

Cours Microbiologie clinique (suite)

Dr Bellifa-Benamar Samia

Chapitre II : Les techniques de diagnostic

Le choix de la ou des méthodes utilisées pour l'identification microbienne dépend du type et de la nature du micro-organisme. La ou les méthodes choisies doivent être bien décrites dans la littérature scientifique et conforme à celles qui sont actuellement utilisées dans le domaine de l'identification et de la classification taxonomique microbienne. Ces méthodes doivent aussi permettre l'identification des organismes aux niveaux du genre, des espèces et, si possible, de la souche. La robustesse, la précision et la validité de méthodes utilisées sont des éléments importants dans l'identification des microorganismes.

Les principaux objectifs des analyses microbiologiques sont d'isoler et d'identifier les micro-organismes pathogènes et de mesurer leur sensibilité aux antibiotiques. Les analyses sont définies par un ensemble d'étapes successives, allant du prélèvement de l'échantillon biologique jusqu'à la remise des résultats.

1. Les échantillons (prélèvement, transport)

Le prélèvement d'un produit pathologique est un acte clé de la phase pré analytique. Il existe un très grand nombre de méthodes de prélèvements.

Les précautions "standards" pour tous les prélèvements doivent être appliquées, afin de réaliser un prélèvement dans des conditions d'hygiène et de sécurité pour le patient et mais aussi pour le personnel.

Tout produit pathologique doit être considéré comme potentiellement infectieux.

- Le préleveur habilité doit respecter les règles de soins et d'hygiène, (port de gants, blouses, et dans certains cas de masques ou lunettes de protection)
- Avant et après tout prélèvement, le préleveur doit réaliser une **ANTISEPSIE DES MAINS** sur des mains propres et sèches en l'absence de souillures macroscopiques avec une solution hydro-alcoolique à séchage rapide.
- Un prélèvement à visée étiologique doit être effectué dès le début du processus infectieux.
- les prélèvements sont réalisés avec du matériel stérile à usage unique. Le récipient destiné à recevoir le prélèvement doit être adapté à la nature du prélèvement et des

analyses, en particulier en matière de sécurité et d'étanchéité, afin d'éviter tout risque de contamination et de pollution.

- **La nature et la quantité des substances adjuvantes qu'il peut contenir doivent être connues et précisées.**
- Des volumes insuffisants peuvent donc donner lieu à des résultats faussement négatifs.
- La fermeture des récipients doit être hermétique, pour ne pas contaminer l'extérieur des flacons ou des tubes.
- Il ne faut pas transporter une seringue avec son aiguille ; celle-ci doit être retirée avec un dispositif de sécurité.
- **L'étiquetage de l'échantillon biologique :** Le préleveur doit étiqueter les récipients contenant l'échantillon biologique au moment du prélèvement, de façon à éviter toute erreur sur l'identité de la personne.

Délai de transport et conservation des échantillons

En règle générale, les bactéries ne résistent pas à la dessiccation et au froid, en particulier lorsque de petits volumes d'échantillons sont prélevés. Les petits échantillons et les biopsies doivent être acheminés en 15 à 30 mn au laboratoire, les autres en moins de 2 heures, afin de préserver la survie des micro-organismes les plus fragiles et d'éviter qu'ils soient inhibés par des bactéries plus résistantes à l'environnement extérieur. Les bactéries qui ne supportent pas de délai peuvent être préservées dans des milieux de transport. Ceux-ci sont couramment utilisés pour des délais de transport de plus de 2 heures.

