

Isolement et identification des germes

Isolement des microorganismes

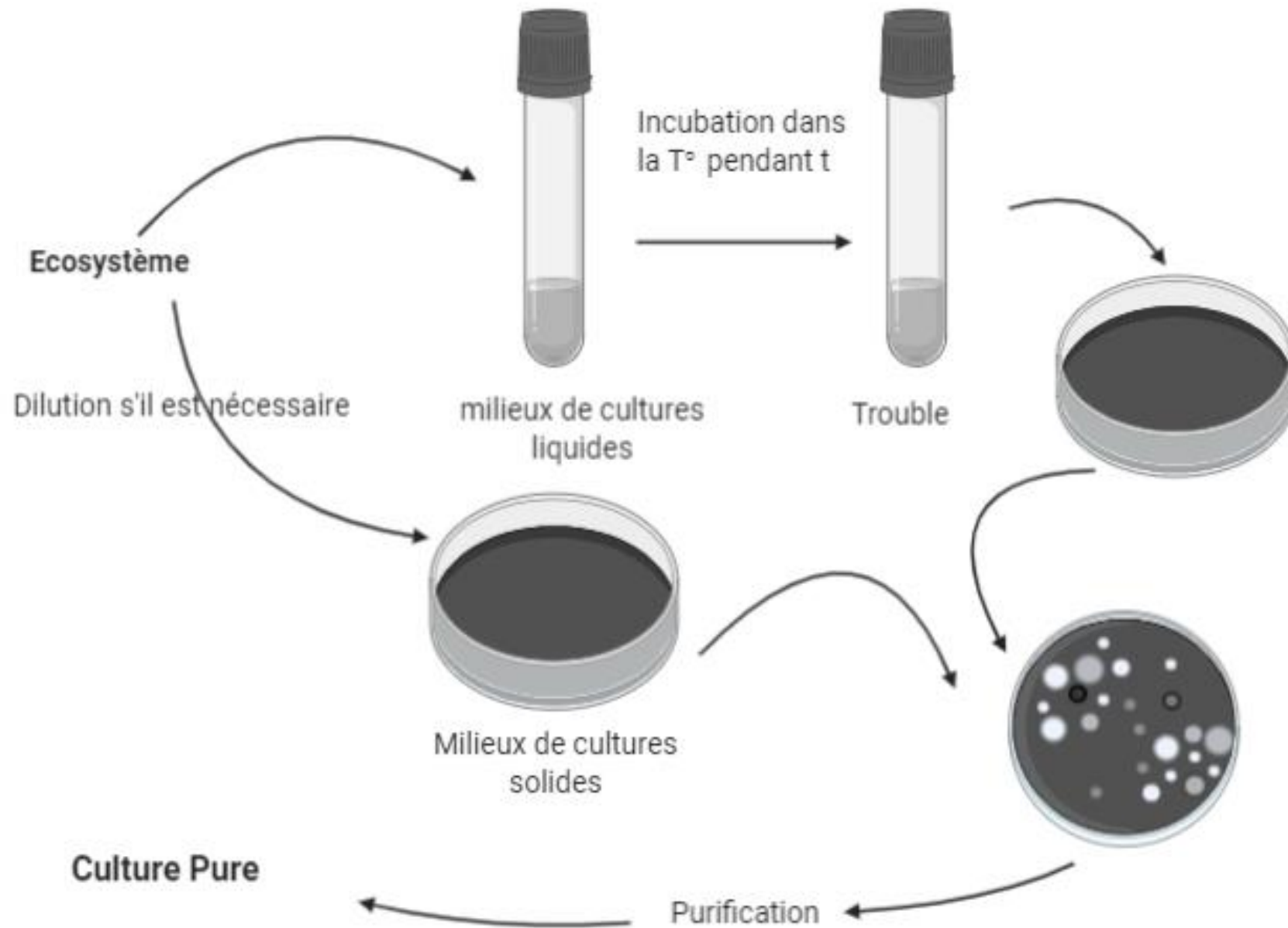
Les milieux de cultures

Les caractéristiques des milieux de cultures varient, de même que leur composition. On les utilise à des fins diverses : recherche, diagnostic, fermentation industrielles...etc. les milieux de cultures sont classés en milieux **liquides**, **solides** et **semi-solides** selon la consistance

Les milieux sont classés en milieux **naturels** ou empiriques, **synthétiques** et **semi-synthétiques** selon leur constitution. Dans la composition du milieu on doit trouver une source de carbone, une source d'azote, les oligoéléments, vitamines, sels minéraux ...etc.

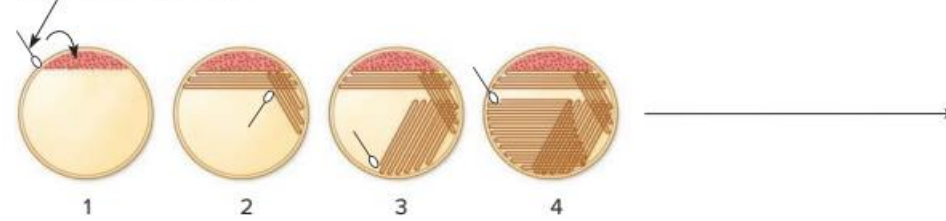
Les milieux de cultures peuvent être également classés en fonction de leur utilisation en milieux **sélectifs** (contiennent des agents sélectifs), **d'enrichissement** (contiennent des agents sélectifs), **d'identification**, **différentiels**...etc.

Isolement des microorganismes

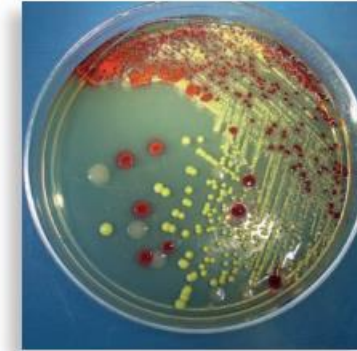


Note: This method works best if the spreading tool (usually an **inoculating loop**) is resterilized (flamed) after each of steps 1–3.

Loop containing sample

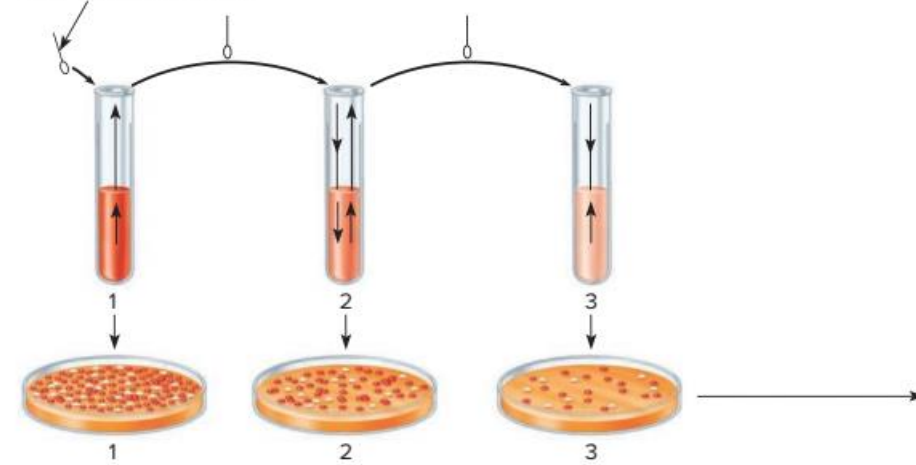


(a) **Steps in a Streak Plate;** this one is a four-part or quadrant streak.

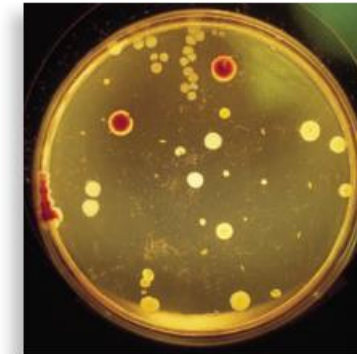


(b)

Loop containing sample



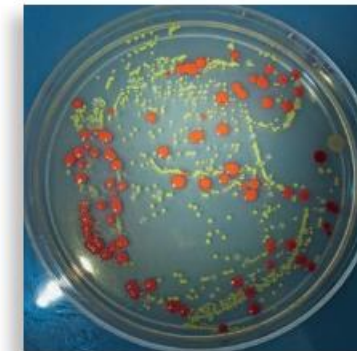
(c) **Steps in Loop Dilution;** also called a pour plate or serial dilution



(d)



(e) **Steps in a Spread Plate**

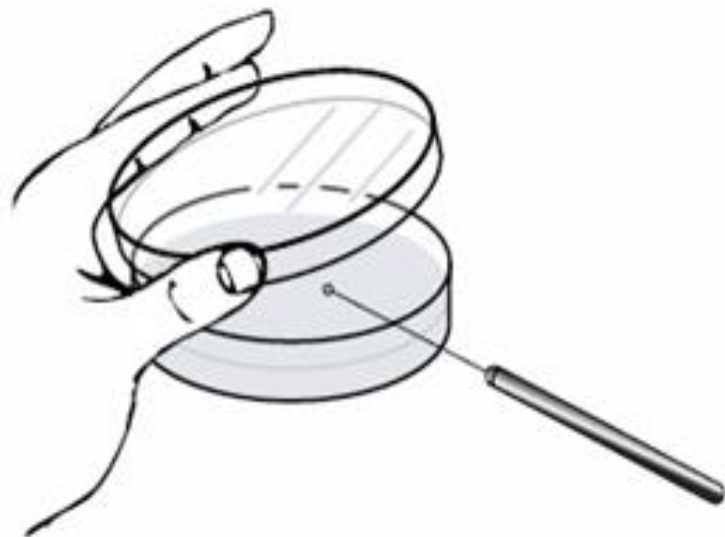


(f)

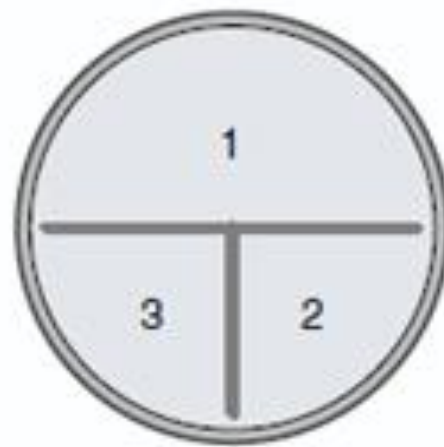
Purification des souches

L'étude qualitative d'une bactérie spécifique nécessite impérativement sa manipulation en **culture pure**, définie comme un **clone** : c'est-à-dire un ensemble de bactéries descendantes exclusives d'une seule bactérie mère

Pour purifier une culture, nous utilisons la méthode **d'épuisement par stries**, en faisant des stries, des cellules se déposent sur la surface du milieu de culture et donne naissance à des colonies bactériennes, l'opération peut être répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une **culture homogène (culture pure)**, les colonies sont semblables.



(a) Protect agar surface from contamination.



(b) Mark bottom of petri dish.



(c) Streak with a loopful of bacteria.



(d) Flame loop and cool.



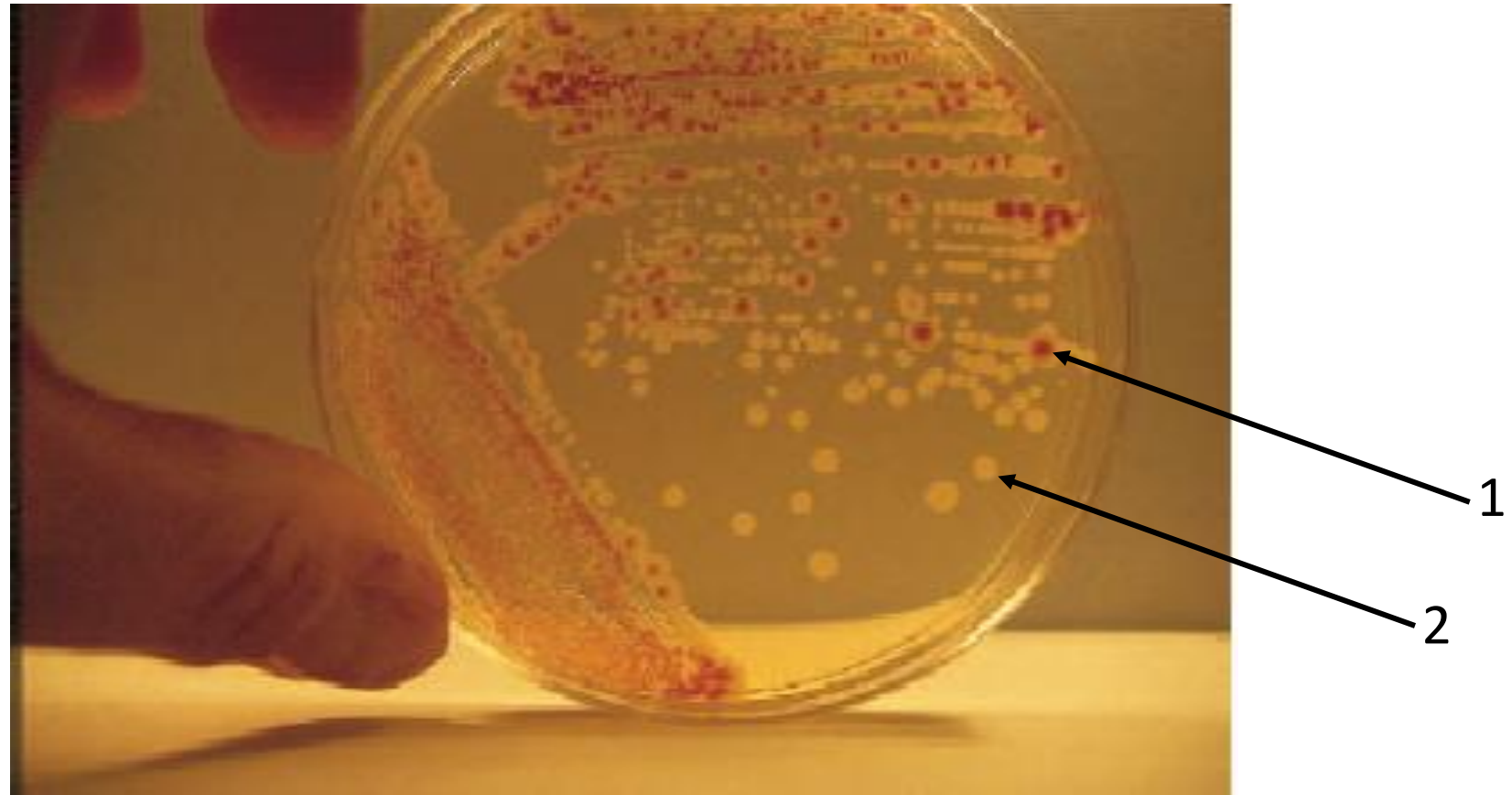
(e) Streak second section.



(f) Flame loop and cool.



(g) Streak last section.



