De PYRA (PYRolidonyl Arylamidase) à LAP (Leucine Amino Peptidase) : ajouter une goutte de ZYM A et ZYM B

Attendre 10 minutes puis lire toutes les réactions en se référant au tableau de lecture.

d. Galerie Staphylocoques « ID 32 STAPH » :

Après incubation à 35-37°C, révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- NIT : ajouter une goutte de réactif NIT 1 et NIT 2
- VP : ajouter une goutte de réactif VP 1 et VP 2
- De βGAL à PyrA : ajouter une goutte de FB

Attendre de 5 à 10 minutes puis lire toutes les réactions en se référant au tableau de lecture.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture.

Exemple : fermentation des sucres : la bactérie ensemencée dans la galerie ci-dessous fermente le glucose (GLU), se traduisant par une réaction positive en jaune, mais ne fermente pas le xylitose (XLT) , se traduisant par une réaction négative en rouge.



- **Identification :**

- Détermination du profil numérique :

- Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de 3 et une valeur 1,2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient un code numérique (ex. : 7 chiffres pour les galeries API 20E)

- Identification :

- Elle est obtenue à l'aide du catalogue analytique correspondant à la galerie en recherchant le profil numérique dans la liste des profils.

2. Identification des levures

Les levures sont identifiées sur différents critères :

- Caractères cultureux ; délai de croissance, T°C optimale, aspect macroscopique de la colonie en fonction du milieu de culture.
- Morphologie cellulaire: forme, coloration de la paroi, présence ou absence d'une capsule.
- Structure antigénique : détection des antigènes de paroi par des anticorps monoclonaux (exemple: le BICHRO- LATEX ALBICANS est un test au latex qui permet l'identification directe de *Candida albicans* à partir des colonies de levures).
- Activités biochimiques : production d'enzymes.

- Milieux à base de substrats chromogènes inclus dans la gélose. Ce type de milieu permet à la fois l'isolement et l'identification : exemple le milieu CHROMagar® Candida



Candida glabrata (rose) *Candida kruzei* (rose pale)
Candida albicans (vert) *Candida tropicalis* (bleu violet)

- Galerie d'identification :

Identification par un ensemble de réactions du métabolisme intermédiaire ou utilisation de l'assimilation des sucres (auxanogrammes) sous forme de galeries type API (exemple : galerie Api candida ; ID 32 C).

Api Candida



Api 32 C



- Génotypage; intérêt uniquement en épidémiologie.
- Biologie moléculaire : la PCR et le séquençage peuvent être un recours dans les cas où l'identification est réellement difficile mais ils ne constituent en aucun cas une technique de routine.

La combinaison de tous les paramètres n'est pas toujours nécessaire et l'utilisation de telle ou telle méthode varie en fonction des laboratoires.

3. Lecture et interprétation des tests de sensibilité :

3.1 Bactéries

- Méthode de Kirby-Bauer.

En pratique, il faut mesurer le diamètre de la zone d'inhibition pour chaque antibiotique (en mm), et le comparer aux valeurs de référence fixant la sensibilité de l'espèce bactérienne au type d'antibiotique examiné.

- Sensible (S) : la souche peut être atteinte par un traitement à dose habituelle par voie générale;
- Résistante (R) : la souche ne pourra probablement pas être atteinte, quel que soit le type de traitement;
- Intermédiaire (I) : la souche peut être atteinte par un traitement local, par une augmentation des doses par voie générale ou par une concentration physiologique particulière (urine, bile,...).

- Système Etest.

Après la période d'incubation, lire directement la valeur de la CMI correspondant à l'intersection des deux ellipses d'inhibition.

Vérifier que la sensibilité obtenue à l'aide des deux méthodes correspondent pour un même antibiotique.

3.2 Levures

- Lecture d'un antifongigramme en milieu liquide.

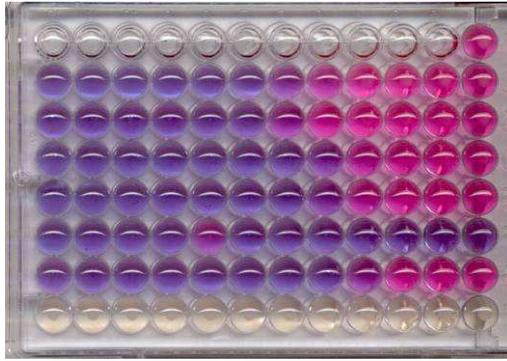
Ce sont des tests en microdilution réalisés dans des cupules ou plaques de microtitration.

