

Méthodes d'isolement et d'identification des micro-organismes

I- Méthodes d'isolement

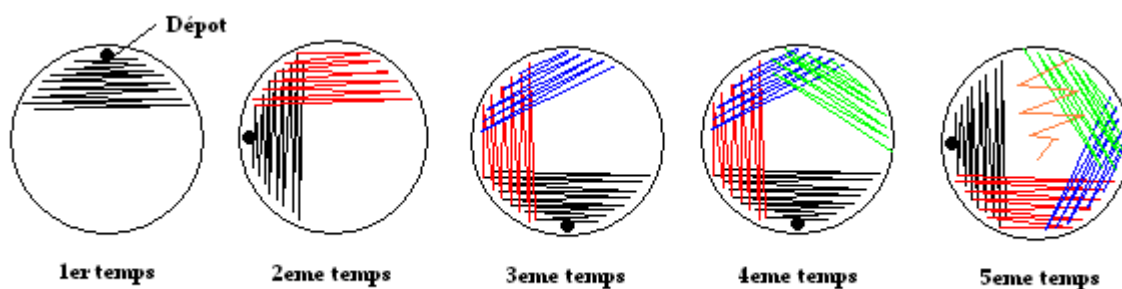
Pour étudier les microorganismes, il est indispensable de les isoler et d'en faire une culture pure. Deux techniques sont alors utilisées :

- la méthode des stries
- la méthode des dilutions

1- La méthode des stries

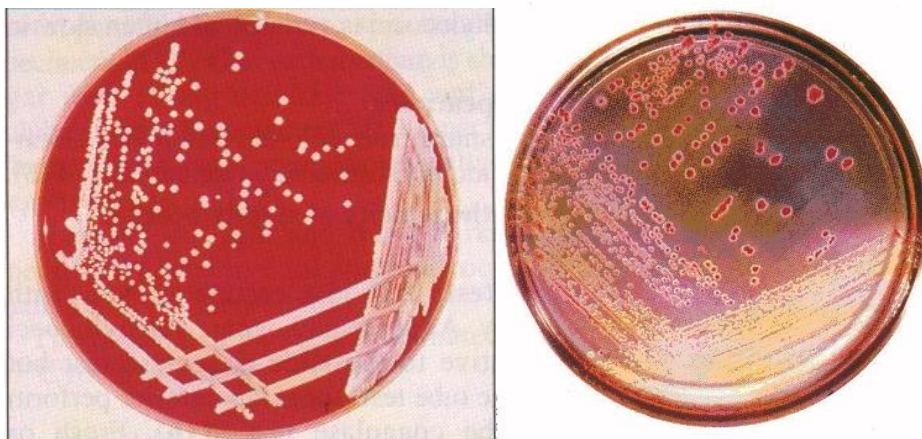
Cas d'un ensemencement en surface à partir d'un prélèvement liquide ou solide :

- prendre les précautions habituelles pour un ensemencement (n'ouvrir que le temps nécessaire à l'exécution des stries et n'ouvrir alors la boîte que devant un bec Bunsen)
- porter l'anse au rouge dans la flamme du bec, la laisser refroidir dans la zone stérile et avec l'autre main entrouvrir la boîte de culture (solide) ou le tube (liquide)
- prélever une colonie ou une goutte de suspension avec l'anse, refermer la boîte ou le tube et prendre la boîte vierge
- ensemercer de la façon suivante :



- les boîtes de Pétri sont mises en position renversée à l'étuve à 30°C. Observer après 24 à 48 heures selon le cas (la position renversée permet à l'eau de condensation de s'évaporer).

Si la technique est correctement réalisée et si le dépôt n'est pas trop important, après incubation, la boîte doit présenter des colonies isolées en son centre :