Plusieurs types de colonies dans ce cas on procède a une purification des différents types de microorganismes.

Conservation des souches pures

Le **repiquage** consiste à faire des **subcultures** pures de la souche mère, puis reproduire régulièrement cette opération sur gélose inclinée ou sur bouillon nutritif. Après croissance des microorganismes les tubes de repiquage sont hermétiquement fermés et conservés à **température ambiante** ou à **4°C**, selon le cas.

La **lyophilisation**, conservation des produits biologiques par dessiccation sous vide à des basses températures. Ici les suspensions des microorganismes sont tous d'abord à basse température puis mises sous vide, dans ces conditions et l'abaissement de la pression en dessous de l'équilibre entraîne une sublimation. Ces conditions peuvent affecter l'intégrité des microorganismes à lyophiliser, dans ce cas-là on utilise des agents cryoprotecteurs comme le lait écrémé à 20%, l'albumine du sérum...etc., pour protéger les cellules microbiennes.

Les microorganismes peuvent être conservés dans très basse température (**températures de congélation** allant de -20°C au -196°C température de l'azote liquide). La congélation doit être **progressive** avec une vitesse de $1^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ jusqu'à -30 ou -40 , puis on les met dans des températures plus basses. Des agents **cryoprotecteurs** (glycérol, DMSO (diméthylsulfoxyde)) doivent être utilisés pour protéger les cellules de ces températures.

- Important :**
- Milieu pas trop riche
 - Contenant bien bouché
 - Stockage à température constante
 - Stockage à l'abri de la lumière

- Durée courte :**
- Pour expédition → milieu de transport (VF ou spécial) → 3 jours θ ambiante
 - Au laboratoire → milieux spéciaux adaptés au germe :
 - ex. : *Haemophilus*, gélose gélatine → 1 à 2 semaines à 37 °C
 - ex. : Anaérobies sporulées, VF → 1 à 2 mois à 4 °C

- Durée moyenne :**
- Milieux spéciaux
 - ex. : *Brucella*, gélose pomme de terre → 3 mois à 22 °C
 - ex. : *Corynébactéries*, sérum coagulé → 8 à 12 mois à 22 °C
 - ex. : *Pseudomonas*, macération gélatine de Legroux → 12 à 24 mois à 4 °C
 - Congélation - 20 °C à - 70 °C → suspension 10 % glycérol → plusieurs mois
 - Milieux de conservation → piqure centrale en gélose
 - ex. : *Staphylocoque* → 4 à 6 mois à 22 °C
 - ex. : *V. cholerae* → 3 mois à 22 °C

- Longue durée :**
- Milieux de conservation → piqure centrale en gélose
 - ex. : *Entérobactéries* → 10 ans à 22 °C
 - Spores → gélose sans peptone ou terre
 - ex. : *Bacillus* → illimitée
 - Lyophilisation → variable selon espèces de 4 ans (halophiles) à 10 ou 20 ans (Gram - et Gram +)
 - Congélation azote liquide - 196 °C → milieu liquide 10 % DMSO-Glycérol → illimitée (si congélation lente, décongélation rapide)

Identification des microorganismes

L'identification se fait nécessairement sur une culture pure (clone). Cette condition est indispensable pour éliminer toute contamination qui fausserait irrémédiablement les résultats.

Identification:

- Phénotypique;
- Sérologique;
- Moléculaire;
- Spectroscopique (MALDI-TOF)

L'identification phénotypique d'une souche bactérienne inconnue se fait par la détermination de ses **caractères phénétiques**, jugés les plus significatifs, de manière à l'**assimiler** à une espèce ayant le **même profil phonétique**.

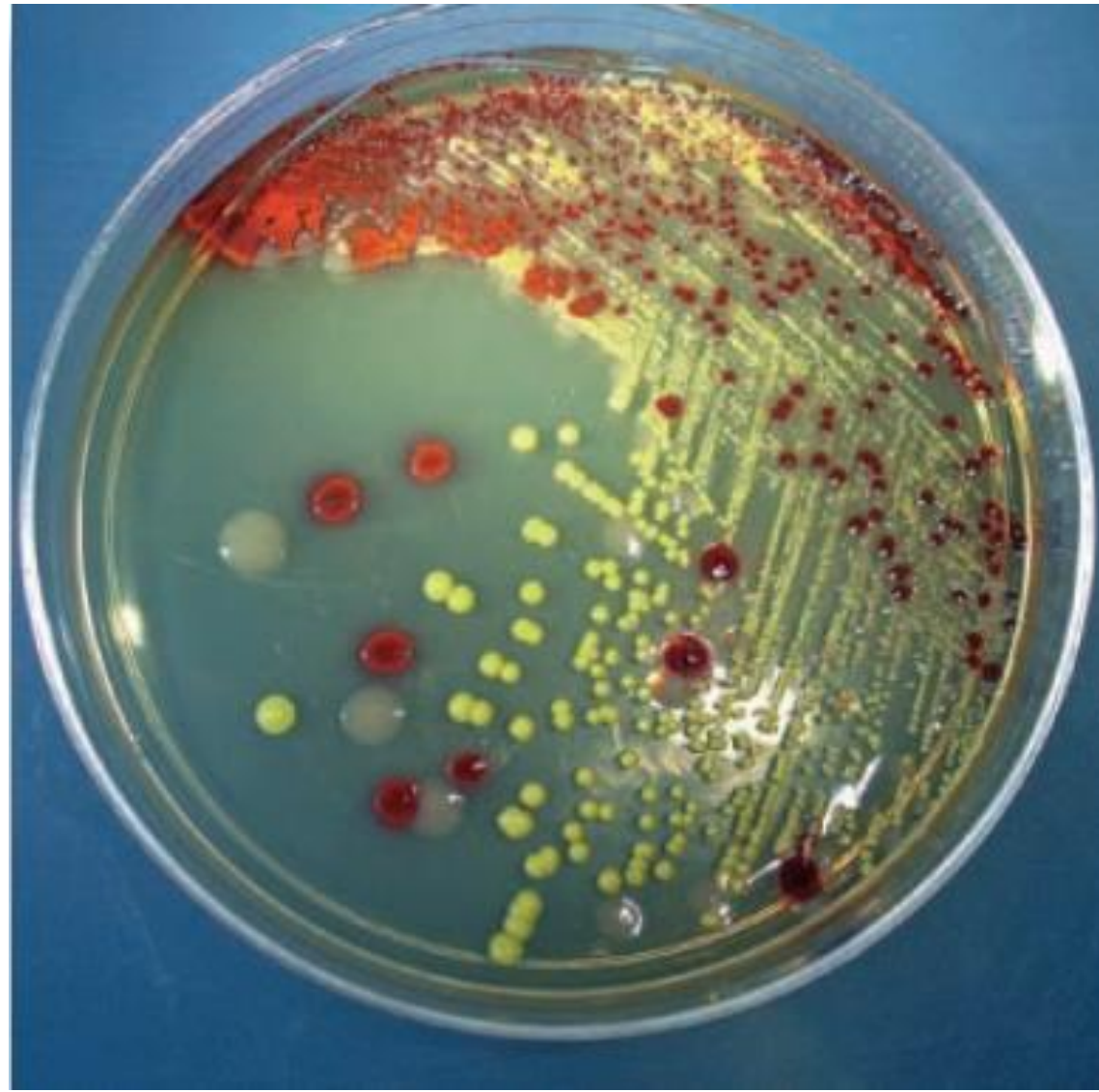
Examens macroscopiques et microscopiques

L'aspect macroscopique des cultures sur des milieux solides constitue une part importante dans l'identification d'un microorganisme.

Bactéries

Sur milieu solide après culture en surface on peut caractériser les bactéries selon l'aspect des colonies formées, plusieurs critères peuvent être envisagés :

- La taille ;
- La forme ;
- L'aspect : colonies rugueuses à surface irrégulière ou lisses à surface lisse brillante et régulière, colonies muqueuses à aspect gras ou coulant. Ces différences sont dues à la composition de la paroi et éventuelle présence d'une capsule. Il faut préciser cependant que cet aspect n'apparaîtra pas sur tous les milieux d'isolement, la composition ayant une grande influence sur le développement des colonies ;
- L'éventuel envahissement du milieu ;
- Le volume : colonies bombées ou plates, étalées ;
- La couleur : selon l'élaboration d'un pigment.

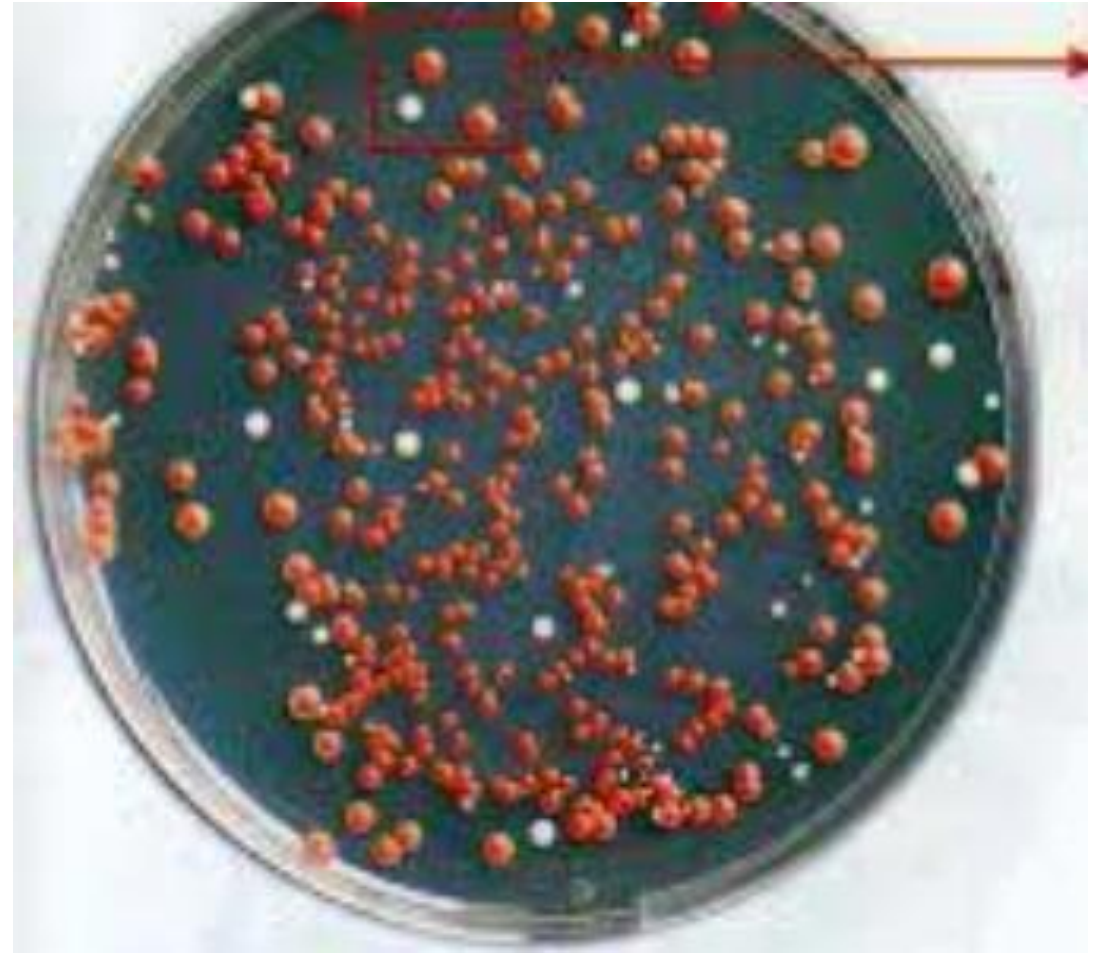


Les levures

On trouve ici les mêmes critères d'identification que pour les bactéries. Cependant certains milieux peuvent aider à la mise en évidence de caractères culturels : colonies de couleur rouge plus ou moins intense sur le milieu Sabouraud additionné de triphényltétrazolium

Les moisissures

Dans ce cas on travaillera sur milieu solide ensemencé par touche. Les critères sont examinés à l'œil nu ou sous loupe binoculaire, on notera la vitesse de croissance, la couleur et ces variations en fonction du temps, la couleur de l'envers des cultures, la texture de la surface et les éventuels changements de la couleur du milieu.



L'étude microscopique se fait généralement par une **coloration de Gram** pour déterminer le type de Gram, la forme des cellules bactériennes, la taille et le mode de regroupement des cellules

On peut faire des observation microscopiques pour les levures et les moisissure pour étudier ces caractéristiques microscopiques, forme de cellules, appareil reproductive chez les moisissures .etc.