Ces tests sont pour certains des répliques du test de référence.

Exemple : **Fungitest** : test à deux concentrations utilisé pour les levures. Il permet de déterminer des zones de sensibilité (cf. photo)



Sensititre : test à 12 concentrations de 7 antifongiques utilisé pour les levures. Il permet de déterminer des CMI (concentration minimale inhibitrice).(cf. photo).



Sensititre réalisé sur une culture de *Candida vis*
à vis de 6 antifongiques.

Démonstration de la lecture d'un antifongigramme (tests commercialisés) applicable aux levures par technique de microdilution (Fungitest® et Sensititre®).

Quelle information supplémentaire vous apporte le Sensititre® par rapport au Fungitest ?

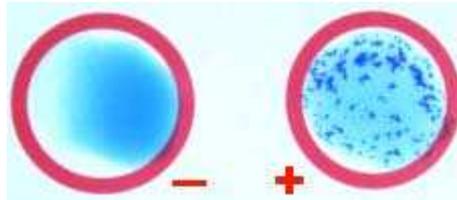
4. Groupage sérologique rapide des streptocoques au moyen de réactifs commercialisés (Slidex Strepto-kit de bioMérieux)

Ce groupage est établi à l'aide d'une réaction d'agglutination. Il va vous permettre d'orienter le diagnostic d'espèce du Streptocoque que vous avez en culture.

La technique comporte les étapes suivantes :

- extraction enzymatique des antigènes : une suspension de colonies dans la solution d'extraction (pronase) a été incubée 1 heure à 37°C;
- bien homogénéiser les suspensions de latex sensibilisées par des immunoglobulines de lapin spécifiques de groupes (A,B,C et D) ;
- déposer une goutte de latex dans chacun des cercles de la carte de réaction ;
- déposer une goutte de solution contenant les antigène du Streptocoque extraits, à côté de chaque suspension de latex ;
- mélanger soigneusement le contenu de chaque cercle au moyen d'un bâtonnet (ATTENTION : changer d'embout à chaque cercle !!!);

- donner à la carte un léger mouvement de rotation pendant 2 minutes au maximum ;
- une agrégation visible des particules de latex indique une réaction positive.



- Quel est le sérotype du Streptocoque que l'on vous a distribué?
- Si le sérotype obtenu ne vous permet pas d'identifier l'espèce, en fonction du type d'hémolyse, vous est-il possible de préciser avec plus d'exactitude de quelle espèce il s'agit ?
- Si non, de quel(s) test(s) complémentaire(s) auriez- vous besoin pour identifier précisément l'espèce du Streptocoque ?

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHE IMMUNOLOGIQUE D'ANTIGENES ET D'ANTICORPS.

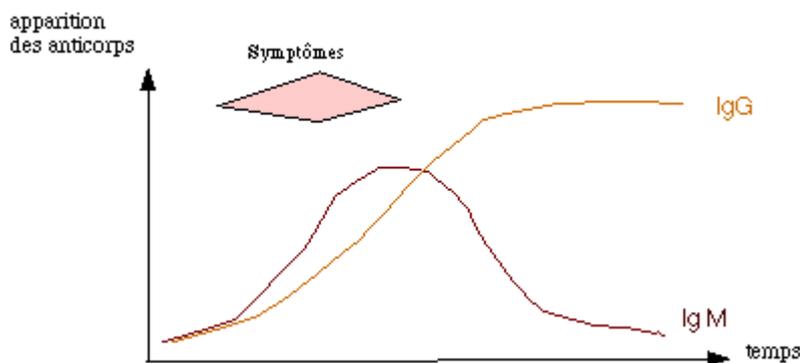
Objectifs: Connaître les différentes méthodes de diagnostic d'une infection.

La présence d'une infection virale, bactérienne ou parasitaire repose sur la mise en évidence de l'agent infectieux, d'antigènes, du génome, ou encore sur la mise en évidence d'une réponse sérologique.

Le diagnostic sérologique se base sur la mise en évidence d'une production d'anticorps à la suite d'une infection. La réponse immunitaire se développe après un **délat minimum de 8 à 10 jours**. Par ailleurs certains tests génèrent des réactions croisées, et sont donc moins spécifiques (ex. : recherche d'IgM dans le diagnostic d'une Toxoplasmose). La **sensibilité** varie selon le type de technique utilisée.