2- La méthode des dilutions

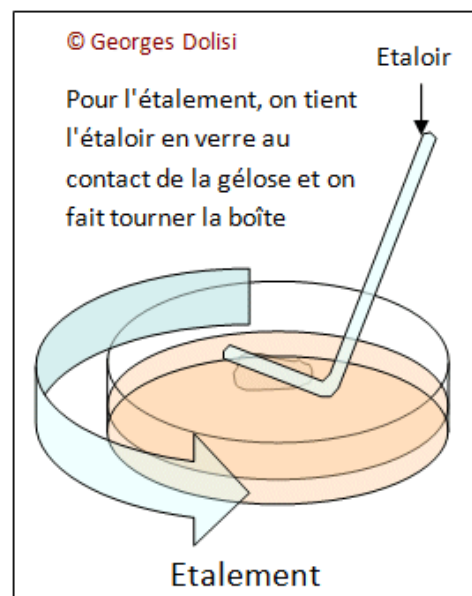
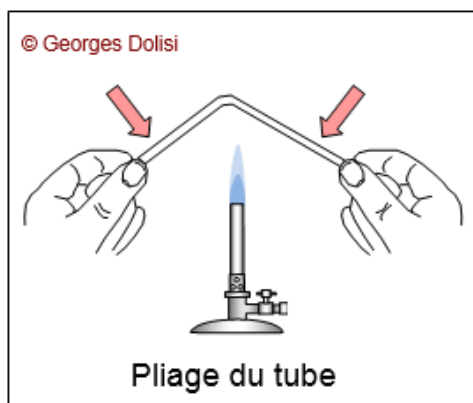
Cas d'un ensemencement en surface par étalement d'un milieu liquide :

Cette technique permet, après un étalement sur milieu solide, d'évaluer le nombre de colonies par ml de suspension. Elle peut permettre également, si l'on ne dispose pas de lame à numération, la détermination du nombre de cellules par unité de volume ou du nombre de cellules présentes dans une colonie.

Préparation de dilution (tube 1 à 10) : cf. méthodes d'estimation des populations microbiennes.

Fabrication de l'étaleur en verre :

- à la flamme d'un bec Bunsen, plier la partie capillaire à environ la moitié de sa longueur de façon à en faire un angle de 120°
- procéder de même pour plier à la moitié le segment précédent de façon qu'il fasse un angle aigu
- replier de la même façon l'extrémité vers le haut sur un demi-centimètre environ
- l'étaleur est maintenu dans un flacon d'alcool
- déposer sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé, 0.1 ml de chacune des dilutions indiquées
- étaler avec l'étaleur de façon uniforme par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose (ne pas ratisser la surface de la gélose).
- laisser sécher les boîtes 10 min, les déposer ensuite à l'étuve, après les avoir retournées, observer 24 heures plus tard.
- compter les colonies apparues aux dilutions de 3-300 colonies, faire la moyenne des chiffres obtenus en ramenant tout à la même dilution. Evaluer alors le nombre de colonies par ml de suspension donnée.



II- Méthodes d'identification des micro-organismes

Identifier pour mieux connaître les micro-organismes, leur diversité, leur fonction. Mais difficile car on n'a pas une seule méthode universelle, certaines marchent pour des micro-organismes mais d'autres non.

- Identification : analyser les souches étudiées et les comparer à celles des groupes déjà connus

1- Méthodes enzymatiques

1-1- Test oxydase

Principe :

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries (Gram négatif) à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N-diméthyl paraphénylène diamine.

Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air.

phénylène diamine oxydase

Réactif incolore $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ composé rosé

Technique :

Le réactif peut se trouver sous deux formes :

- soit en solution : sur une lame de verre, déposer un carré de papier filtre et l'imbiber d'une solution fraîchement préparée de réactif,
- soit sous la forme d'un disque pré-imprégné par le réactif.

Dans les deux cas, écraser avec une effilure de pipette Pasteur une colonie de germes à étudier sur ce papier.

Lecture :



test est positif.
Oxydase +

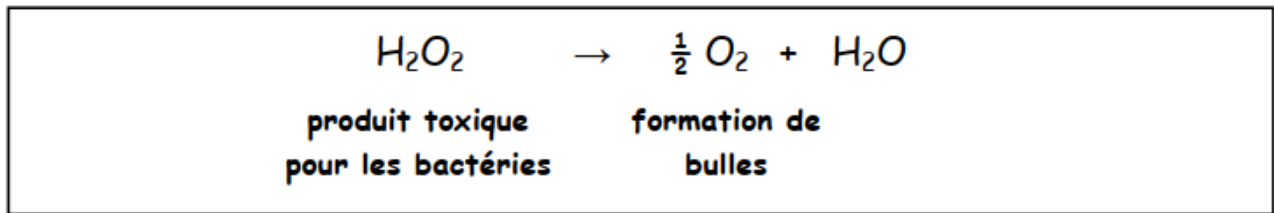


test est négatif.
Oxydase -

1-2- Test catalase

Principe :