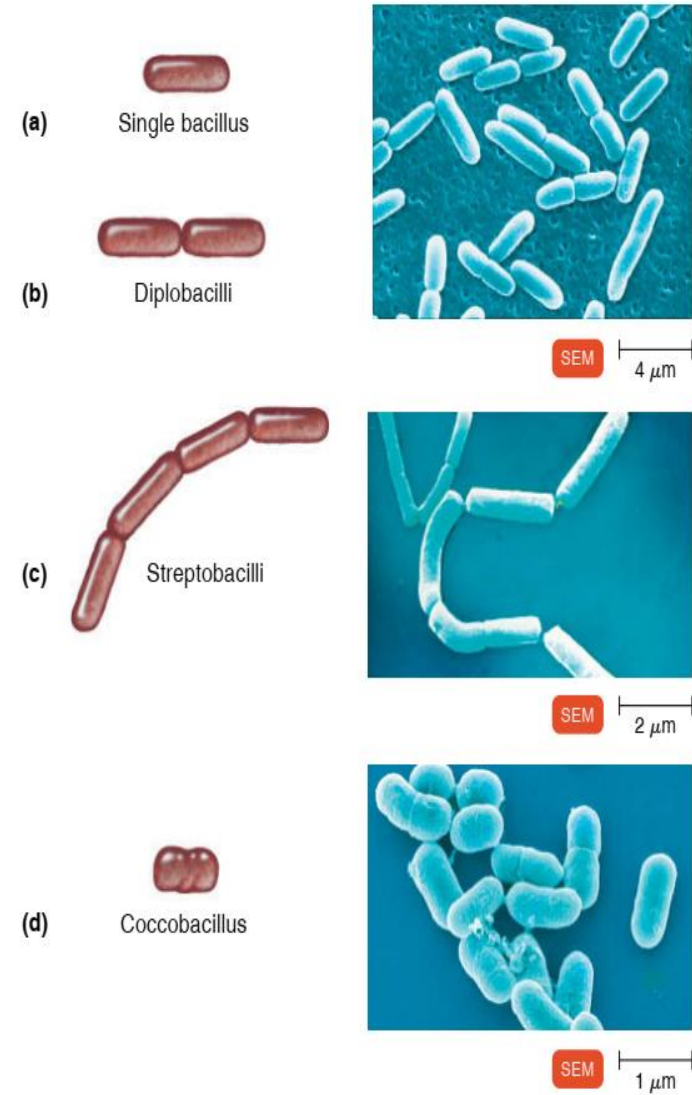
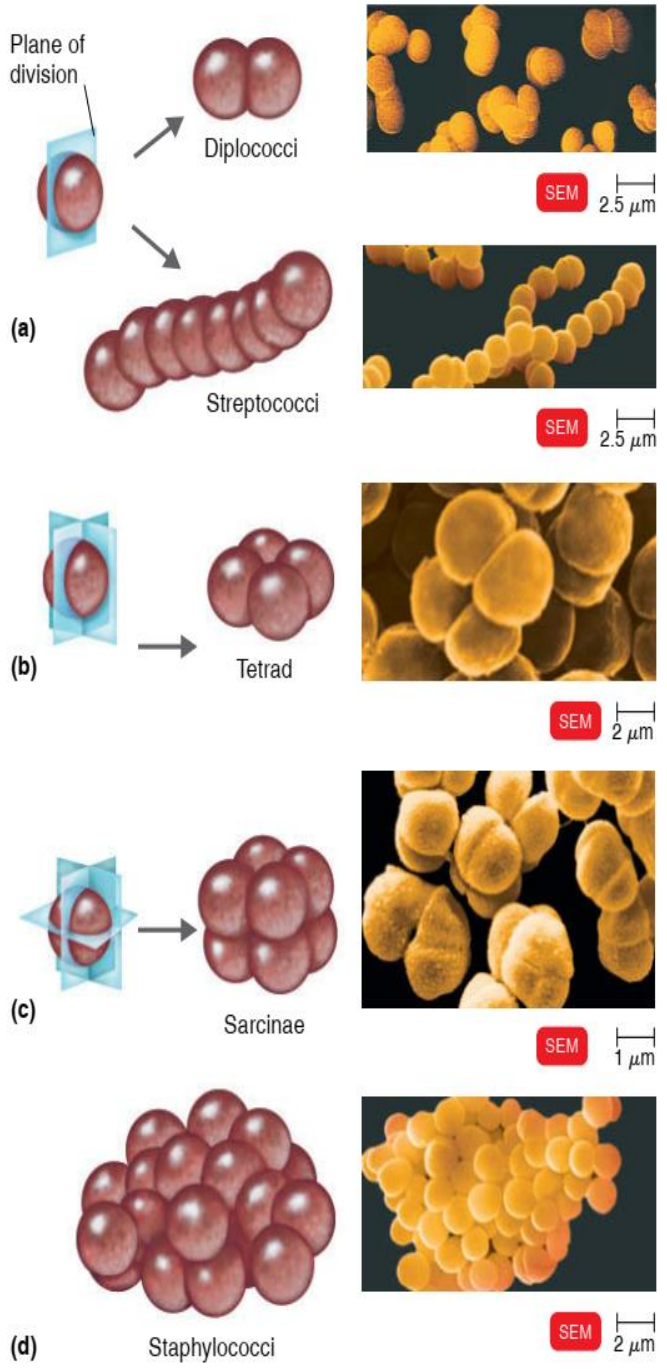
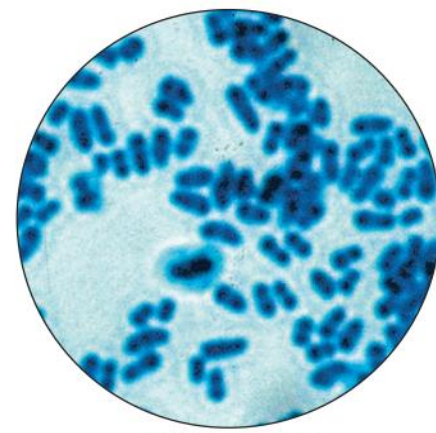


Figure 4.2 Bacilli. (a) Single bacilli. (b) Diplobacilli. In the top micrograph, a few joined pairs of bacilli could serve as examples of diplobacilli. (c) Streptobacilli. (d) Coccobacilli.

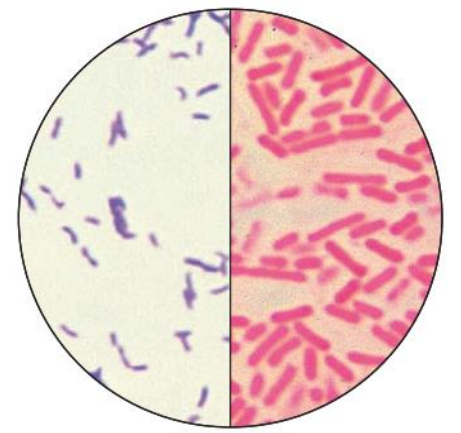
Q Why don't bacilli form tetrads or clusters?

(a) Simple and Negative Stains
Use one dye to observe cells

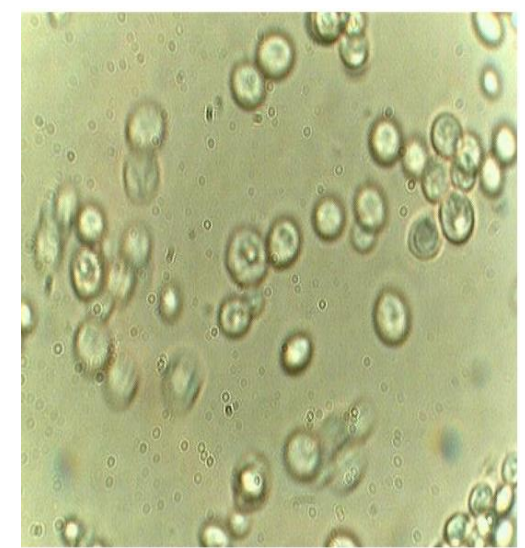


Methylene blue stain of *Corynebacterium* (1,000 \times)

(b) Differential Stains
Use two dyes to distinguish between cell types

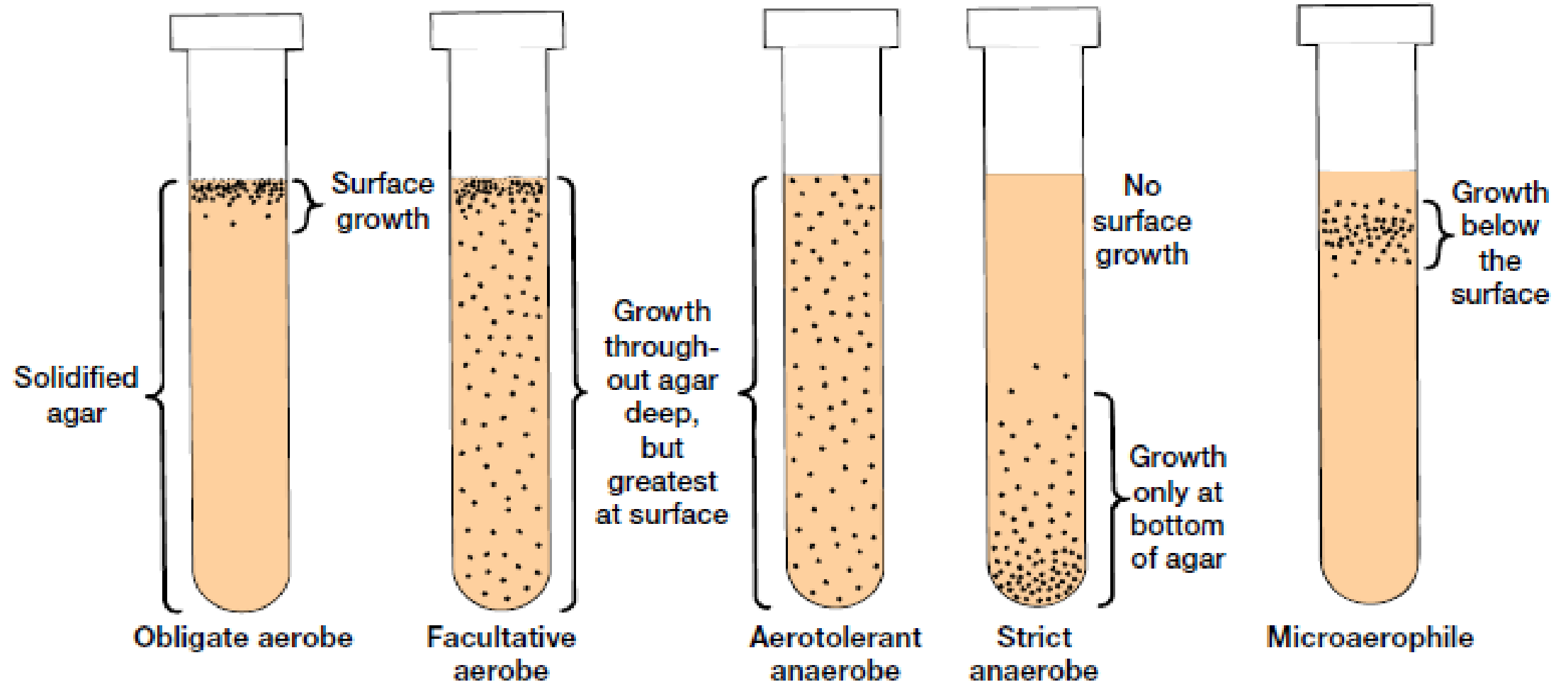


Gram stain
Purple cells are gram-positive.
Red cells are gram-negative (1,000 \times).



Type respiratoire et métabolique

Sur milieu MEVAG (**M**ilieu d'**E**tude de la **V**oie d'**A**ttaque des **G**lucides) ou milieu de HUGH et LEIFSON



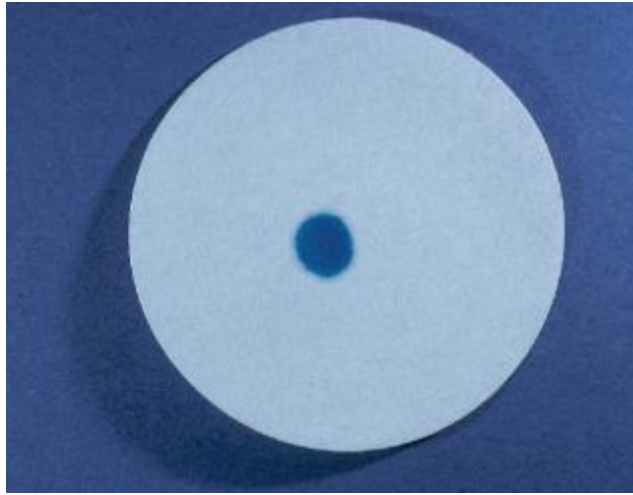
Tests biochimiques

Oxydase

Ce test met en évidence l'existence de cytochrome oxydase, enzyme caractéristique d'un métabolisme respiratoire aérobie spécifique de la réduction de l'oxygène moléculaire

Il est pratiqué usuellement à l'aide d'un disque de papier préalablement imbibé d'une solution d'oxydase (Chlorhydrate de N-Diméthylène – para – Phénylène – Diamine), du matériel bactérien est alors étalé sur le disque à l'aide d'une anse métallique.

Les bactéries oxydase positif donnent une coloration violette au disque normalement dans 10 secondes



Catalase

La présence de catalase s'exprime aussitôt par un dégagement gazeux (O₂) aisément discernable.



Positive test:

added $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalase}} \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
(bubbles)

Example:
Staphylococcus epidermidis

Negative test:

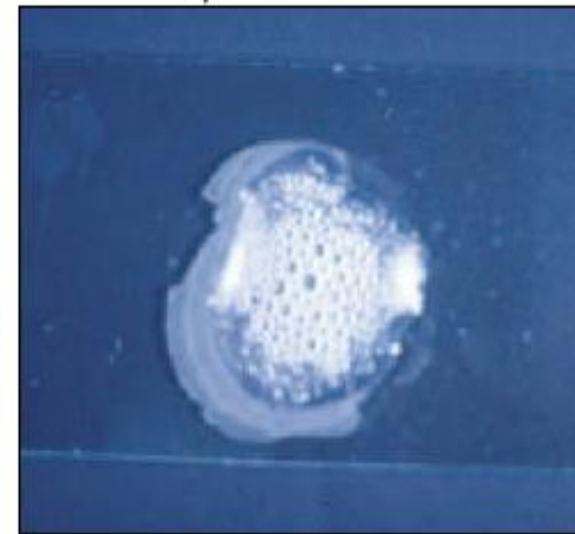
added $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{no catalase}} \text{H}_2\text{O}_2$
(no bubbles)