Pour le diagnostic d'une infection en cours, il est important d'analyser **deux prélèvements consécutifs** à 10-15 jours d'intervalle, pour observer une modification significative du taux d'anticorps. En phase aiguë, les **IgM** apparaissent après 7 jours environ et disparaissent rapidement (quelques mois) ; les **IgG** sont d'apparition plus tardive, après quelques semaines, et peuvent persister très longtemps, durant des années.

Réponse sérologique :



Prélèvements : Sérum principalement, prélèvements divers (respiratoires, urines, LCR,...).

Techniques :

1. Principe de la réaction ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) :

→ Permet de détecter des **antigènes** ou des **anticorps**, et de les quantifier.

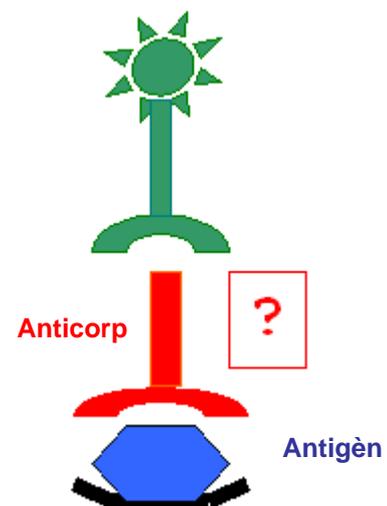
1.1. Détection des anticorps.

L'antigène, couplé avec un marqueur permettant de l'identifier, est mis en présence de l'anticorps présent dans le sérum. On dose ensuite le marqueur, une enzyme couplée au complexe Antigène - Anticorps. C'est une réaction **d'immuno-enzymologie**.

Dans chaque cas se produit une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps présent.

Ce type de dosage existe pour de nombreux virus (CMV, EBV, Influenza,...), pour des parasites (*Toxoplasma gondii*) ainsi que pour des bactéries intracellulaires (*Chlamydia*, *Mycoplasma*) ou non (*Borrelia*).

- **Formation d'un complexe antigène - anticorps**
 - anticorps (Ac) présents dans le sérum
 - antigène (Ag) adsorbé sur un support plastique
- **Détection du complexe antigène-anticorps :**
par fixation d'un **anticorps anti-immunoglobuline humaine** marqué par une enzyme
- **Ajout d'un substrat chromogène**, qui réagit avec l'enzyme, et production d'une réaction colorée si l'Ac est présent dans le sérum.



Exemple d'appareils de distribution de sérums et de gestion des méthodes ELISA :



Aspect d'une plaque de réaction ELISA en fin de manipulation : les puits fortement colorés correspondent à des sérums positifs pour la réaction ELISA, contenant donc les anticorps recherchés. La lecture automatisée des densités optiques est réalisée sur un spectrophotomètre.



- **Indication :**
 - Mise en évidence d'anticorps apparaissant au cours d'une infection plus ou moins récente par un virus , une bactérie ou un parasite ;
 - Détermination de l'immunité vis-à-vis d'un pathogène ;
 - Etudes épidémiologiques.
- **Limites :**
 - Sensibilité moindre chez certains patients : nourrissons, personnes immunodéprimées, femmes enceintes
 - Interprétation parfois délicate.

1.2. Détection des antigènes.

La détection des antigènes se fait selon une méthode semblable à celle reprise ci-dessus. Mais dans le cas présent, c'est un anticorps (et non plus un antigène),

couplé avec un marqueur permettant de l'identifier, qui est utilisé pour détecter l'antigène présent dans le sérum.

2. Les méthodes de diagnostic « rapide » des antigènes:

Exemple : Recherche d'antigène soluble de *Legionella pneumophila* dans les urines.

Ce test apporte un diagnostic étiologique en cas de présomption d'infection à *Legionella* en parallèle avec la culture de prélèvements respiratoires.

Les avantages de ce test sont : **précocité** (dès le début des signes), **simplicité** (sur urines), **rapidité** (en + 15 minutes).

Principe du test : immunochromatographie : Un anticorps, dirigé contre l'antigène recherché dans le liquide biologique, est fixé sur une bandelette. Lors de la migration du liquide le long de la bandelette, les antigènes présents dans le liquide vont se fixer sur les anticorps de la bandelette, donnant lieu à une réaction colorée.