Typologie des prélèvements

Prélèvements de BACTERIOLOGIE	
Prélèvement	Matériel de prélèvement
URINES	Tube boraté , éventuellement pot stérile
BIOPSIES, LIQUIDES	Pot ou tube stérile
PRELEVEMENT CUTANE, VAGINAL, URETHRAL	Ecouvillon Transwab®, éventuellement écouvillon sec
SELLES	Pot à coproculture
SANG	Flacon Hémoculture Anaérobie et Aérobie
Prélèvements de VIROLOGIE	
Prélèvement	Matériel de prélèvement
PRELEVEMENT CUTANE, MUQUEUX, NASAL, PHARYNGE, RECTAL, GENITAL... PAR ECOUVILLONNAGE	Tube Virocult®contenant un milieu de transport pour la recherche de virus
SEROLOGIES	Tube sec gélosé
DEMANDE DE RECHERCHES EN BIOLOGIE MOLECULAIRE SUR SANG	Tube EDTA
SELLES, LBA, URINES, BIOPSIES, LIQUIDES	Pot stérile
Prélèvements de PARASITOLOGIE	
Prélèvement	Matériel de prélèvement
SEROLOGIES	Tube sec gélosé
SELLES, LBA, URINES, BIOPSIES, LIQUIDES DIVERS	Pot stérile
SANG POUR RECHERCHE DE PROTOZOAIRES PAR MICROSCOPIE ET/OU BIOLOGIE MOLECULAIRE	Tube EDTA
PRELEVEMENTS DIVERS PAR ECOUVILLONNAGE	Ecouvillon sec sans milieu ajouté

2. L'identification des microorganismes

2.1 Analyse phénotypique

L'analyse préliminaire dans l'identification microbienne se fait souvent avec une ou plusieurs méthodes phénotypiques. Les méthodes phénotypiques conviennent aux micro-organismes qui sont cultivables (c.-à-d. qui peuvent croître en culture pure sur un milieu artificiel), et dont les paramètres de croissance, ainsi que les profils physiologique et biochimique sont bien établis. L'expression des phénotypes microbiens est hautement dépendante des variables environnementales (p. ex., le pH de la culture, la température, le milieu de culture sélectif ou

non sélectif, l'appauvrissement des nutriments, la présence de facteurs de stress, etc.), et par conséquent, peut introduire des incohérences dans le processus d'identification.

Les méthodes phénotypiques sont acceptables seulement si les critères relatifs à la réponse sont suffisants pour identifier avec certitude le micro-organisme et le distinguer de souches phylogénétiquement et étroitement apparentées qui peuvent donner lieu à des problèmes d'innocuité. Par ailleurs, l'applicabilité de la méthode repose sur la robustesse des renseignements retrouvés dans les bases de données de référence. En conséquence, les résultats obtenus des méthodes phénotypiques requièrent l'appui de données provenant d'autres méthodes afin d'identifier avec précision un micro-organisme.

2.2 Analyse des caractères morphologiques

La morphologie de la colonie et des cellules permet d'obtenir une identification initiale relativement à un micro-organisme. Cela s'effectue par des méthodes simples d'isolation et de culture du micro-organisme et par l'observation visuelle subséquente au moyen du microscope.

Les propriétés morphologiques comprennent :

- la forme;
- la taille;
- les caractéristiques de la surface et la pigmentation;
- les caractéristiques de la paroi cellulaire (procédé de coloration de Gram);
- les caractéristiques de sporulation ;
- les autres inclusions cellulaires et caractéristiques ultrastructurales.

2.3 Analyse des caractéristiques biochimiques, physiologiques et métaboliques

L'évaluation phénotypique comprend l'étude du profil biochimique et des propriétés métaboliques d'un micro-organisme par l'entremise de test sur ses conditions de croissance, sur ses activités enzymatiques et sur la composition de ses cellules en acide gras.

Les tests biochimiques utilisent des milieux de croissance, des nutriments, des produits chimiques ou des conditions de croissance particuliers afin d'obtenir une réponse biochimique observable et mesurable du micro-organisme, permettant ainsi son identification et sa caractérisation. Ces tests comprennent :

- ✚ L'utilisation de sources de carbone et d'azote,

- ✚ Différentes conditions de croissance (anaérobie ou aérobie; température optimale et intervalle de température, pH optimal et intervalle de pH),
- ✚ Des conditions osmotiques préférentielles,
- ✚ La production de produits de fermentation,
- ✚ La production d'enzymes,
- ✚ La production de composés antimicrobiens, de même que la sensibilité aux inhibiteurs métaboliques et antibiotiques.