Example:
Enterococcus faecalis

Test
results
in tubes

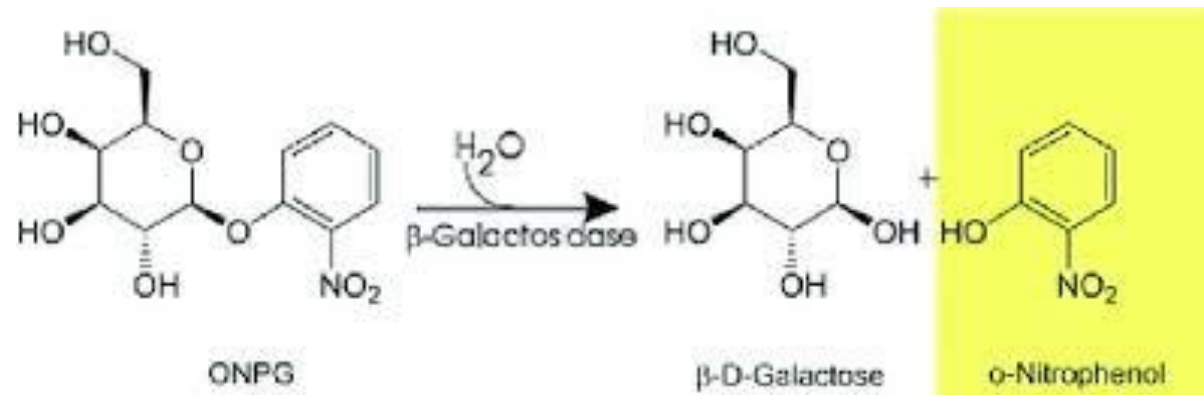


Positive
test result
on a slide

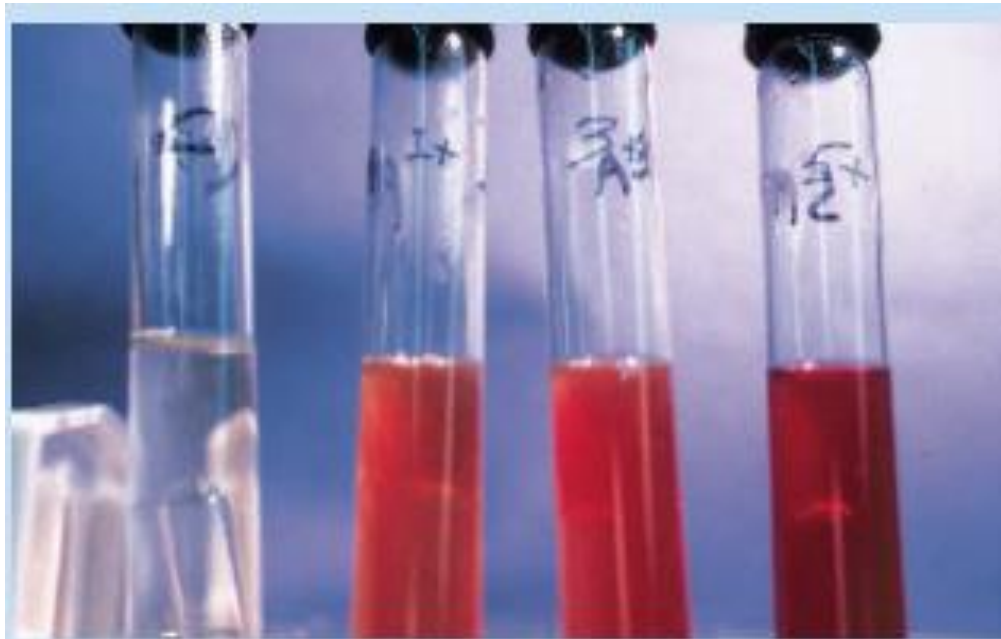
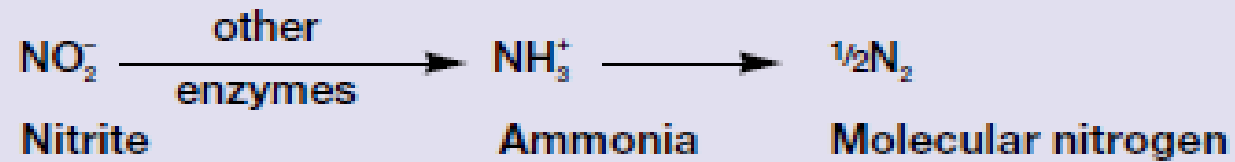
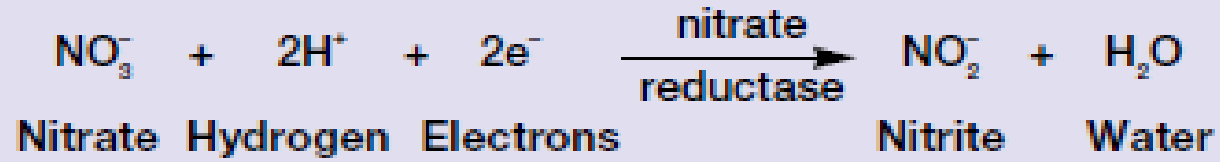


β-galactosidase

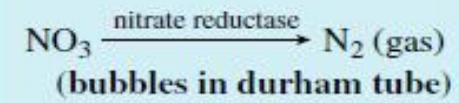
La présence de la β-galactosidase est mise en évidence à l'aide d'un analogue structural du lactose l'ONPG (orthonitrophénol β-D-galactoside) qui diffuse librement à l'intérieur des bactéries ou il est dégradé (réaction positif) couleur jaune.



Nitrate réductase (NAR)



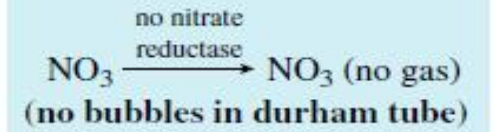
Positive test:



Example:

Pseudomonas aeruginosa

Negative test:



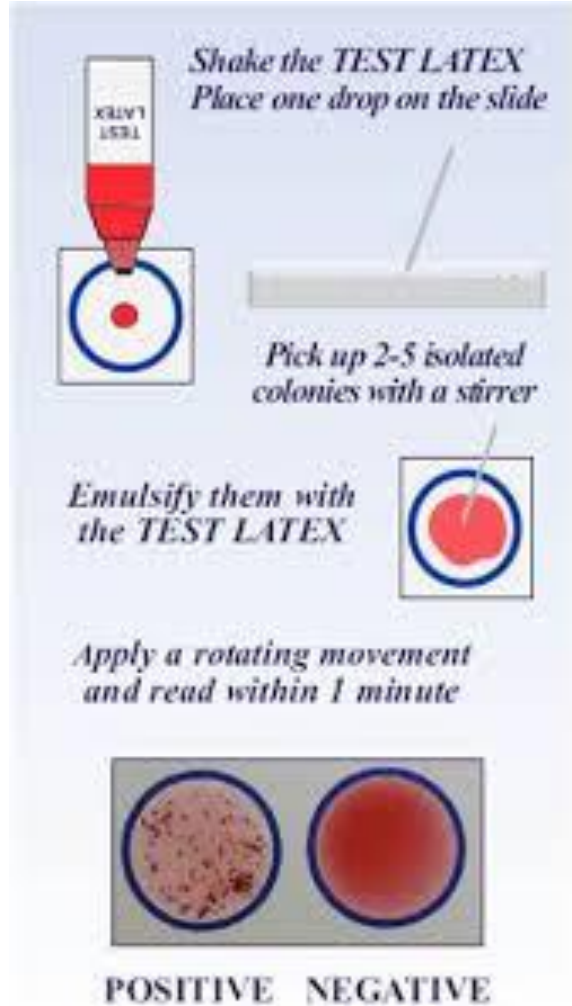
Example:

Alcaligenes faecalis

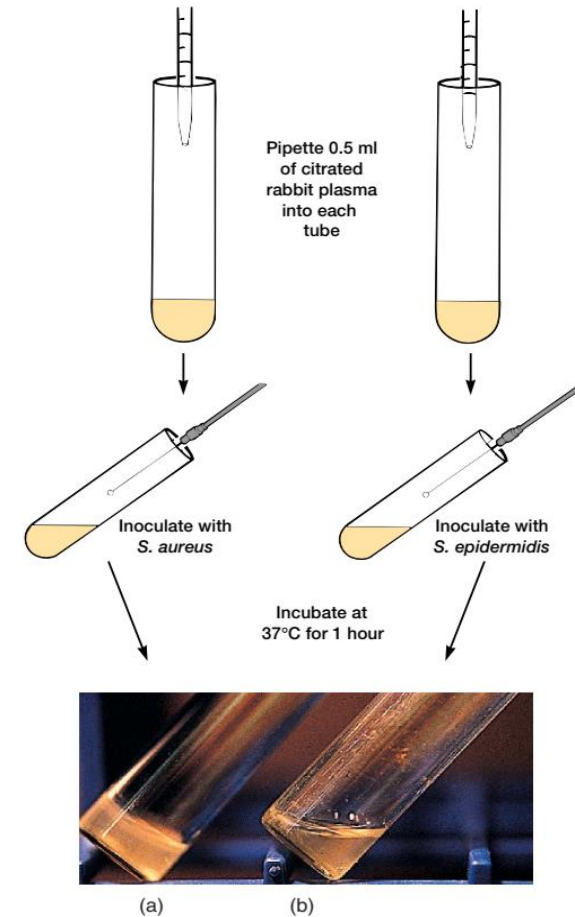


Coagulase

Coagulase liée



Coagulase libre

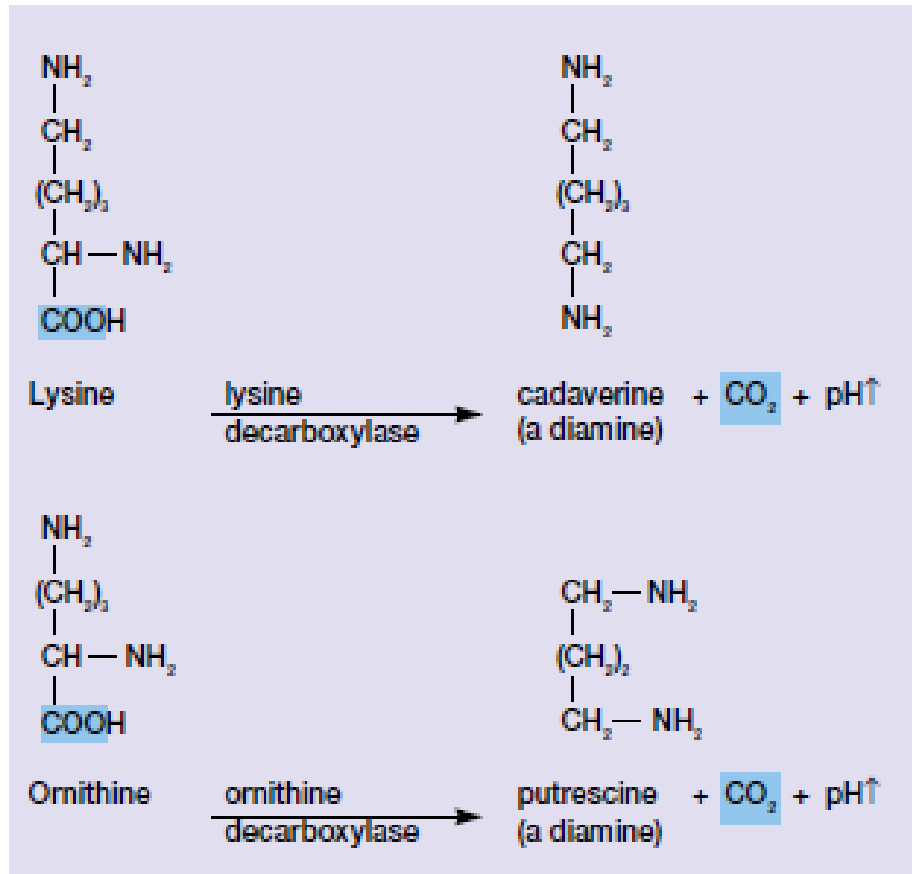


Dans un tube à hémolyse stérile :

- Verser 0.5 ml de bouillon Cœur-Cerveau.
- Verser 0.5 ml de plasma oxalaté.
- Homogénéiser et incubé à 35 - 37°C

Décarboxylases

Ce test permet de détecter la production d'enzymes de décarboxylation des acides aminés : arginine, lysine et ornithine. La réaction est réalisée dans 3 tubes, contenant chacun un des 3 acides aminés dissous dans du bouillon de **MOELLER** (glucose-peptone)



Glucose + acide aminé



La production d'indole

L'indole est le métabolite terminal de dégradation du tryptophane, présent initialement dans le milieu. Sa présence est mise en évidence par le réactif de KOVACS qui ajouté après la période d'incubation dissout l'indole et forme avec un anneau rouge surnageant

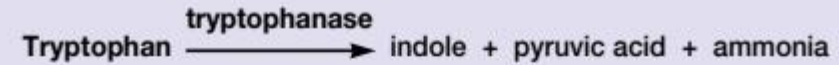
Positive test: tryptophan $\xrightarrow{\text{tryptophanase}}$ NH_3 + pyruvic acid + indole
indole + added Kovac's reagent = red color

Example: *Escherichia coli*

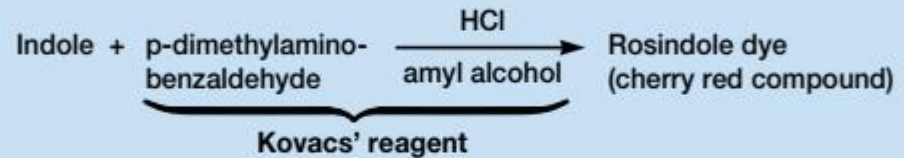
Negative test: tryptophan $\xrightarrow{\text{no tryptophanase}}$ tryptophan
tryptophan + added Kovac's reagent = no red color

Example: *Enterobacter aerogenes*

Biochemistry within bacteria



Biochemistry within tubes



Kovacs' reagent

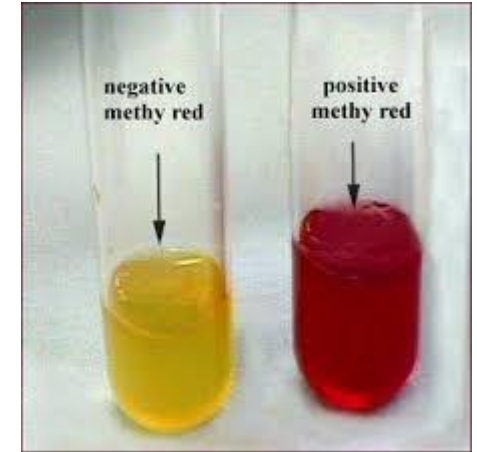


Indole -

Indole +

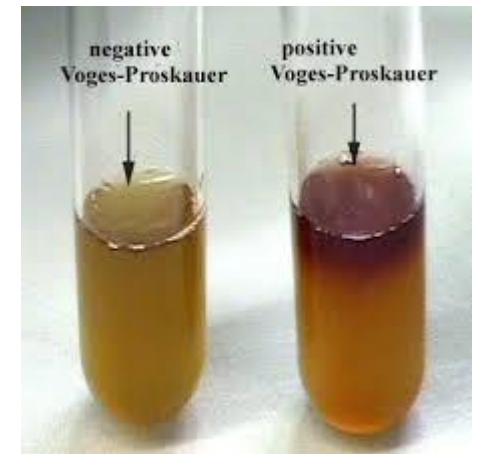
Réaction de Rouge de méthyle réalisée sur milieu Clark et Lubs

C'est un test qualitatif qui permet de distinguer les entérobactéries fortes productrices d'acides (RM+) des bactéries faibles productrices d'acides (RM-), par la métabolisation du glucose. Le rouge de méthyle à 0.04%, ajouté après incubation donne une coloration jaune (RM-) au pH faiblement acide et rouge (RM+) aux pH très acides.



Réaction de Voges-Proskauer réalisée sur milieu Clark et Lubs

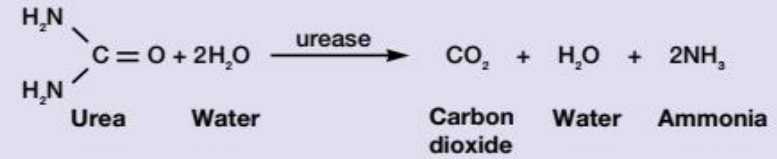
Ce test indique la présence de l'acétoïne qui est un métabolite spécifique de la fermentation butanediolique (VP+) elle-même caractéristique de certaines entérobactéries. La fermentation acide mixte est aussi spécifique d'autres bactéries qui donnent également un (VP-). Après incubation d'un milieu peptone-glucose, on ajoute de VP 1 et VP2 qui entraîne une coloration rouge en présence d'acétoïne.



Urease

Sur milieu urée indole

Biochemistry within bacteria



Biochemistry within tubes

Ammonia + phenol red \longrightarrow deep pink



(a)

(b)

(c)

(d)

Citrate

Ce test permet d'établir l'utilisation spécifique du citrate comme seule source de carbone par certaines espèces bactériennes ce qui provoque l'alcalinisation du milieu indiquée par virage d'un indicateur coloré de pH (milieux citrate de Simmons ou citrate de Christensen).