Ex. Recherche d'antigène de Legionella dans les urines

Autres tests fondés sur le même principe: recherche d'antigène de *Plasmodium* dans le sang

3. Immunofluorescence :

L'immunofluorescence est appliquée :

- à la détection d'antigènes présent dans les cellules : par ex. virus *Influenza* dans les cellules respiratoires, virus *Herpes* dans les cellules cutanées
- à la détection d'anticorps (*Chlamydia*, *Legionella* p.e.) circulant dans le sérum

3.1. Détection d'antigènes.

Elle permet de visualiser directement la présence d'antigènes dans les cellules infectées à l'aide d'un anticorps spécifique du micro-organisme recherché. Ces méthodes permettent d'obtenir un résultat en quelques heures. La qualité du prélèvement conditionne le résultat.

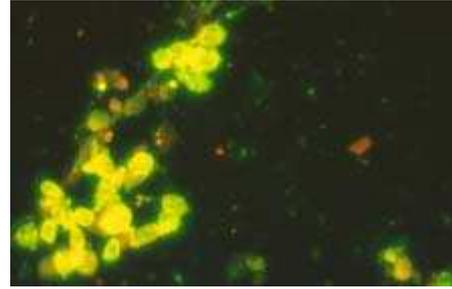
Des antisérums (mono ou polyclonaux) peuvent être utilisés pour mettre en évidence les antigènes viraux dans les liquides biologiques, à partir de cellules desquamées ou encore dans les leucocytes circulants. De telles méthodes sont souvent très sensibles, car elles détectent les antigènes des fractions virales qui ne sont plus cultivables. Elles ont cependant l'inconvénient d'être spécifiques d'un seul agent pathogène, c'est-à-dire qu'il faut un examen séparé pour chaque pathogène testé. Les tests immunologiques utilisés varient selon la méthode de détection du complexe antigène - anticorps utilisée.

Le prélèvement est d'abord fixé sur une lame en verre. Ensuite, on ajoute des anticorps, couplés à un composé fluorescent, dirigés contre l'antigène recherché. On procède ensuite à la lecture de la lame, au microscope à fluorescence.

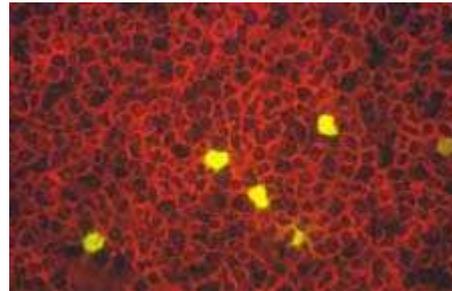
Entre autres, elle fournit un diagnostic rapide et sensible des infections respiratoires (ex. : RSV, Parainfluenzae, virus de la grippe et de la rougeole). Ces virus infectent les cellules de tout l'arbre respiratoire. Ainsi, des cellules desquamées obtenues par aspirations nasopharyngée sont-elles fixées sur des lames de microscope et colorées

avec des antisérums marqués à la fluorescéine, spécifiques de chaque virus, à raison d'un anti-sérum par lame.

Immunofluorescence spécifique du HSV (virus Herpes) sur un frottis vaginal : les cellules infectées présentent une fluorescence jaune - verte.



Antigénémie du CMV positive : les leucocytes marqués par l'anticorps (fluorescence jaune-verte) contiennent une phosphoprotéine du CMV. Le patient, greffé rénal, va bénéficier d'un traitement contre le CMV, même s'il ne présente pas encore de signes cliniques.



- **Indications de la recherche d'antigènes par immunofluorescence:**

Permettre une prise en charge spécifique et rapide du patient dans certaines circonstances :

- pré- partum (Herpes),
- infections respiratoires (Grippe, Virus Respiratoire Syncytial, virus Parainfluenza, Adénovirus),
- diarrhées du nourrisson (Rotavirus, Adénovirus),
- recherche d'une infection à CMV infra-clinique chez un patient immunodéprimé (antigénémie pp65).

- **Avantage :**

rapidité d'obtention du résultat : 20 minutes à 4 heures

- **Limites :**

- Manque de sensibilité + + +. Un résultat négatif n'exclut pas le diagnostic.
- Immunofluorescence : lecture au microscope fonction de l'expérience de l'observateur.

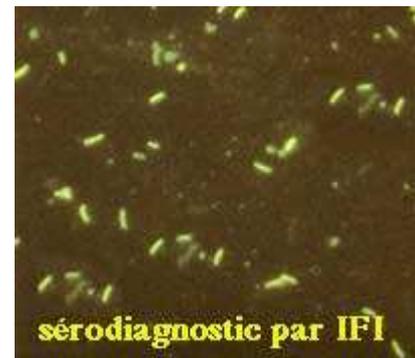
3.2. Détection d'anticorps.

L'antigène correspondant à l'anticorps recherché est fixé sur une lame en verre.