Parmi les tests reconnus, on retrouve : les tests au rouge de phénol et carbohydrate, les tests de catalase et d'oxydase, les tests oxydation-fermentation, les tests au rouge de méthyle, les tests de Voges-Proskauer, la réduction des nitrates, l'hydrolyse de l'amidon, l'hydrolyse du tryptophane, la production de sulfure d'hydrogène, l'utilisation du citrate, les réactions du petit-lait tournesolé, etc.

3. Les méthodes rapides d'identification

Plusieurs systèmes commerciaux miniaturisés et automatisés sont actuellement offerts et sont assortis de procédures de contrôle de la qualité bien définies qui permettent l'identification rapide des micro-organismes.

❖ Galeries d'identification Système API

Elles utilisent le même principe que les techniques biochimiques conventionnelles l'identification des bactéries. Elles se présentent sous forme de cupules prête à l'emploi contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques. Version miniaturisée et standardisée, elles ont l'avantage de standardiser les caractères biochimiques recherchés pour améliorer la reproductibilité interlaboratoire en éliminant le choix subjectif des tests « importants » pour la caractérisation, elles limitent la variabilité technique (utilisation de système de distribution possible). Leur utilisation est simple. Selon le type de galerie, l'inoculum et le milieu de suspension varie

❖ Système VITEK le MicroScan Walk-Away 40

Le profil métabolique est obtenu par l'étude de la cinétique des mesures pendant l'incubation. Grâce à l'automatisation, les résultats d'identification/antibiogramme s'obtiennent dans la journée et contribuent ainsi à une meilleure prise en charge des patients. La détection des

résistances bactériennes et l'interprétation des résultats de l'antibiogramme permettent de limiter les échecs thérapeutiques.

En ce qui concerne le Vitek et le MicroScan Walk-Away 40, la suspension bactérienne est inoculée, respectivement, sur des cartes ou dans des plaques qui contiennent une variété de substrats biochimiques et d'antibiotiques conventionnels. La croissance bactérienne, dans les puits de ces supports, modifie le substrat biochimique. La lecture de la carte ou de la plaque permet alors d'établir un profil biochimique, qui peut être comparé à ceux d'organismes connus.

❖ **Le Replianalyzer**

Fournit également un profil biochimique. Cependant, le système utilise des boîtes d'Agar, plutôt que des plaques composées de micropuits. S'agissant du MicroLog, la suspension bactérienne est inoculée dans les micropuits d'une plaque qui contiennent un milieu tamponné, différentes sources de carbone et un indicateur coloré, le tétrazolium violet. Le colorant est réduit lorsque les différentes sources de carbone sont utilisées. Le profil biochimique résultant peut être comparé à ceux de micro-organismes connus.

Quant au Microbial Identification System, les profils en acide gras, générés par des micro-organismes inconnus, sont comparés à ceux obtenus pour des micro-organismes connus.

❖ **Le système BioLog (Biolog Inc.)**

En particulier, été évalué pour l'identification de *Bacillus anthracis* (Baillie *et al.*, 1995). Il s'avère que, dans la majorité des cas, ce système est capable de distinguer *Bacillus anthracis* des autres espèces du genre *Bacillus*. Toutefois, des tests complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats. En effet, il arrive que des membres du « groupe *Bacillus cereus* » donnent de faux-positifs.

Ces différents systèmes présentent des sensibilités variables selon l'espèce bactérienne que l'on doit détecter. Certains sont plus performants pour des bactéries d'intérêt médical, tandis que d'autres seront plus appropriés pour la détection de micro-organismes issus de l'environnement. En effet, ils dépendent fortement du nombre de profils existants dans la base de données.

De plus, ils ne sont pas multiplex. En d'autres termes, la suspension bactérienne doit généralement être répartie entre les différents puits des plaques ou cartes, nécessitant souvent un pré-enrichissement par culture bactérienne.

4. Méthodes immunologiques

Elles sont basées sur la réaction d'un anticorps spécifique vis à vis d'un antigène du corps bactérien, d'un antigène soluble ou d'une toxine. Elles ont l'avantage d'être rapides et spécifiques. Elles peuvent manquer de sensibilité, on peut alors les associer à une autre méthode pour augmenter la sensibilité. Ce sont globalement des techniques coûteuses.

