

Application à l'étude des principaux groupes microbiens :

Techniques d'étude des bactéries

Analyse bactérioscopique : consiste en l'observation microscopique des bactéries sur lame après coloration spécifique : Coloration de GRAM, Coloration de STAMP pour la mise en évidence de *Brucella*, *Coxiella burnetii* (agent de la Fièvre Q) et de *Chlamydia* et Coloration de ZIEHL pour la mise en évidence des Mycobactéries.

L'analyse bactérioscopique est une technique spécifique donnant une réponse rapide (< 1 jour) mais peu discriminatoire.

Analyse bactériologique : consiste à la culture, l'isolement et l'identification (morphologique, biochimique, physiologique, antibiogramme, etc.) de la plupart des bactéries aérobies et anaérobies capables de pousser sur milieux acellulaires (la culture et l'identification des bactéries appartenant aux ordres des Rickettsiales et des Chlamydiales nécessitant la présence de cellules, ne sont effectuées que dans des laboratoires spécialisés).

Techniques d'étude des levures

Pour l'isolement des levures, la plupart des investigateurs ont employé des milieux organiques complexes, contenant des ingrédients comme l'extrait de malt, l'extrait de levure et le peptone, en combinaison avec le glucose. La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van, (1984) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de Lodder, (1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses. Il s'agit d'un groupe hétérogène. Les levures se distinguent des autres champignons par une taxonomie basée à la fois sur des caractères culturaux, morphologiques, sexuels et physiologiques. En effet, les critères d'identification n'ont pas tous la même importance, ils doivent être utilisés dans un ordre bien déterminé Certaines espèces peuvent former des filaments de type mycélien. Ces filaments sont parfois mis en évidence par l'examen microscopique précédent. Dans des milieux pauvres et sous tension d'oxygène réduite, la formation de chlamydospores et de ballistospores est observée.

La formation d'ascospores est un critère taxonomique très important. Différents milieux de sporulation sont utilisés, pour mettre en évidence les asques, leur forme, la couleur et le nombre de spores par asque, par sa reproduction sexuée. Les principaux critères physiologiques utilisés dans la classification des levures, sont la fermentation et l'assimilation de différent substrats. Les levures assimilent généralement l'ammonium, les peptones, les acides aminés et parfois l'urée. Certains substrats azotés comme les nitrates, les nitrites, l'éthylamine, la cadavérine, l'urée, etc. ne sont utilisés que par certaines espèces ; propriété spécifique pour leur identification . L'apparition de la biologie moléculaire à permis de comprendre que les méthodes d'identification des micro-organismes fondées sur les phénotypes des différents individus n'étaient pas toujours faibles, car les résultats pouvaient varier dans le temps. Plusieurs techniques ont donc été développées pour discriminer et /ou identifier les microorganismes par l'analyse de l'ADN ou d'une partie de celui- ci.

Techniques d'étude des moisissures

Prélèvement non destructif par empreinte au scotch : C'est une technique spécifique de l'observation des moisissures. Elle permet de réaliser un prélèvement non destructif à l'aide d'un ruban adhésif utile à l'identification des champignons microscopiques :

- Préparer au préalable une lame (dégraissée) en déposant en son centre une goutte de colorant (bleu de lactophénol).
- Couper un morceau de ruban adhésif de 2 cm de long en évitant absolument de laisser ses empreintes sur la face adhésive.
- Utiliser deux pinces pour manipuler le ruban adhésif.
- Appliquer la face adhésive sur la moisissure après avoir très délicatement soulevé le couvercle de la boite de Pétri.
- Poser le morceau de ruban adhésif sur la goutte, face collant sur la lame.
- Déposer une goutte de bleu de lactophénol sur le ruban adhésif et recouvrir d'une lamelle d'une taille suffisamment grande pour recouvrir le ruban adhésif.
- Observer successivement aux objectifs x10 puis x40.

Les moisissures produisent des quantités très importantes de spores, qui peuvent contaminer rapidement toute une salle. Il est essentiel de limiter au maximum l'ouverture des boites de culture, et si la salle en dispose, de travailler sous un PSM (Poste de Sécurité Microbiologique).