On y ajoute le sérum du patient, et ensuite un anticorps marqué, dirigé contre l'anticorps à rechercher. Si l'anticorps recherché est présent dans le sérum, on observera une fluorescence spécifique lors de l'observation au microscope.

Legionella pneumophila : les anticorps anti-*Legionella* présents dans le sérum se fixent sur des bactéries *Legionella* coatés sur une lame.

Après ajout d'un anticorps marqué à la fluorescéine, qui va se fixer sur les anticorps du sérum qui se sont fixés sur les bactéries, les bactéries de la lame apparaissent fluorescentes.



5. Agglutination de particules de latex :

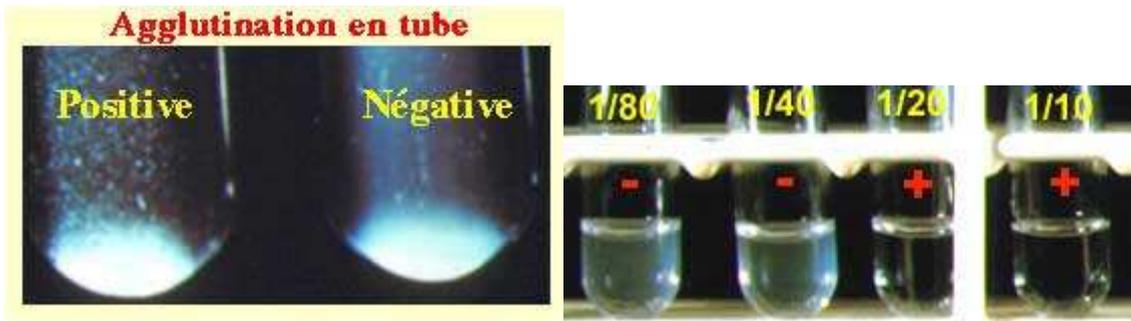
Ces techniques sont utilisées pour la recherche d'anticorps et d'antigènes.

On utilise de petites particules de latex recouvertes d'un antisérum spécifique d'un virus ou d'une bactérie. Si l'antigène (ou l'anticorps) est présent dans l'échantillon, il se fixe aux particules recouvertes d'anticorps, dissociant la solution lactescente en agrégats visibles à l'œil nu.

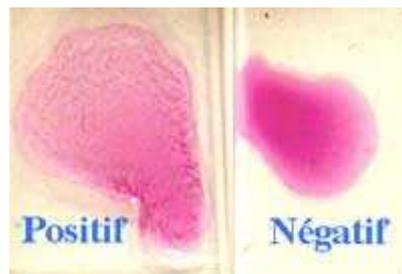
Ces techniques sont en général moins spécifiques et moins sensibles que les dosages ELISA.

Exemples de réaction d'agglutination :

en tubes avec des dilutions du sérum ou de LCR.



sur lame : sérodiagnostic de Wright pour la brucellose, test pour la Syphilis (VDRL-RPR)



Autre application : identification des espèces de Streptocoques (voir exercice pratique).

TROISIEME PARTIE

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Objectifs: Introduction à l'application de l'amplification génique à la Microbiologie.

Le principe consiste à amplifier un gène entier ou non avec des amorces spécifiques (PCR) qui peut être ultérieurement révélé par électrophorèse sur gel, ou par hybridation (hybridation) ou encore séquencé et comparé avec ceux déposés dans des banques (séquençage nucléotidique). Les applications quantitatives deviennent courantes.

Généralités :

La biologie moléculaire regroupe un ensemble de techniques basées sur l'étude, la détection et la modification des acides nucléiques.

Le rôle du laboratoire de microbiologie médicale repose sur l'isolement et l'identification de l'agent pathogène ainsi que l'étude de la résistance aux agents anti-bactériens. Les méthodes dites traditionnelles comprennent l'examen direct, la mise en culture et l'identification. Selon le germe en cause, le délai de réponse peut prendre plusieurs jours, ce qui n'est pas le cas avec les techniques de biologie moléculaire comme la polymérase chain reaction (PCR) qui permettent une réponse beaucoup plus rapide.

A - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de réactions de polymérisation en chaîne permet d'amplifier spécifiquement une séquence définie d'ADN en plusieurs millions d'exemplaires, grâce à des amorces et à l'action d'une ADN polymérase.