Mannitol-mobilité

Ce milieu, faiblement gélosé met en évidence la métabolisation du mannitol par certaines bactéries qui entraînent l'acidification du milieu, indiqué par le virage d'un indicateur coloré de pH. Ce milieu permet simultanément d'établir la mobilité éventuelle des bactéries matérialisée alors par leur diffusion autour de la pique centrale d'ensemencement du milieu.

Hydrogène sulfuré (H_2S) :

Elle est produite à partir des acides aminés soufrés. Il est mis en évidence par la couleur noire des complexes FeS formés avec le fer déjà présent dans le milieu.



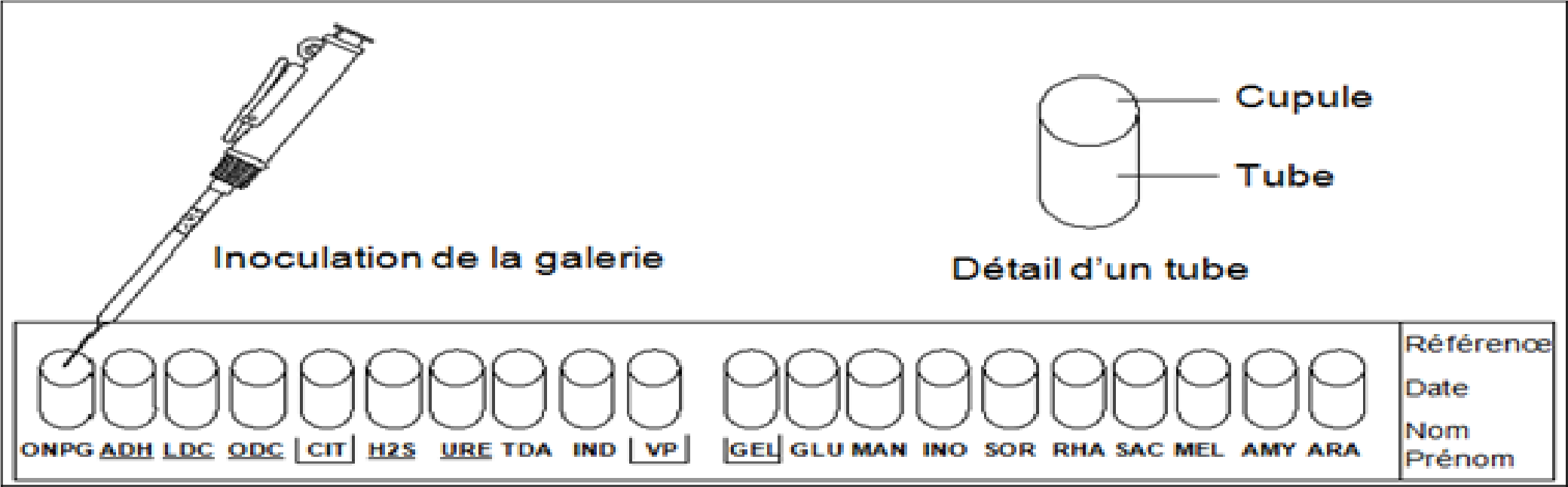
Fermentation des glucides

Elle est établie par la production d'acides ou d'acides et de gaz dans un milieu de base additionné de glucose ou d'autres glucides (MEVAG). L'acidification du milieu est indiquée par le virage d'un indicateur coloré de pH.

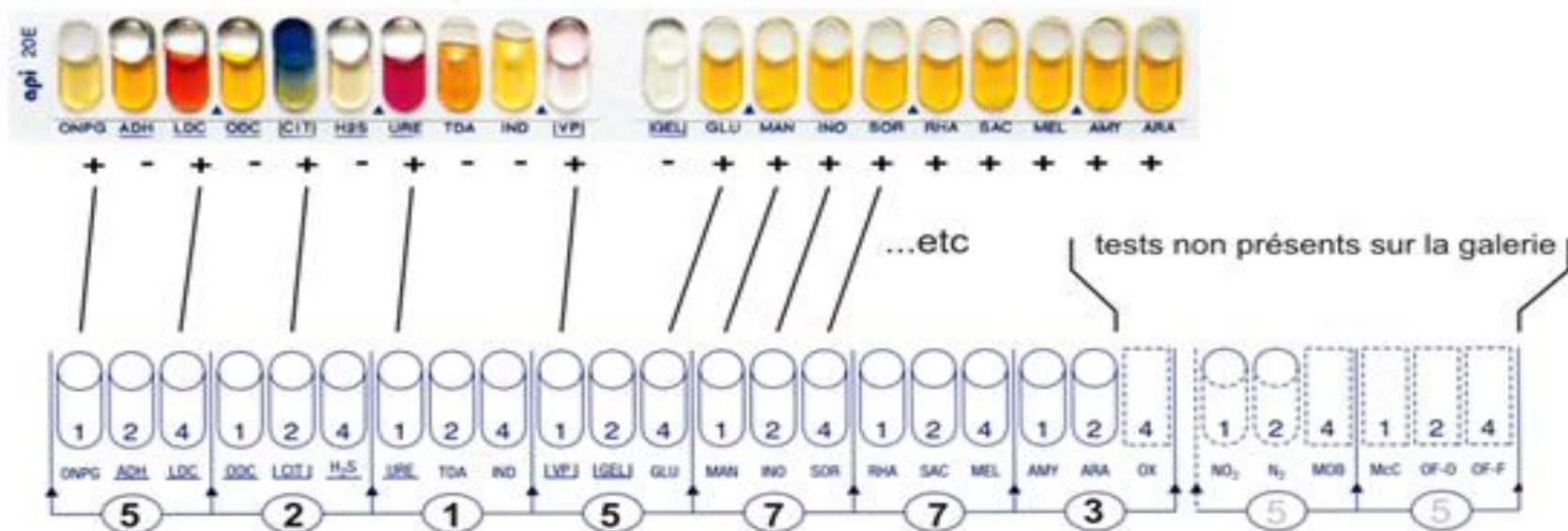
L'ensemble des caractéristiques obtenues de la souches a identifier doivent être compares avec celles des espèces de references pour determiner le nom d'espèce

Galleries miniaturisées

Elles se présentent sous la forme de kits-tests, intégrés en microplaques ou même automatisés et à lecture informatisée. Chaque plaque se compose de plusieurs tests miniaturisés, correspondant à l'analyse d'autant de caractères, sélectionnés pour leur valeur discriminante et statistiquement avérée.



Lecture de la galerie API 20E



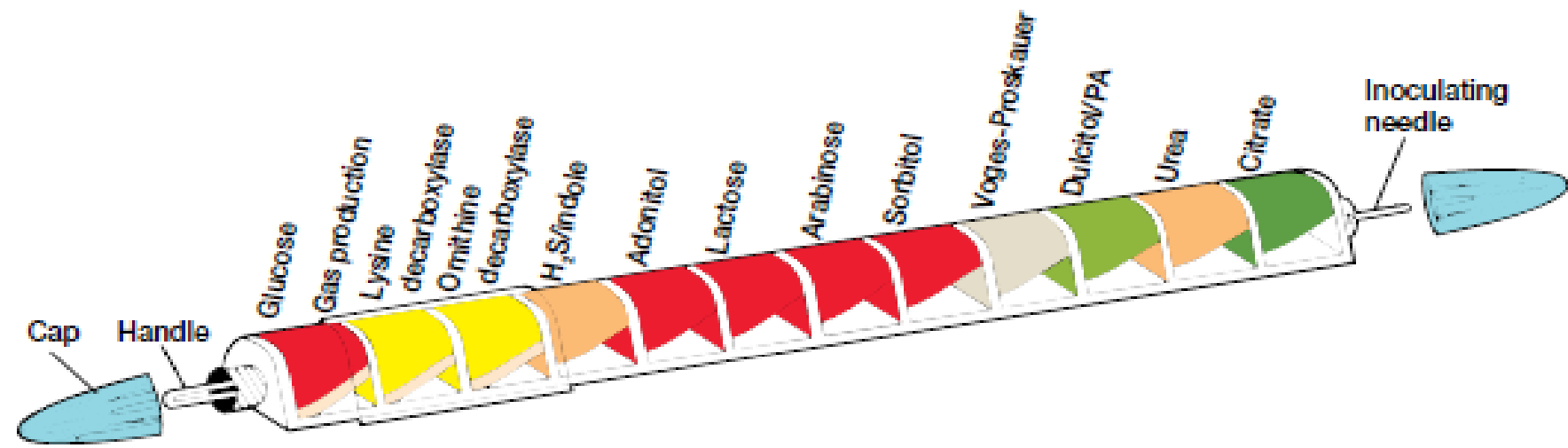
Code de la souche: **5215773**

Ident.

Klebsiella pneumoniae
ou *Serratia liquefaciens*

se référer au catalogue API
pour identifier la souche
d'après le code

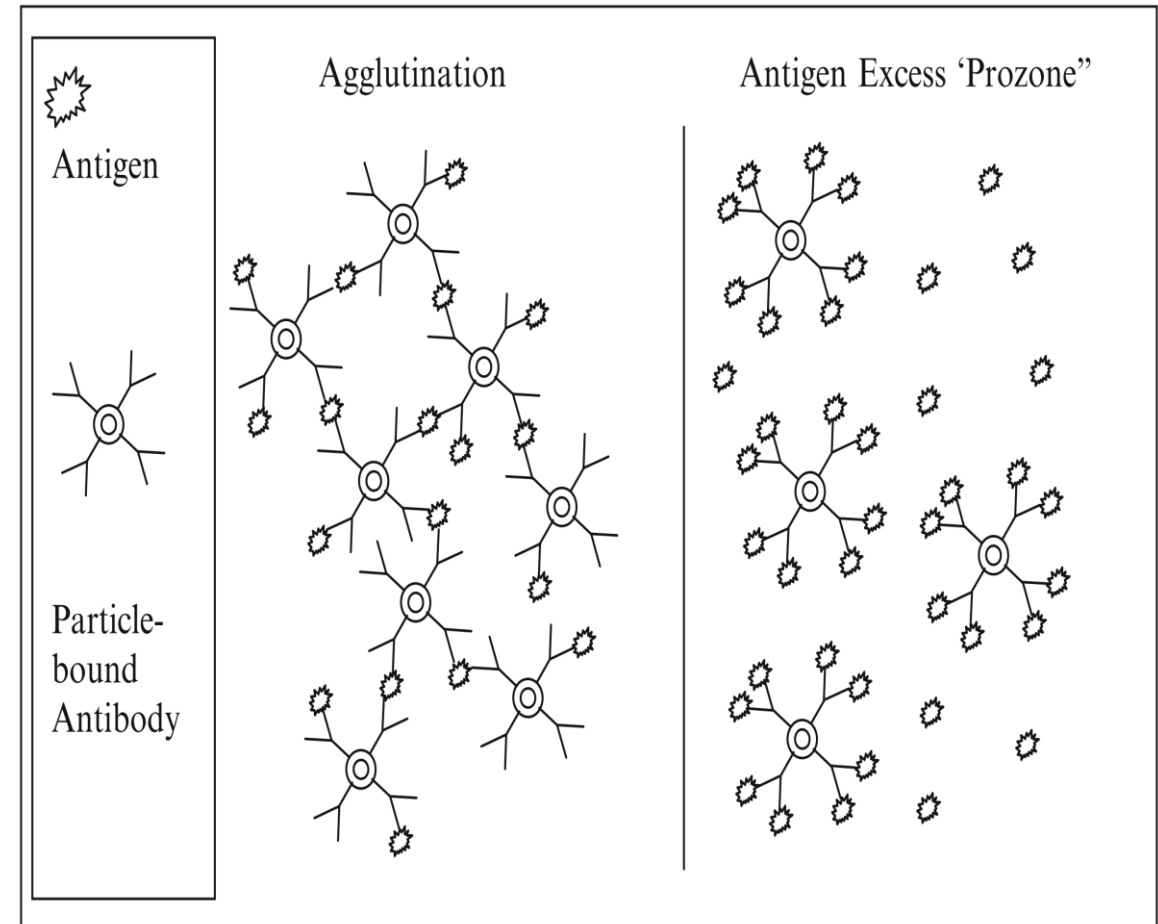
Enterotube II Multitest system



| | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|------------------|-------------|--------|------------------|-------------|
| G L U | G A S | L Y S | O R N | H ₂ S | I N D | A D O N | L A C | A R A B | S O R B | D U L | P A | U R E A | C I T |
| ② + ① | | ④ + ② + ① | | | ④ + ② + ① | | | ④ + ② + ① | | | | ④ + ② + ① | |
| 3 | | 4 | | | 3 | | | 6 | | | | 3 | |

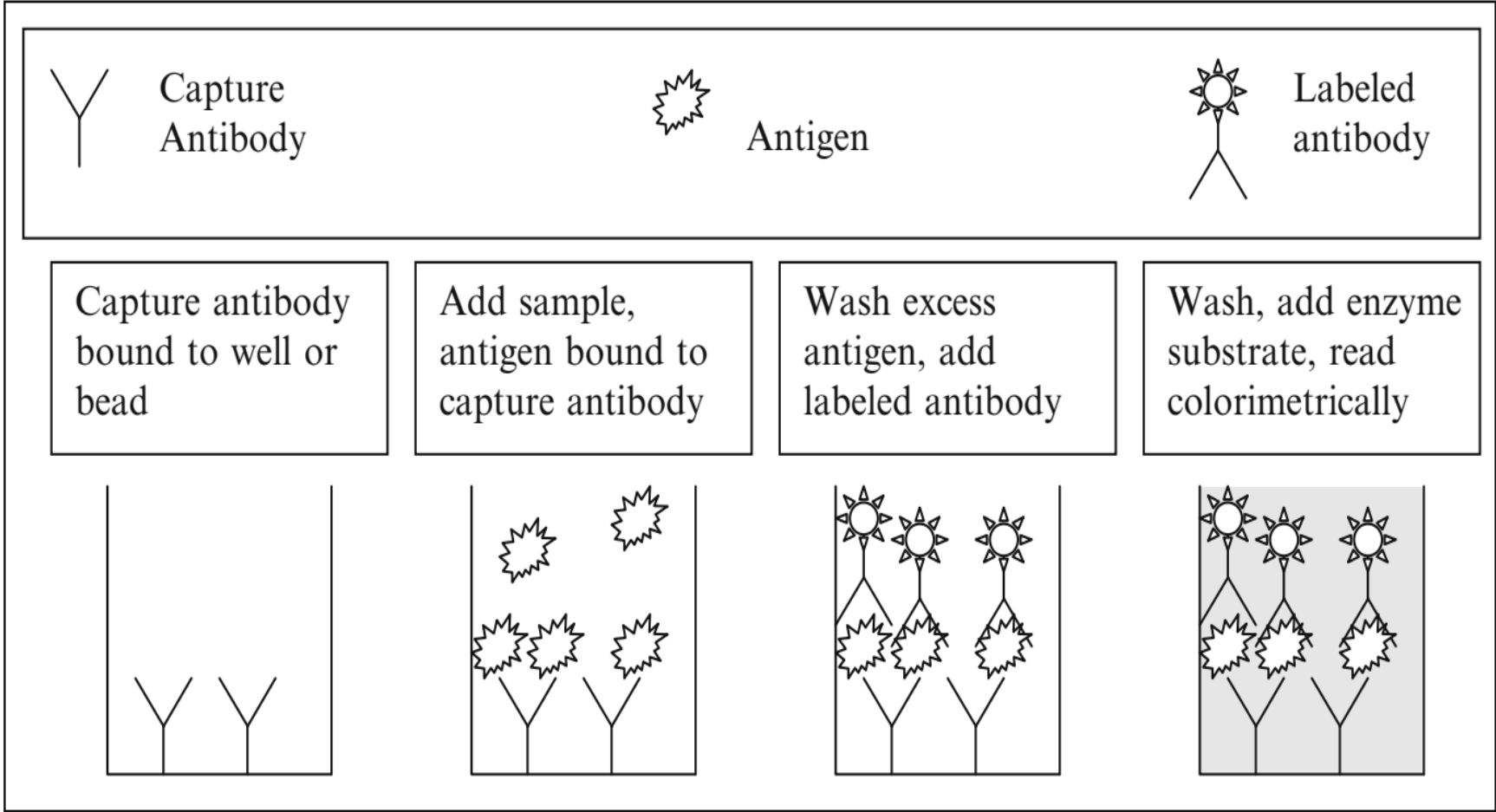
L'identification Sérologique d'une souche bactérienne inconnue consiste à mettre en évidence dans le sérum sanguin la présence d'anticorps spécifiques à une espèce bactérienne ou à ces diverses souches se fait plusieurs méthodes a savoir:

Les tests d'agglutinations sur lames consistent à mettre en contact l'échantillon contenant le germe à identifier (inconnu) en présence d'anticorps spécifiques. En présence de leurs anticorps les bactéries forment des **agglutinations**.