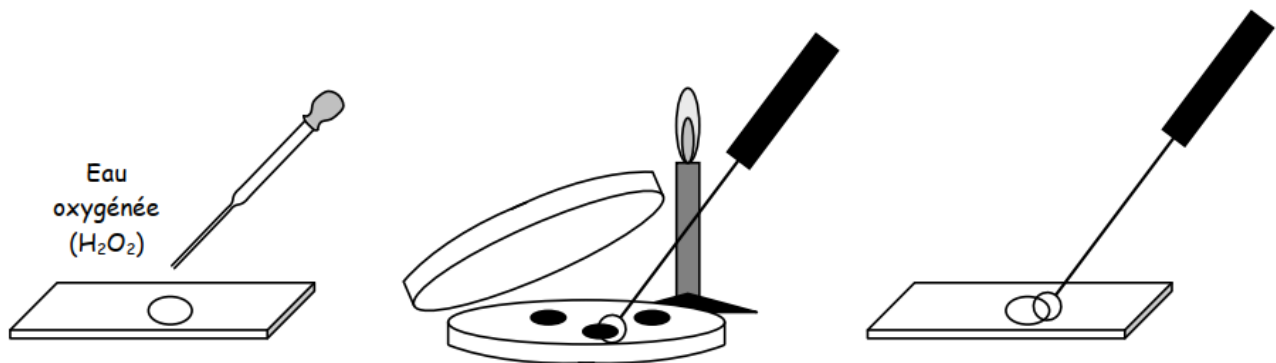
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :





Le test consiste à mettre des bactéries (Gram positif) en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

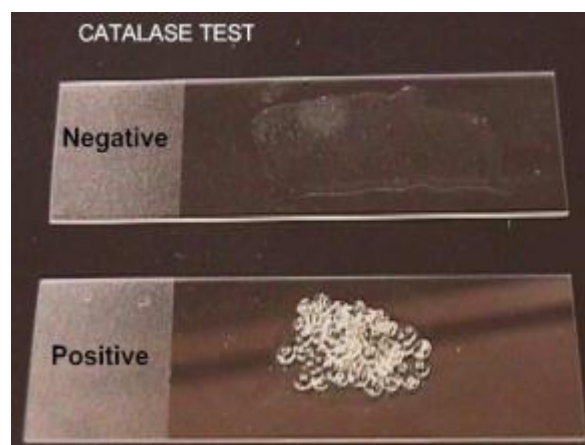
Technique :

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- Prélever une colonie à l'aide de l'anse
- Dissocier la colonie dans la goutte.



Lecture :

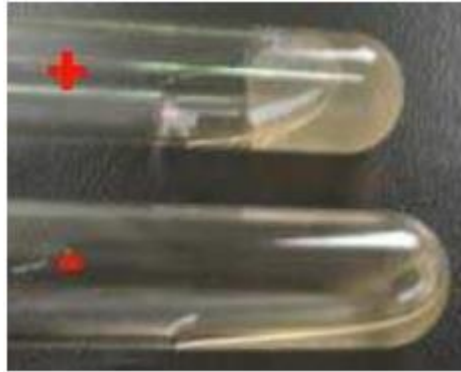
Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase +	Catalase -
	



1-3- Test 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.



2- Méthodes phénotypiques

C'est une étude simple par microscopie. La forme d'un micro-organisme est un caractère stable, cette forme est conditionnée par l'expression coordonnée de nombreux gènes.

Les bactéries peuvent être sous forme de coque, bacille, spirale, filamenteuse. Chez certaines on peut retrouver des formes étoilées ou carrées.

On peut regarder d'autres caractères morphologiques :

- Mobilité grâce à des flagelles. On peut ensuite regarder l'implantation des flagelles.
- Présence de capsule observable avec de l'encre de chine. Elle ne pourra pas traverser la capsule si la capsule existe.
- Présence de spore, sa position et si elle est déformante.