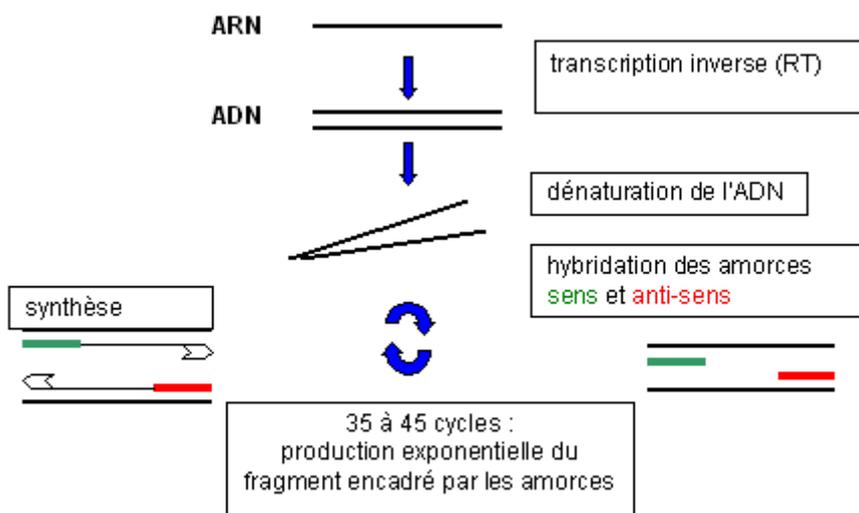
Principe :

A partir d'un prélèvement, l'ADN (ou l'ARN) est extrait.

La méthode d'amplification d'ADN consiste tout d'abord en la séparation par la chaleur des deux brins d'ADN contenant la région à amplifier. L'échantillon est

alors mélangé avec des amorces complémentaires des séquences nucléotidiques encadrant la région à amplifier. Lorsque l'ADN se refroidit, les amorces, en excès, se fixent à leur séquence complémentaire sur l'ADN cible, puis des nucléotides sont incorporés séquentiellement par une ADN polymérase thermostable, la Taq polymérase ; deux copies de l'ADN cible sont alors produites. Les brins néo synthétisés servent ensuite eux-mêmes de matrice pour initier l'étape de polymérisation du cycle suivant. La répétition des trois étapes (dénaturation, hybridation, polymérisation) aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée (à titre indicatif, une amplification théorique est de 10^6 fois pour 20 cycles).

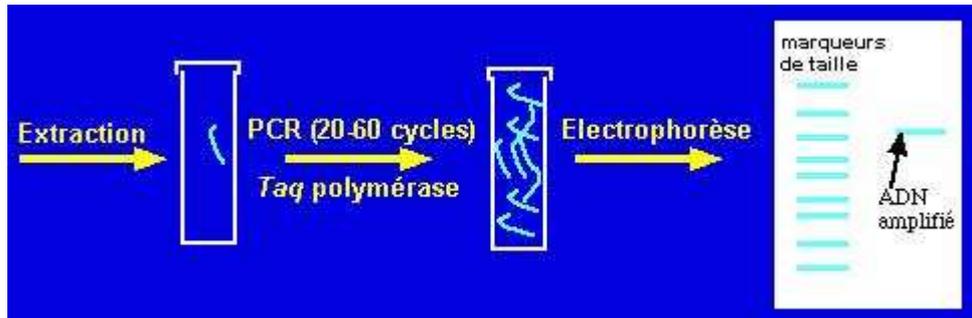
Pour amplifier l'ARN, une étape préliminaire de transcription inverse en ADN est indispensable avant la PCR ; elle est réalisée in vitro grâce à l'action d'une transcriptase inverse (d'origine aviaire ou murine).



B - PCR « classiques »

Après l'amplification génique, il est nécessaire de détecter les acides nucléiques amplifiés. Plusieurs techniques sont disponibles, fournissant un résultat qualitatif :

1) Détection sur gel d'agarose



Un appareil de PCR (thermocycleur) et la révélation UV d'un produit amplifié après électrophorèse sur gel.