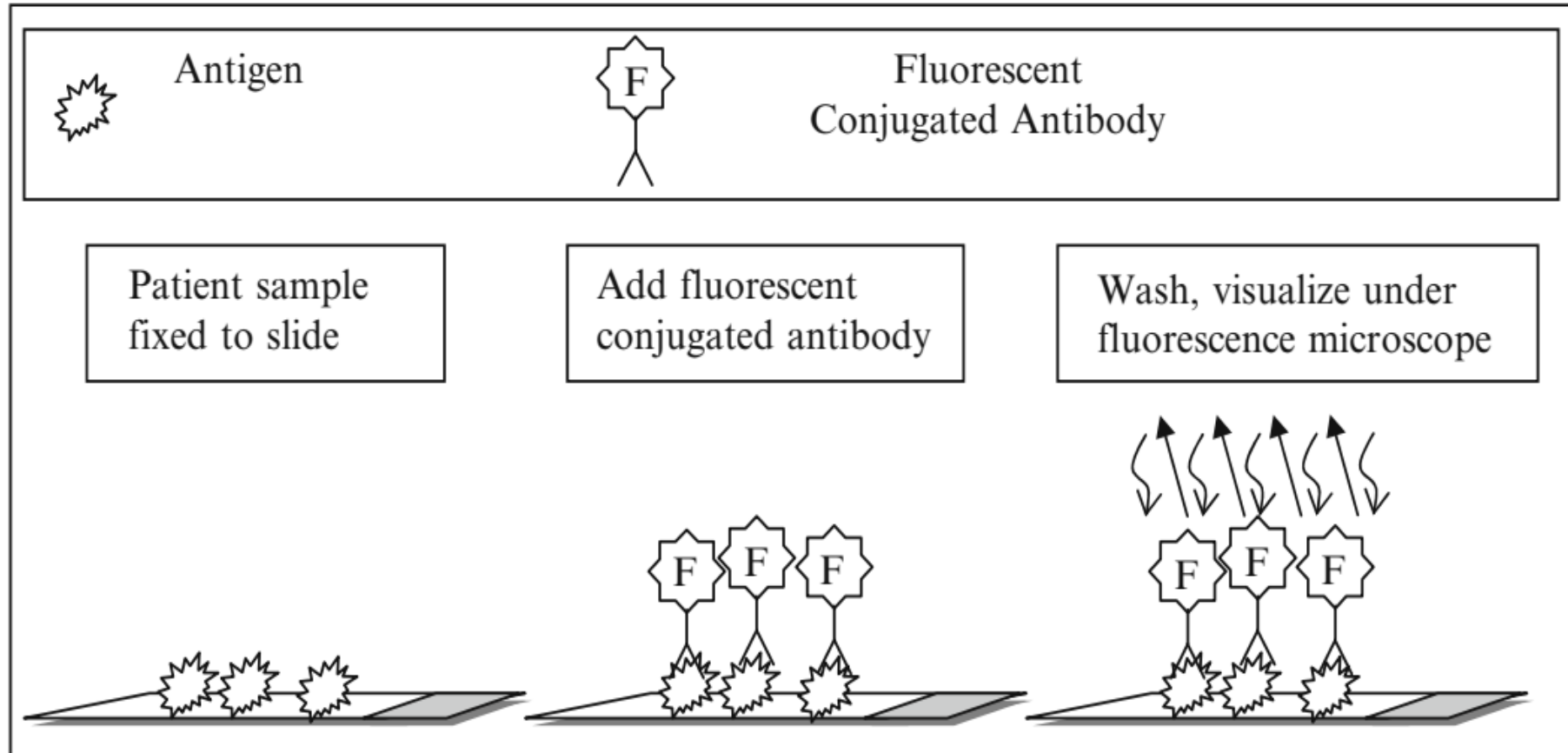
Les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

C'est une méthode d'identification immuno-enzymatiques des germes, basés aussi sur une réaction antigène- anticorps.



Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique microscopique qui utilise des anticorps spécifiques marqués avec des **fluorochromes** pour **détecter**, **localiser** ou **quantifier** des microorganismes ou des protéines exprimées dans des cellules infectées par le virus.



Identification moléculaire

L'identification moléculaire se base sur l'étude et l'analyse du matériel génétique de la souche à identifier et le comparer avec les souches de référence

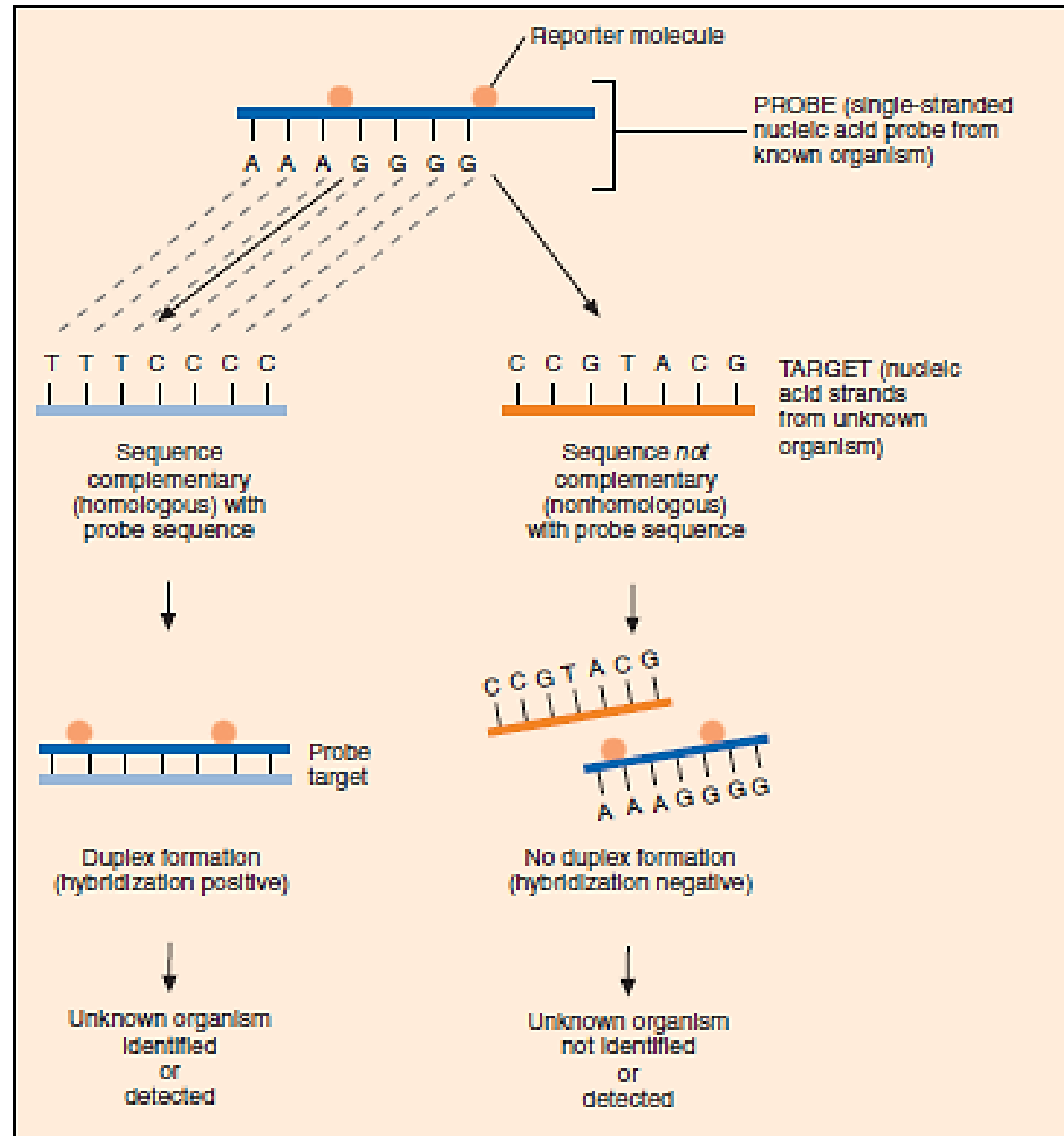
Analyse de l'ADN : dans le chromosome l'ADN à une structure bicaténaire issue de l'appariement des bases complémentaires par l'intermédiaire des liaisons hydrogène. Dans ce

cas on peut déterminer le coefficient de G+C%, dont, $G + C\% = \frac{G+C}{A+T+G+C} \times 100$.

Hybridation de l'ADN

L'hybridation de l'ADN est basée sur la propriété de brins d'ADN monocaténaire à s'associer en ADN bicaténaire, si leurs séquences en bases sont complémentaires c'est-à-dire sont homologues

L'appariement de 70 à 100% entre souches appartenant à la même espèce, s'il entre 0 à 60% les souches sont différentes.



Le séquençage des ARNr et autres séquences comme les ITS (Internal transcribed spacer)

- Isolement de l'ADN ;
- Amplification de gène 16S (PCR)

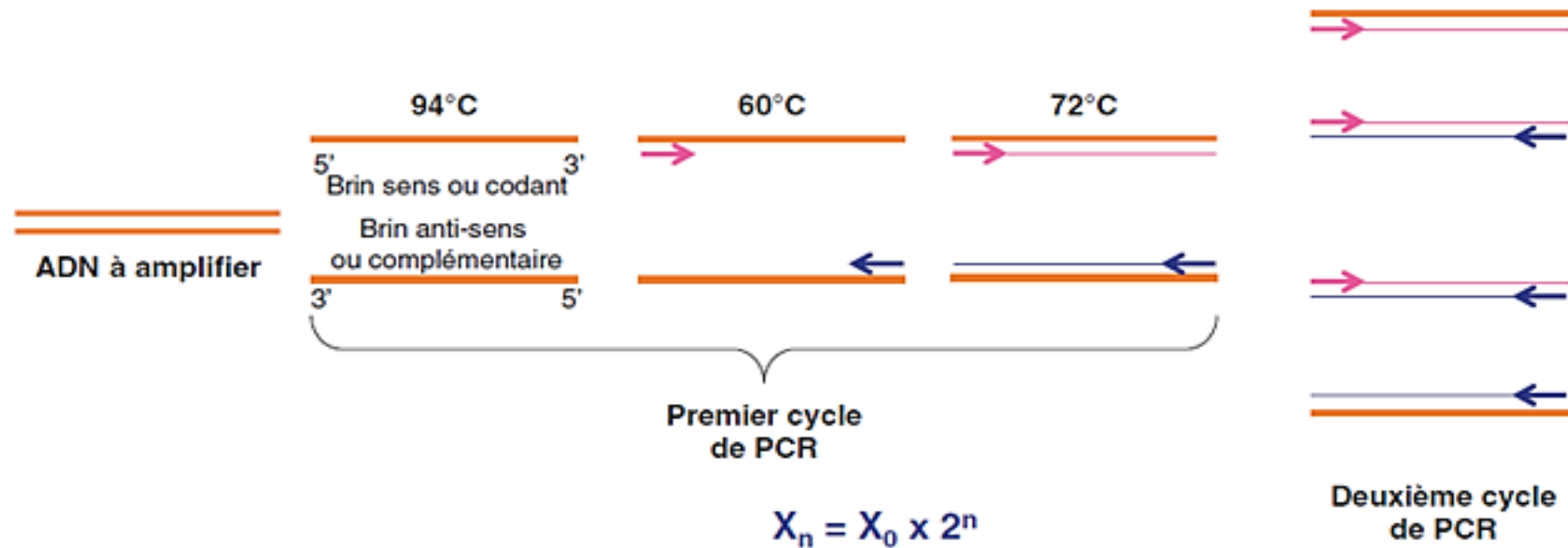
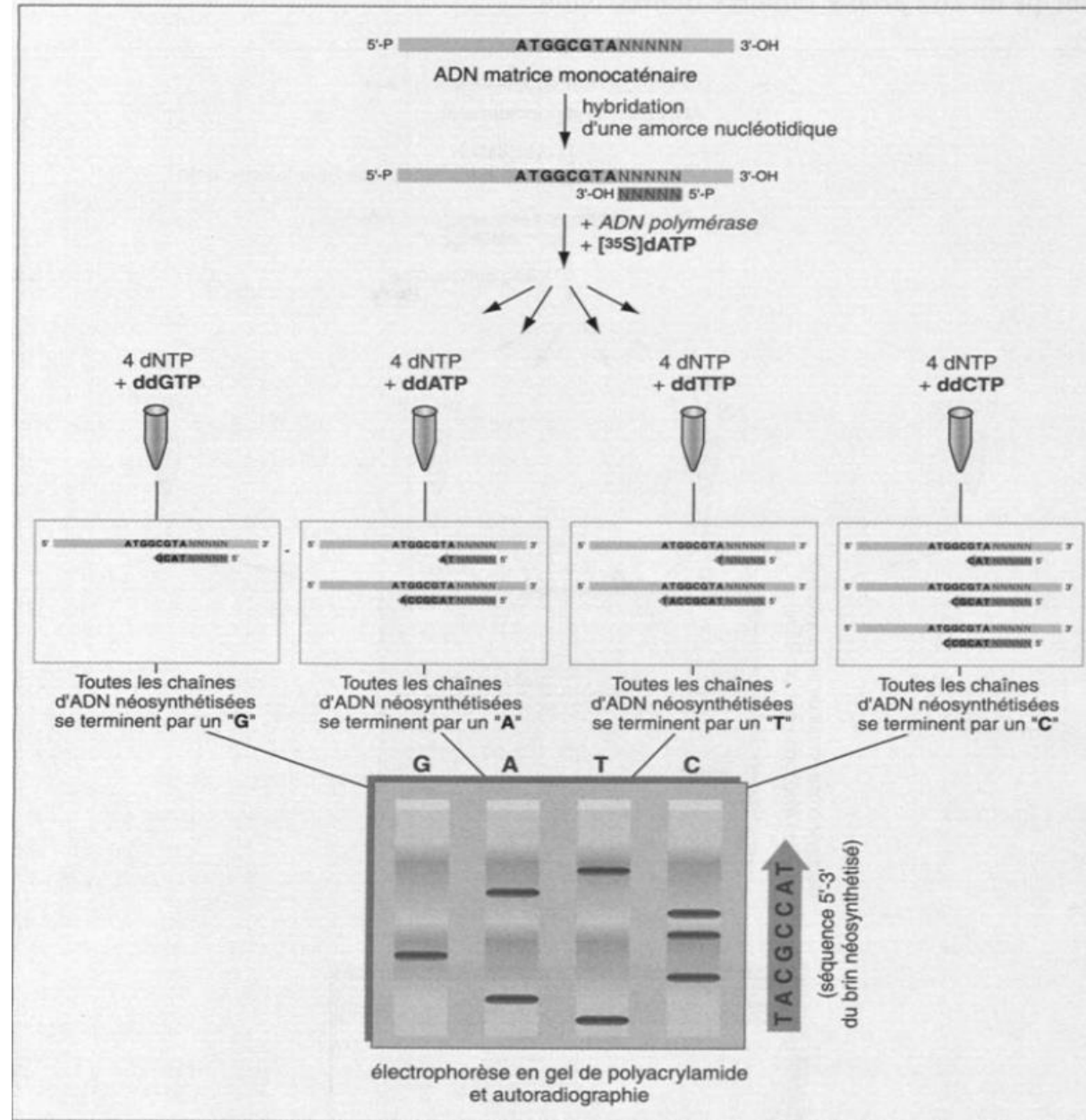