Techniques d'étude des microalgues

Les isolements des algues et des cyanobactéries sont effectués à partir de fragments de prélèvement placés sur du milieu de culture "solide". Quand les micro-organismes commencent à se développer, ils sont isolés par la "méthode de la plaque striée" pour obtenir des cultures uni-algales, ou par prélèvement d'une portion de gélose et ensemencement d'une nouvelle boîte, dans le cas de cyanobactéries. L'ensemencement d'une souche en milieu liquide est réalisé par prélèvement d'un échantillon de micro-organismes.

La concentration des souches étudiées dans le banc d'essai par ruissellement d'eau est évaluée par mesure de la masse sèche et par turbidité, des corrélations étant ensuite effectuées entre ces deux méthodes. En routine, l'évaluation de la turbidité d'une culture permet ainsi aisément d'obtenir son équivalence en poids sec. Un volume connu de culture d'algues ou de cyanobactéries est filtré sur des membranes en microfibre de verre de porosité 1,2 µm (Whatman GF/C). Ces filtres sont ensuite séchés à 105 °C pendant 3 h, et la masse correspondant aux micro-organismes secs est ensuite déterminée et rapportée au volume filtré. La masse sèche est exprimée en mg mL⁻¹. La turbidité d'une culture est évaluée en mesurant sa densité optique à $\lambda = 750$ nm, au moyen d'un spectrophotomètre.

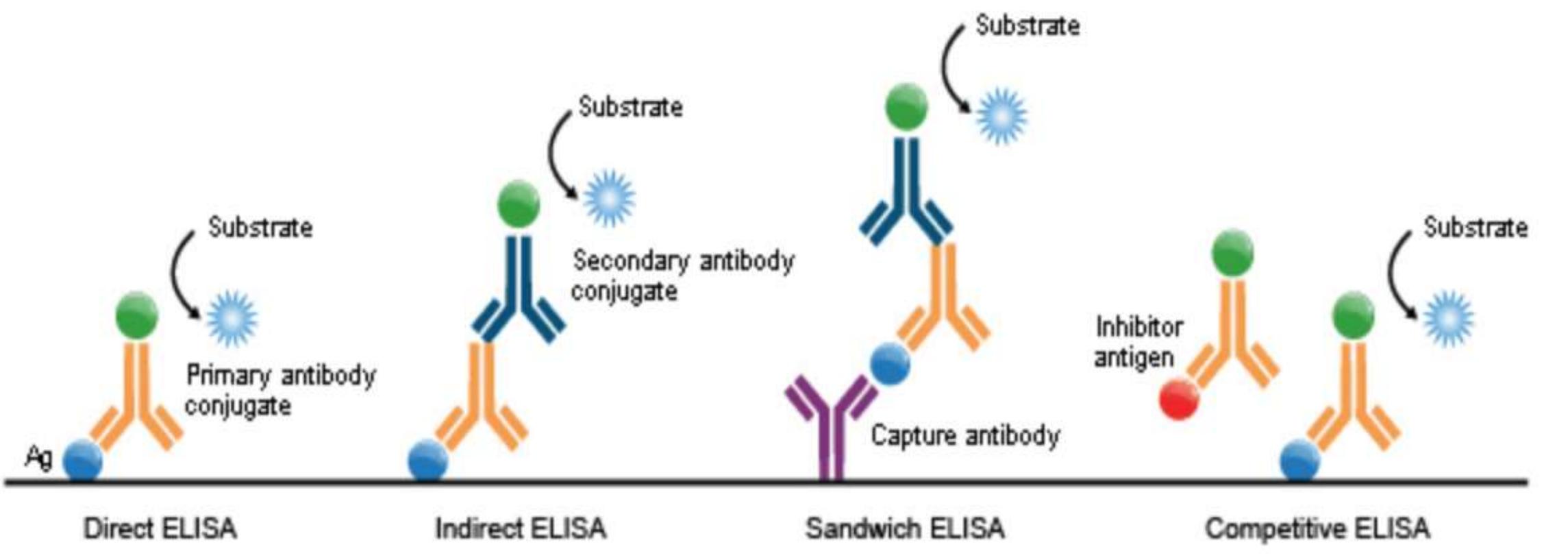
Identification des différentes espèces en utilisant la clé de détermination (Bourrelly, 1966).