3- Examen microscopique après coloration de Gram

Coloration de Gram

Principe :

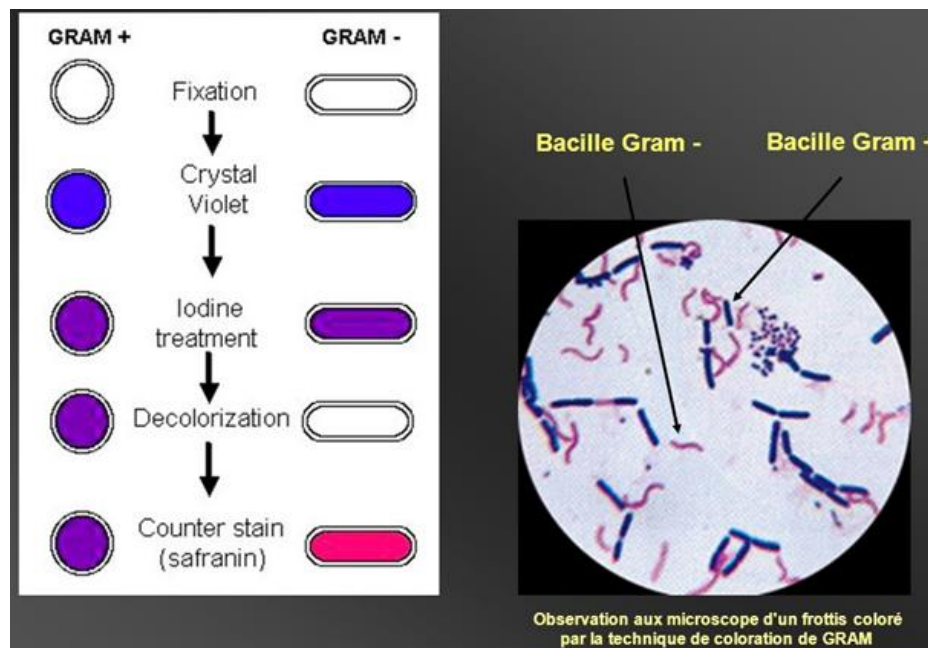
La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Les bactéries non décolorées par l'alcool sont dites à **Gram positif** ; elles apparaissent en **violet** tandis que les bactéries à **Gram négatif**, décolorées par l'alcool et recolorées par le colorant de contraste, apparaissent 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.

Technique :

- 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
- Observation au microscope. Ajouter une goutte d'huile à immersion sur la lame pour l'observation à l'objectif 100.



4- Galerie d'identification biochimique

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.

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

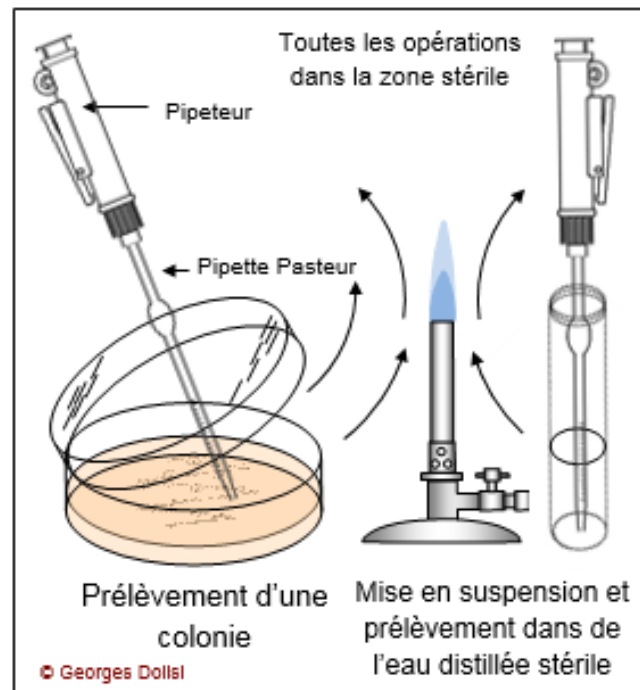
LA GALERIE API 20 E

La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram- appartenant à la famille des Enterobacteriaceae.



Préparation de l'inoculum :

- Introduire quelques mL d'eau distillée stérile (avec une pipette Pasteur) dans un tube à vis stérile.
- Avec la pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.



- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

Inoculation de la galerie API 20 E

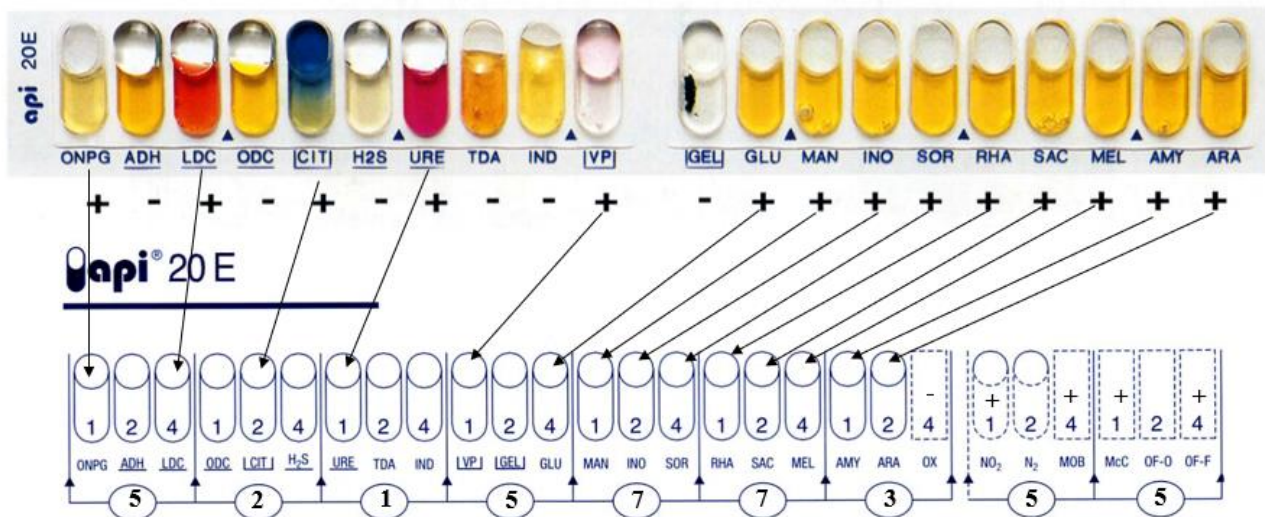
- Avec la suspension bactérienne et la pipette ayant servi au prélèvement, **remplir tubes et cupules** des tests **CTI VP GEL**
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests **ADH**, **LCD**, **ODC**, **URE**, **H₂S** en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

- Inoculation de la galerie

Détail d'un tube © Georges Dolisi

Référence	Date	Nom	Prénom
ONPG	ADH	LDC	ODC
CIT	H2S	URE	TDA
IND	VP	GEL	GLU
MAN	INO	SOR	RHA
SAC	MEL	AMY	ARA

Résultats de la galerie:



<p>Code n°: 5 215 773 (55)</p>	<p>Ident.</p>
---------------------------------------	---------------

<https://www.youtube.com/watch?v=BDVpQLyktkk>

5- Méthodes sérologiques

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 délai minimum de 8 à 10 jours.

Techniques :

a- Principe de la réaction ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) :

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

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**

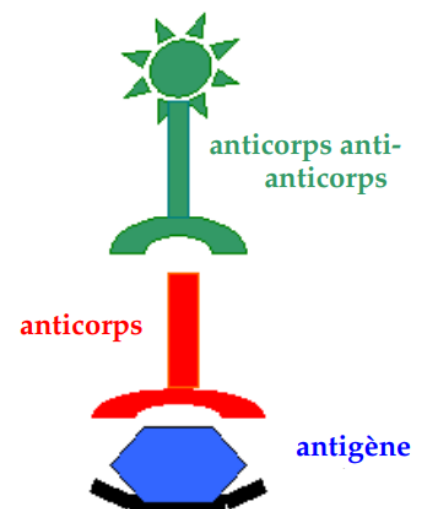
- **anticorps (Ac)** présents dans le sérum

- **antigène (Ag)** adsorbé sur un support plastique

• Détection du complexe **antigène-anticorps** :

par fixation d'un **anticorps anti-anticorps 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.



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.



b- 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

6- Méthodes moléculaires

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). **Cf. méthodes de biologie moléculaire**