Fig. 5.1 Principe de la réaction de polymérisation en chaîne (*polymerase chain reaction* ou PCR).

L'ADN est soumis à une succession de changements de température : dénaturation à 94 °C (séparation des deux brins d'ADN) ; hybridation (ou *annealing*) des amorces spécifiques (amorce sens en rose, amorce anti-sens en bleu) avec la matrice à la température de fusion (T_f vers 60 °C) ; polymérisation enzymatique à 72 °C à partir des amorces. Répétition des trois étapes entre 30 et 40 fois. La quantité de la séquence à amplifier est définie par l'équation $X_n = X_0 \times 2^n$ (n : nombre de cycles ; X_0 : quantité initiale d'ADN ; X_n : quantité d'ADN au n ème cycle).

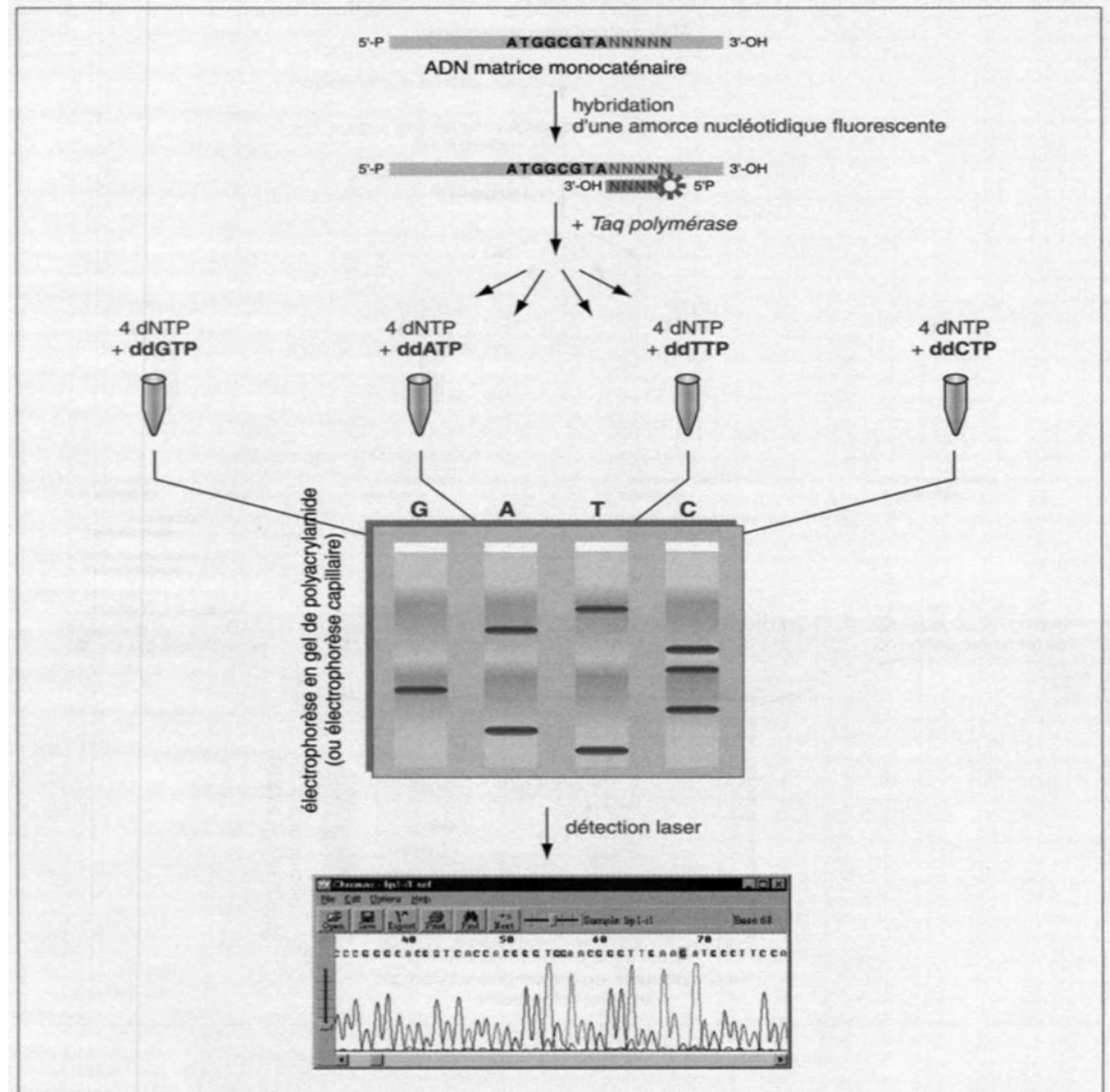
- Séquençage (méthode de Sanger)

Séquençage



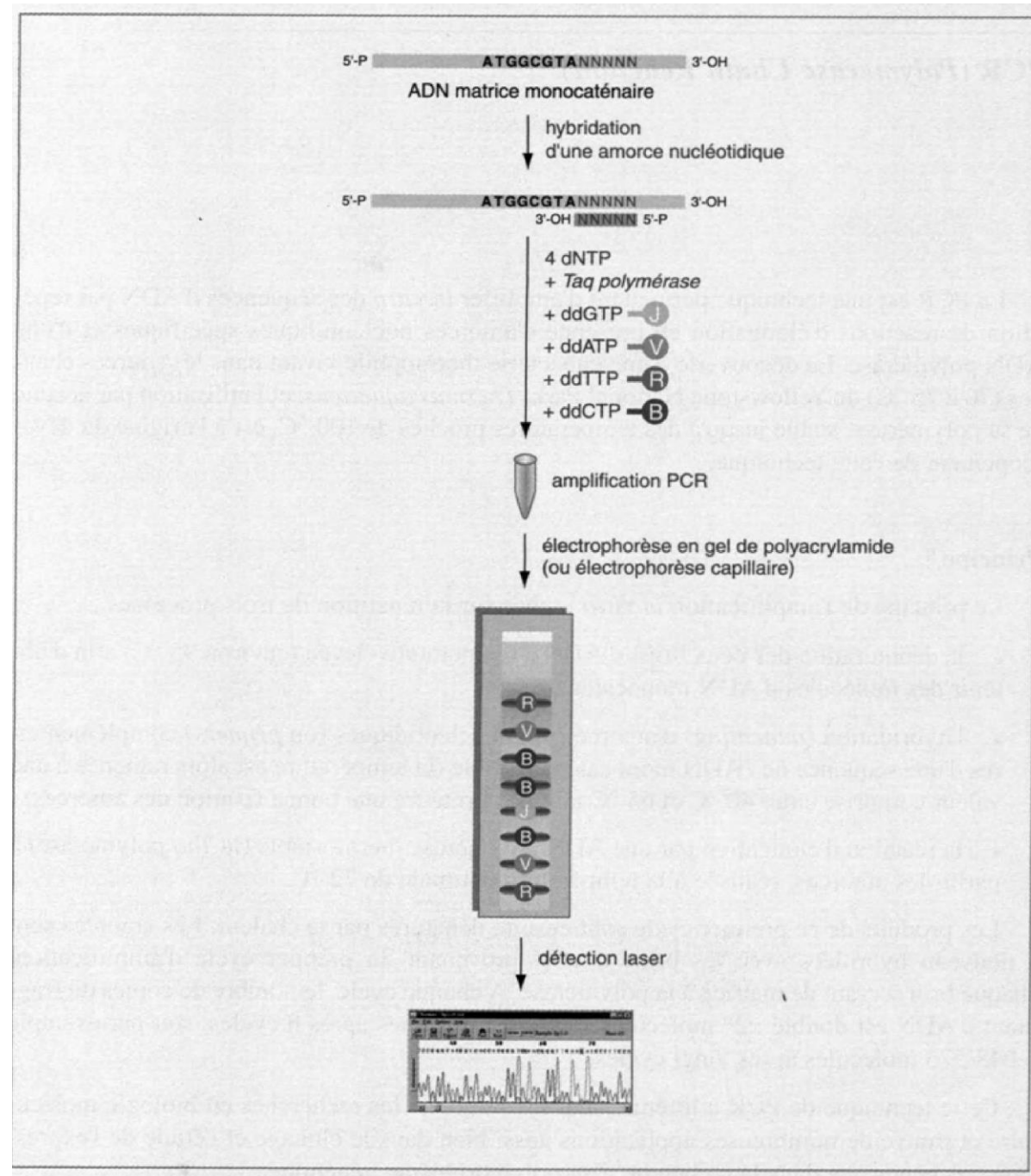
Séquençage automatique (1)

Lors de ces analyses, la lecture du gel et l'acquisition des données sont automatiques. Dans ce cas, le marquage des molécules se fait à l'aide de marqueurs fluorescents (amorce fluorescente).

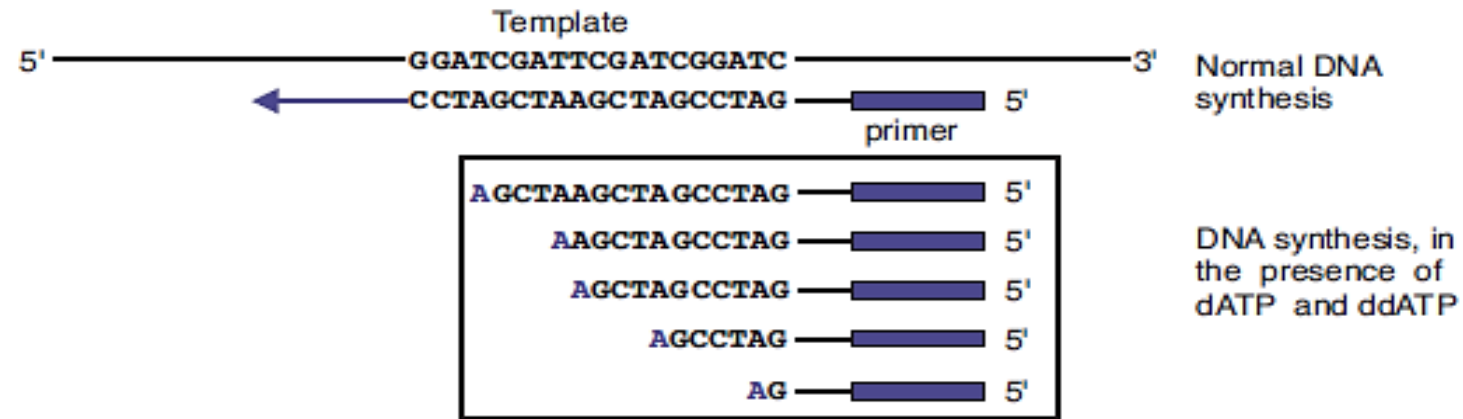


Séquençage automatique (2)

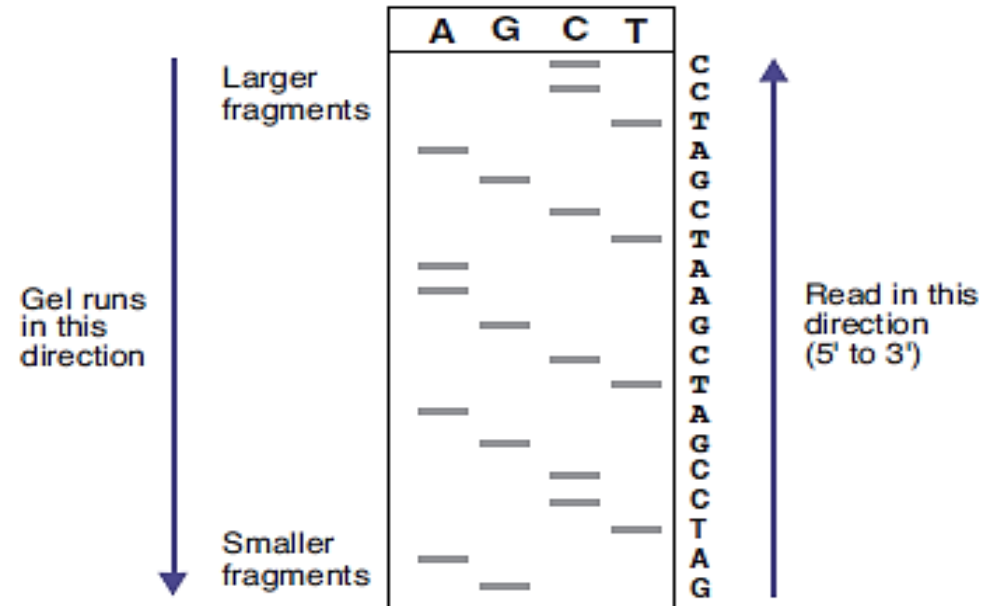
Nucléotides fluorescents



Exemple



Similar reactions are carried out with ddGTP, ddCTP and ddTTP. The fragments from the four reactions are separated on an acrylamide gel and detected by autoradiography