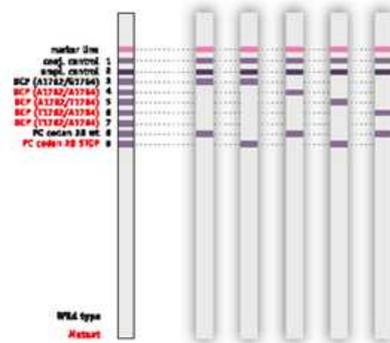
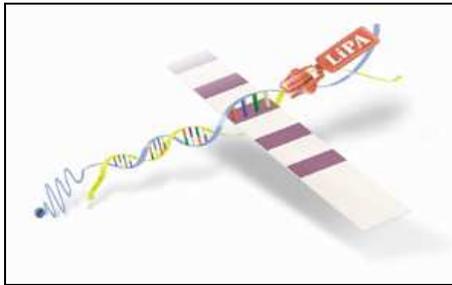


Gel d'agarose après PCR et électrophorèse. Le gel est photographié sous lumière UV. Les signaux positifs apparaissent sous l'aspect de bandes claires nettes (flèche). Le résultat n'est interprétable que s'il existe des témoins positifs (la réaction a fonctionné) et un témoin négatif (il n'existe pas de contamination).



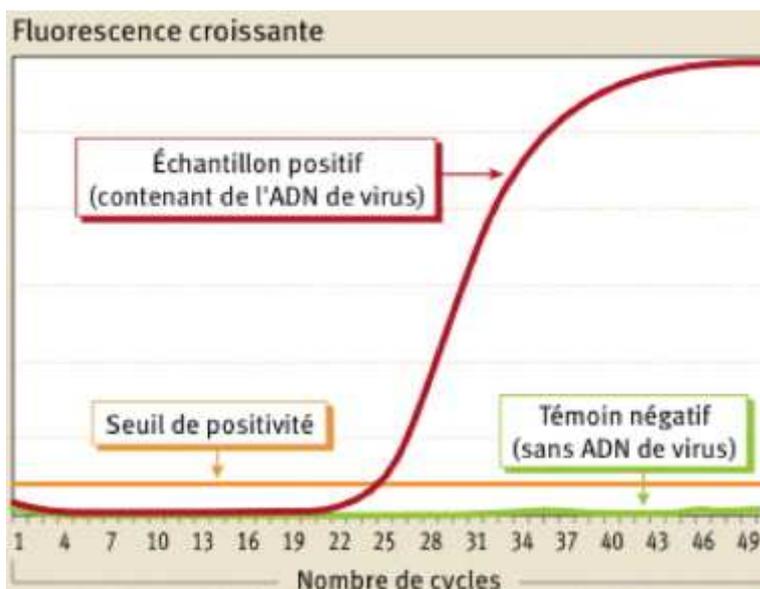
2) Détection par hybridation moléculaire

Une fois amplifié, l'ADN marqué va s'hybrider spécifiquement avec des sondes oligonucléotidiques immobilisées en lignes parallèles sur une bandelette. Après incubation et révélation avec un substrat chromogène, les résultats peuvent être visuellement interprétés.



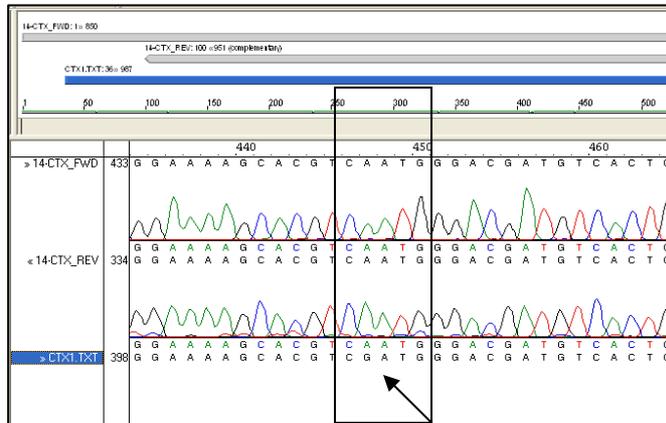
C- PCR « en temps réel »

Les méthodes de PCR en temps réel mesurent la quantité de molécules d'ADN fabriquées pendant le début de la phase exponentielle de la réaction de PCR. Schématiquement, l'ADN fabriqué pendant la PCR est quantifié par incorporation d'une molécule fluorescente ou hybridation de deux sondes spécifiques émettant une fluorescence. Ces thermocycleurs particuliers sont équipés pour la lecture continue (en temps réel) de la fluorescence émise.