Autres

Techniques d'étude des virus

Techniques indirectes

Méthodes: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. On distingue 4 méthodes différentes. La méthode directe consiste à appliquer un antigène connu, à l'ajout d'anticorps couplé à une enzyme, et l'application du substrat. Avec la méthode indirecte, ce sont des anticorps secondaires qui sont couplés à l'enzyme, qui se lient à l'anticorps primaire (antiglobuline). L'ELISA en sandwich permet de détecter un échantillon d'antigène dans un sérum. La méthode consiste à appliquer un anticorps connu , à l'ajout d'antigène, et l'ajout de la construction de la méthode indirecte (anticorps primaire - anticorps secondaire couplé à l'enzyme). La dernière méthode se fait par compétition de liaison, par fixation d'un antigène, l'ajout un mélange d'anticorps marqués et d'anticorps à doser (non marqués), les anticorps non liés aux antigènes sont éliminés. Le substrat est converti par l'enzyme de manière à émettre un signal chromogénique ou fluorescent, la quantification du résultat se fait par spectrophotométrie.



Autres réactions sérologiques, plus « traditionnelles », comme la réaction de fixation du complément.

Tests de confirmation HIV (western blot) et HVC (immunoblot) : les différentes protéines du virus sont présentes, séparément, sur la membrane qui sert de support de réaction. Ces tests permettent de préciser contre quelles protéines virales sont dirigés les anticorps.

Diagnostic par culture virale

1. Ensemencement d'une lignée cellulaire avec le prélèvement pathologique.
2. Examen direct quotidien: recherche quotidienne d'un effet cytopathique (ECP) au microscope optique inversé.
3. Si ECP : coloration des cellules, prélevées et étalées sur lame, à la recherche d'inclusions virales et d'altérations cytoplasmiques ou nucléaires, au microscope optique.
4. Immunomarquage spécifique du virus sur lame, avec lecture au microscope optique ou à fluorescence.

Diagnostic direct moléculaire

Pour simplifier, trois méthodes principales dominent la routine : l'hybridation moléculaire et ses variantes (hybridation avec amplification du signal ou bDNA, hybridation à la recherche de mutations du génome viral), l'amplification génique ou PCR, et le séquençage nucléotidique.

Techniques d'étude des protozoaires

Recherche des protozoaires dans les selles

Déposer une petite goutte de saline 0,85 % sur une lame.

Ajouter une petite portion du spécimen (1-2 mg) et bien mélanger pour obtenir une suspension uniforme.

Retirer les débris nuisibles avec un bâton applicateur, s'il y a lieu.

Déposer une lamelle 22 x 22 mm sur la préparation et examiner le plus tôt possible.

Examen microscopique :

A 10X : Examen systématique de la préparation pour dépister surtout les helminthes.

A40X : Identification plus précise des organismes retrouvés à l'objectif 10X.

Dépistage et identification des protozoaires :

Techniques de concentration(séparation, sédimentation, flottation).

Colorations permanentes : Coloration de Kinyoun (acido-alcoolo-résistance) , Trichrome de Wheatley ; Hématoxyline ferrique modifiée.

Coloration de Kinyoun : détecter et différencier les oocystes de *Cryptosporidium* des levures présentes dans les selles. Identifier les oocystes de *Cystoisospora belli* ou *Cyclospora cayetanensis*. Trichome de Wheatley et hématoxyline ferrique modifiée pour déterminer les protozoaires intestinaux : Préparer le frottis à partir du culot de lavage de la technique de sédimentation (avant addition de formol 10 %). Déposer une goutte d'albumine de Mayer sur la lame avant d'ajouter la goutte de selles (albumine-glycérine 1:1). Étaler le spécimen de façon à retrouver alternativement des zones minces et plus épaisses.

Examen microscopique : Utilisation d'un micromètre oculaire pour mesurer les éléments parasites ou autres structures observés au microscope.