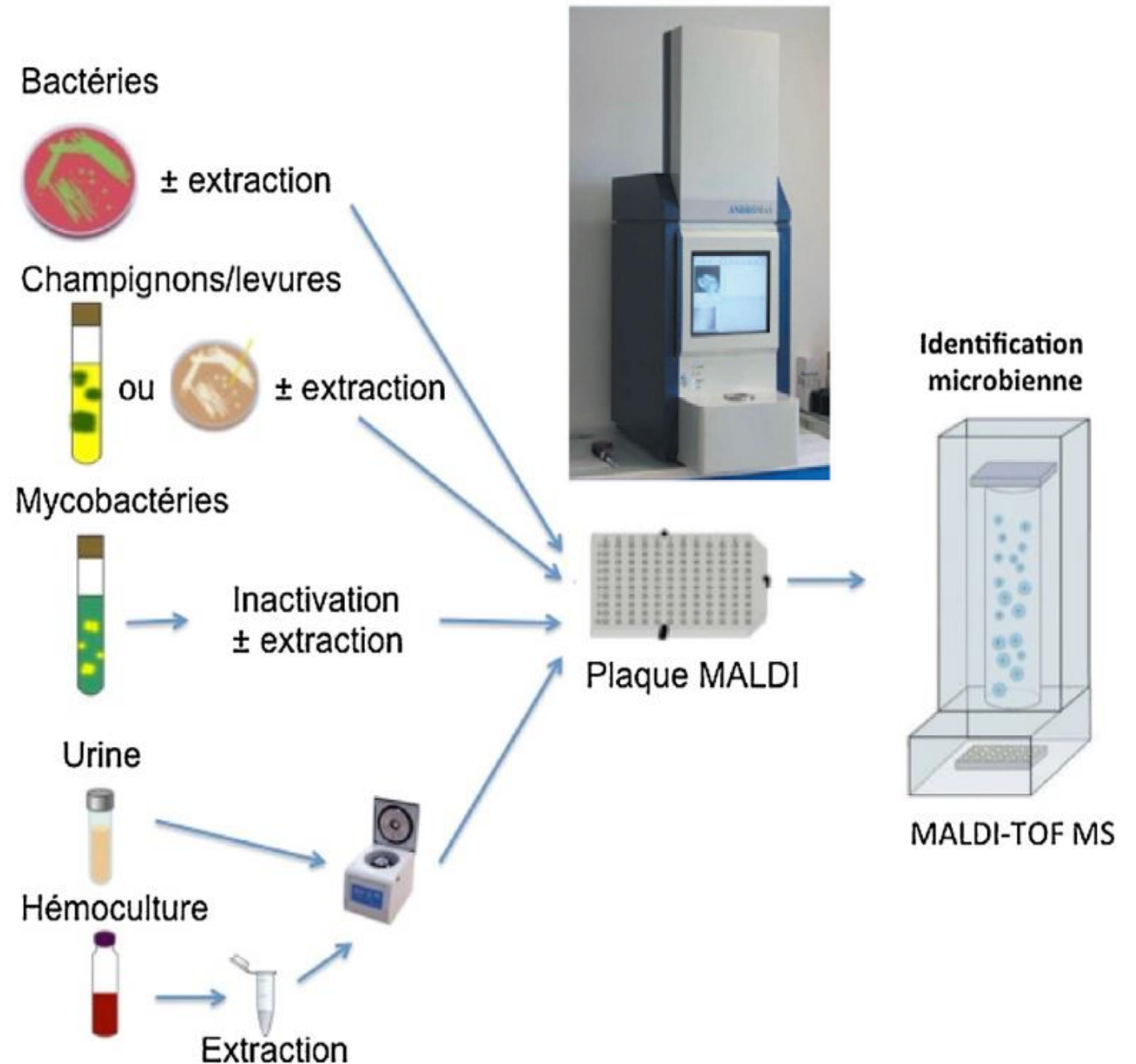
- Identification

Une fois la séquence est obtenue on doit la comparer avec celles des souches de références déposées dans des banques comme **Genbank** en utilisant des logiciels de comparaison comme **Blast** pour déterminer l'espèce.

Spectroscopique (MALDI-TOF)

L'identification des micro-organismes reposait jusqu'à présent sur l'étude des caractères cultureux et biochimiques des espèces bactériennes et fongiques. Depuis quelques années, la spectrométrie de masse de type **Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF)** s'est développée dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette nouvelle technologie permet de réaliser très rapidement et à moindre coût un diagnostic d'espèce sur des colonies de bactéries ou de champignons isolés sur des milieux de culture solides. Par ailleurs, il est aussi possible d'identifier les germes directement à partir de flacons d'hémocultures positifs ou à partir de certains prélèvements comme les urines.

Extraction des protéines en utilisant l'acide formique 70 % et de l'acétonitrile.



La préparation des échantillons est actuellement réduite au simple dépôt de la colonie dans la grande majorité des cas, bien que certains micro-organismes exigent une étape d'extraction, qui peut être un simple ajout **d'acide formique** ou une extraction totale avec un mélange **éthanol/acétonitrile**

La matrice est composée de petites molécules d'acide possédant un fort pouvoir d'absorption dans la gamme de longueur d'onde du laser. La matrice **HCCA** (**acide a-cyano-4-hydroxycinnamique**) et **l'acide sinapinique** (SA) étant les plus **performants pour la détection des composés protéiques**, ce sont les plus utilisées pour l'identification bactérienne. Une solution d'une de ces molécules est généralement préparée dans un mélange d'eau, de solvant organique (**acétonitrile ou éthanol**) et d'acide **trifluoroacétique**

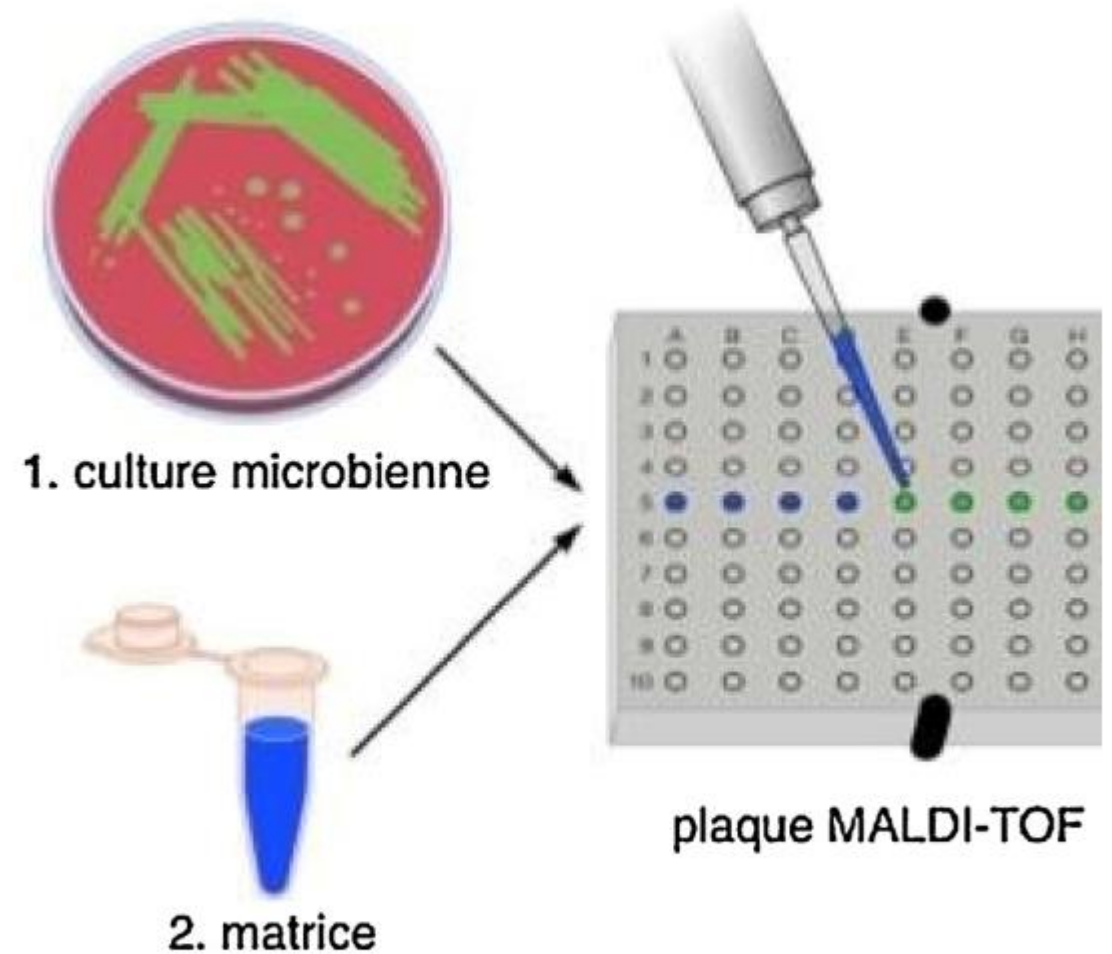


Fig. 1. Préparation de l'échantillon pour l'analyse en MALDI-TOF. Les colonies bactériennes ou fongiques isolées sur milieu solide (ou concentrées à partir de milieu liquide) sont déposées directement sur la plaque MALDI, puis recouvertes par la matrice. Après séchage, la plaque est introduite dans le spectromètre de masse.

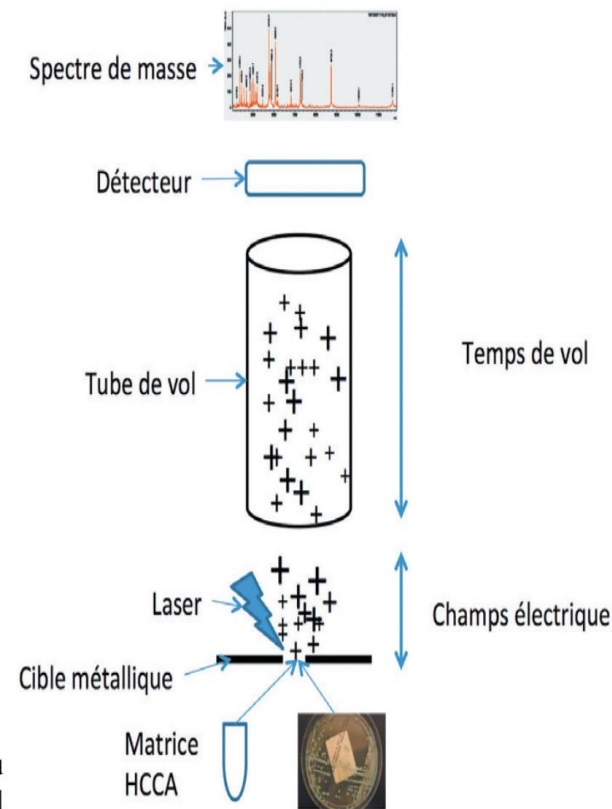
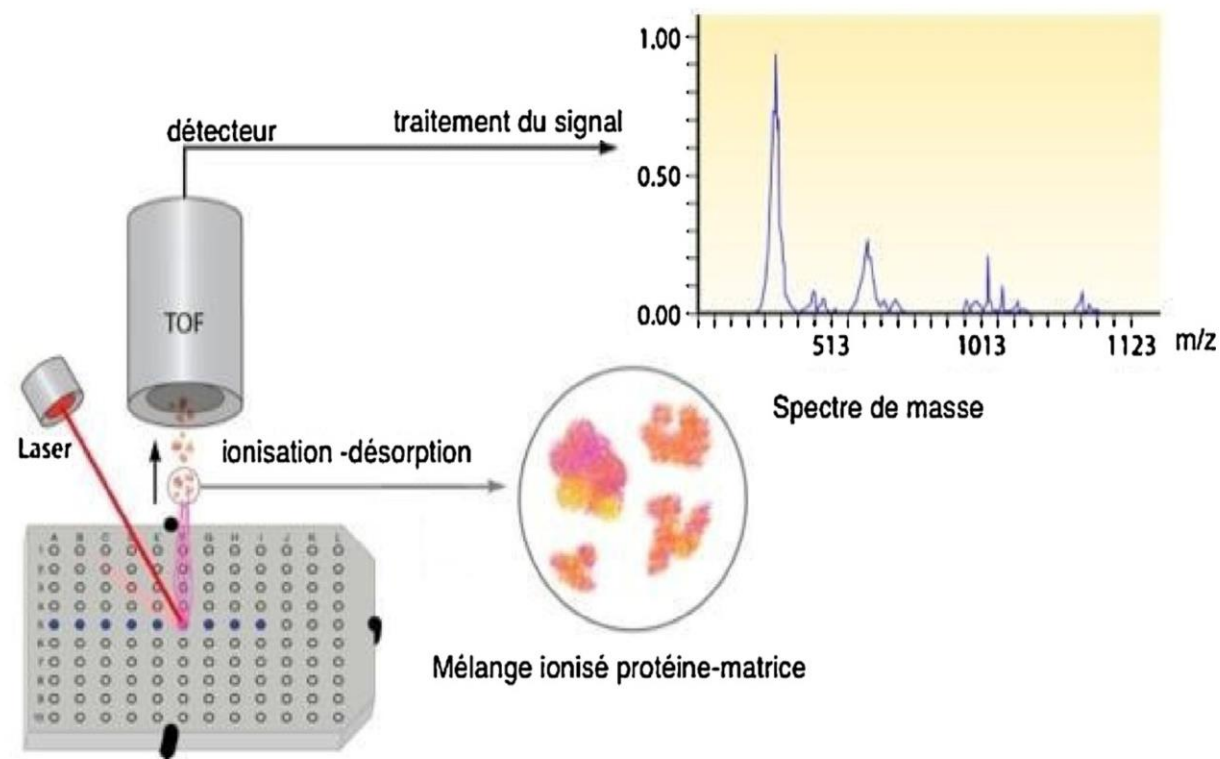


Fig. 2. Analyse MALDI-TOF. Le mélange échantillon/matrice co-cristallisé est bombardé par un faisceau laser, permettant ainsi l'ionisation et la désorption des molécules du mélange matrice/échantillon. Les molécules ionisées passent alors dans un tube de vol et sont séparées selon leur ratio masse/charge (m/z) en fonction de leur temps de vol (TOF). Les ions arrivent sur un détecteur qui amplifie le signal. Le résultat est traduit sous la forme d'un spectre de masse.

Il existe deux façons de caractériser les micro-organismes par la technique MALDI-TOF : d'une part, la **comparaison du spectre entier** avec des bases de données **d'empreintes spectrales de référence**, d'autre part, la **comparaison des masses (m/z) du spectre**, ou biomarqueurs, **a une base de données issue du protéome**.