L'analyse par la voie immunologique est :

- ✚ **soit directe** : aucun des réactifs n'est marqués. Le résultat de la réaction entre l'antigène et l'anticorps est directement observé,
- ✚ **soit indirecte** : l'un des réactifs, l'antigène ou l'anticorps, est marqué. Lorsque la réaction antigène-anticorps intervient, le signal produit par le marqueur est mesuré.

2.4.1 Mesure directe

❖ Agglutination

L'agglutination permet une mesure directe de la présence bactérienne dans un échantillon. Des billes de latex colorées et recouvertes d'anticorps agglutinent l'antigène spécifique (bactéries). On observe alors la formation d'un précipité. La méthode est peu sensible (10^7 bactéries sont nécessaires par réaction) mais est simple à mettre en œuvre.

❖ Immunodiffusion

L'immunodiffusion utilise un appareil en forme de « L » comportant deux chambres. La chambre verticale est dite « de mobilité ». Elle contient de l'Agar semi-solide inoculé avec un anticorps spécifique de la bactérie que l'on doit détecter. La chambre horizontale est dite « d'inoculation ». Elle contient un milieu sélectif enrichi et est inoculée avec l'échantillon préenrichi par culture. Les bactéries peuvent alors migrer vers la chambre « de mobilité » et réagir avec l'anticorps pour former une ligne de précipitation. Cette méthode est utilisée, en particulier, pour la détection des salmonelles mobiles dans l'industrie alimentaire.

❖ Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation consiste à saturer à l'intérieur de petits appareils en plastique un nombre important de blocs absorbants au moyen d'anticorps de détection et d'anticorps de capture. Ces deux anticorps sont spécifiques de l'antigène. L'échantillon est absorbé par les blocs. Lorsque l'antigène est présent dans l'échantillon, il réagit, dans un premier temps, avec l'anticorps marqué et, dans un second temps, avec l'anticorps de capture pour former une bande visible d'immunoprécipitation.

2.4.2 Mesure indirecte ou immunodosage

❖ Test de compétition

Les antigènes non marqués de l'échantillon entrent en compétition avec un antigène marqué de quantité connue pour les sites de fixation de l'anticorps. Par conséquent, l'intensité de signal diminue à mesure que l'échantillon contient une quantité croissante d'antigène.

❖ Test « sandwich »

Ce test consiste à recouvrir un support solide d'un anticorps, dans le but de capturer l'antigène de l'échantillon qui lui est spécifique. Un second anticorps marqué va reconnaître l'antigène. Le signal mesuré est proportionnel à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. Le test « sandwich » le plus utilisé au laboratoire est l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) : le second anticorps est couplé à une enzyme qui catalyse la réaction de formation d'un produit coloré à partir d'un substrat spécifique.

Les marqueurs Les deux tests décrits ci-dessus nécessitent l'usage de marqueurs qui sont : ï soit des radioéléments dans le cadre de dosages radio-immunologiques ou RIA (Radio ImmunoAssay), ï soit des enzymes s'agissant de dosages immuno-enzymatiques ou EIA (Enzyme ImmunoAssay).

Conclusions relatives à l'identification immunologique :

Les méthodes d'analyses reposant sur l'usage des anticorps sont généralement sensibles et spécifiques. Elles présentent l'avantage de ne pas nécessiter un traitement particulier de l'échantillon. En effet, les antigènes bactériens détectés sont majoritairement situés sur la surface de la bactérie.

Une autre possibilité réside dans la détection d'une toxine ou d'une molécule sécrétée par la bactérie.

Par contre, toutes ces méthodes immunologiques exigent la synthèse d'anticorps spécifiques aux antigènes. Les anticorps doivent être spécifiques afin de réduire les réactions croisées qui peuvent avoir lieu avec des antigènes de bactéries n'ayant aucun rapport avec celle que l'on cherche à détecter. En effet, lorsque ces tests portent sur des échantillons prélevés dans l'environnement, les anticorps sont susceptibles de présenter de l'affinité pour des antigènes compétiteurs de ceux que l'on recherche (faux-positifs).