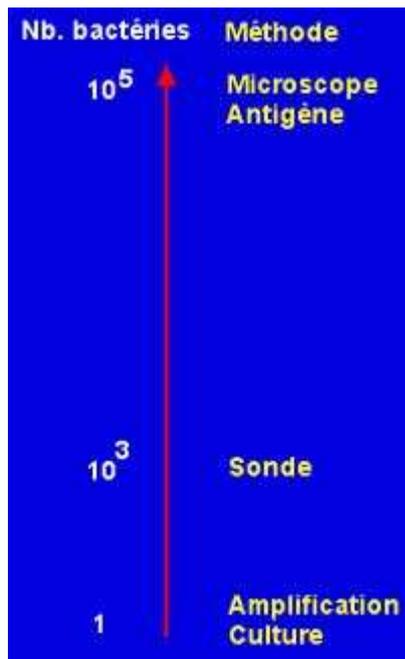


D- Séquençage

Après PCR, il est possible de séquencer le produit amplifié afin d'obtenir la séquence nucléotidique de celui-ci et déterminer la présence éventuelle de mutations.



- **Indications des méthodes de diagnostic moléculaire :**
 - Techniques qualitatives : montrer la présence d'un virus ou d'une bactérie, en particulier lorsque ceux-ci ne sont pas cultivables (HVC), ou que le liquide biologique se prête mal à la culture (LCR).
 - Techniques quantitatives : suivi des patients sous traitement anti-viral (HIV, HVC, CMV, HVB).
 - Séquençage : détection de mutations nucléotidiques
 - associées à la résistance aux anti-viraux (HIV, HVB),
 - caractéristiques des génotypes des virus (HVC, HVB).
- **Intérêts :**
 - Sensibilité remarquable
 - Automatisation possible
 - Gain de **temps** important, notamment pour l'identification des mycobactéries à partir de la culture.



- **Limites :**

- Risques de contamination pour les techniques de PCR.
- Absence de preuve du caractère infectieux du virus détecté.
- Caractérisation phénotypique de la souche impossible.
- Coût encore relativement élevé.

La simplicité et la rapidité d'exécution de la plupart de ces techniques justifient une utilisation de plus en plus routinière dans les laboratoires de biologie.

- **Applications au laboratoire de Microbiologie Médicale :**

Les techniques de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence la plupart des bactéries, des virus, parasites ou champignons :

Exemples :

Détection qualitative:

Bactéries: *Mycobacterium tuberculosis*
 Neisseria gonorrhoeae
 Chlamydia trachomatis...

Virus: Enterovirus
 Herpes simplex
 Influenza A...
Parasites: Plasmodium falciparum
 Toxoplasma gondii...
Champignons : Aspergillus fumigatus

Détection quantitative :

Virus : Cytomégalovirus
 Epstein-barr virus

Les techniques de biologie moléculaire permettent également de mettre en évidence des gènes de résistance présents chez les micro-organismes :

Exemples :

Détection de la présence de beta-lactamases à spectre élargi chez les entérobactéries par « PCR classique » suivie d'un séquençage du gène.

CONCLUSIONS

Un aspect encourageant des progrès accomplis est sans conteste l'**approche moléculaire** avec l'**amplification génique** (PCR) et le **séquençage** de certains gènes. D'autres progrès essentiels sont à attendre dans ce domaine, en particulier pour les diagnostics directement sur produits pathologiques.

BIOLOGIE MOLECULAIRE : Partie pratique

1) Dépôts sur gel d'agarose :

Matériel nécessaire :

- Gel d'agarose 2% précoulé
- Générateur
- Marqueur de poids moléculaire
- Témoin négatif

Mode opératoire :

Cette manipulation sera réalisée par un élève-moniteur :

- Brancher le générateur
- Fixer le gel sur le générateur
- Faire un pré-run du gel
- Retirer le peigne protégeant les puits
- Déposer 10 µl d'eau stérile dans tous les puits

La suite des manipulations sera réalisée par un représentant de chaque groupe :

- Déposer 10 µl de marqueur de poids moléculaire dans un premier puits et 10 µl de témoin négatif dans un second puits.

Quand chaque groupe a réalisé son dépôt, un élève-moniteur va :

- Compléter les puits vides avec 10 µl d'eau stérile
- Brancher le générateur et laisser migrer le gel durant 30 minutes.

Visualisation des résultats :

- Retirer le gel d'agarose du générateur
- Placer le gel sur la plaque du trans-illuminateur
- Recouvrir du verre protecteur
- Brancher les UV
- Observer les bandes résultant de la migration du marqueur de poids moléculaire. Le témoin négatif n'engendre aucune bande.

2) Interprétation des résultats d'une PCR « classique »

Observation des photos de gel qui vous sont proposées. Interprétation des résultats pour la PCR Aspergillus et la PCR Plasmodium sp.

3) Interprétation des résultats d'une PCR « temps réel »

Observation des données brutes d'une PCR temps réel. Interprétation des résultats pour la PCR cytomégalovirus.