Par ailleurs, il n'existe pas, aujourd'hui, de tests immunologiques multiplex, c'est-à-dire capables de détecter, en une seule expérience, plusieurs genres, voire espèces, de bactéries présentes dans un échantillon.

5. Les méthodes moléculaires

La biologie moléculaire apporte un ensemble de nouveaux outils puissants : des méthodes moléculaires qui ont aidé à détecter les plus petites variations parmi les espèces microbiennes et les souches. Ces méthodes ont grandement amélioré la capacité de détecter, d'identifier et de classer rapidement les micro-organismes en plus d'établir la relation taxonomique parmi les genres et les espèces apparentés. L'identification, par les méthodes moléculaires, s'appuie sur la comparaison de séquences d'acides nucléiques (ADN, ARN) ou de profils protéiques d'un micro-organisme avec les données documentées d'organismes connus.

Les méthodes moléculaires sont considérées comme des méthodes suffisamment sensibles pour permettre une détection à des concentrations faibles de micro-organismes viables ou non viables autant pour les échantillons de culture pure que ceux de culture complexe.

Méthodes génotypiques

L'identification microbienne par des méthodes génotypiques est une alternative ou un complément aux méthodes phénotypiques établies. De façon générale, les méthodes génotypiques pour l'identification microbienne peuvent se diviser en deux catégories comme suit :

1. **Techniques faisant appel au modèle ou à l'empreinte génétique;**
2. **Techniques faisant appel au séquençage.**

Dans les techniques faisant appel au modèle, une série de fragments provenant de l'ADN chromosomique d'un organisme sont générés au moyen d'une méthode systématique. Les fragments générés sont alors séparés en fonction de leurs tailles pour créer un profil, ou une empreinte génétique unique à cet organisme et aux organismes très apparentés. On peut créer un répertoire ou une base de données avec un nombre suffisant de renseignements. Le profil des tests du micro-organisme peut alors être comparé au répertoire ou aux bases de données. Selon la similarité entre les profils de deux organismes, ils seront considérés comme très

apparentés ou pas du tout. Voici des exemples de quelques techniques faisant appel au modèle ou à l'empreinte génétique :

1. hybridation des acides nucléiques (analyse de transfert de Southern ou hybridation en phase solution);
2. polymorphisme de longueur des fragments amplifiés, ou AFLP;
3. électrophorèse sur gel en champ pulsé;
4. amplification aléatoire de l'ADN polymorphe;
5. réaction en chaîne de la polymérase (PCR) multiplex

Dans les techniques faisant appel au séquençage, la séquence d'un segment particulier d'ADN est déterminée. Comme pour le génotypage, une base de données de séquences précises d'ADN est générée, ce qui permet alors de comparer la séquence test obtenue aux séquences de la base de données. Le degré de similarité, ou la concordance, entre les deux séquences indique dans quelle mesure ces deux organismes sont apparentés. Jusqu'à présent, un certain nombre d'algorithmes au moyen d'ordinateur ont été créés afin de pouvoir comparer les nombreuses séquences les unes aux autres et d'en établir un arbre phylogénétique à partir des résultats. Voici quelques exemples de techniques faisant appel au séquençage :

1. l'analyse séquentielle du gène d'ARNr 16s;
2. le typage génomique multi-locus ou MLST;
3. l'analyse génomique multi-locus ou MLSA.

Les techniques d'empreinte génétique et les méthodes faisant appel au séquençage ont toutes deux leurs forces et leurs faiblesses. Traditionnellement, les méthodes faisant appel au séquençage, tel que l'analyse du gène d'ARNr 16s, se sont avérées efficaces quant à l'établissement des relations phylogénétiques globales parmi les bactéries au niveau du genre, de la famille, de l'ordre et du phylum, tandis que les méthodes ayant recours à l'empreinte génétique sont bonnes pour distinguer les relations au niveau de la souche ou de l'espèce.