

TD de Microbiologie

4^{ème} année Pharmacie

Année Universitaire 2019-2020

Par : Dr Moumen Messaoud A.

Pr Sonia Benammar

I. Introduction :

- Tuberculose : maladie très contagieuse
- Transmission interhumaine directe aérienne
- Ubiquitaire à l'échelle mondiale, l'Algérie pays endémique
- Portage asymptomatique (pas de maladie) : **1/3 du monde sont porteurs.**
- Tuberculose pulmonaire : signes cliniques et radiologiques évocateurs, la plupart des tuberculoses humaines, plus dangereuse.
- Tuberculose Extra-pulmonaire : ganglionnaire, rénale, génitale, osseuse, péricardique, péritonéale, et méningite tuberculeuse.
- Vaccin BCG : dès la naissance dans de nombreux pays.

II. Caractères généraux des Mycobactéries :

Les Mycobactéries sont classées en 03 groupes :

- ✓ **Mycobactéries responsables de la tuberculose humaine et animale** (Parasites stricts)
- ✓ Mycobactéries opportunistes, présents dans l'environnement, responsables de mycobactéries non transmissibles = **Mycobactéries atypiques**
- ✓ **Mycobacterium leprae** : responsable de la lèpre.

Mycobactéries du complexe Tuberculosis

1. Ce sont des bacilles dont la paroi est épaisse et riche en lipides, ce qui lui confère des propriétés tinctoriales particulières et une résistance relative à de nombreux antiseptiques (soude, acide, détergents).

2. Ils se colorent difficilement par les méthodes habituelles (Gram, bleu de méthylène), mais se colorent à chaud par la **fuschine phéniquée**, et **ne se décolorent pas sous l'action combinée d'un acide dilué et d'un alcool** =

Bacilles acido-alcool résistants (BAAR)

3. Ils sont **aérobies stricts et le temps de dédoublement est long** => croissance sur milieux solides particulièrement riches en 3-4 semaines (milieu de Lowenstein-jensen) =>

Tableau 1. Différentes espèces du Complexe *M. tuberculosis* et BCG

<i>M. tuberculosis</i> = bacille de Koch (BK)	<i>M. bovis</i>	<i>M. africanum</i>	BCG (bacille de Calmette et Guérin)
C'est l'espèce principale responsable de tuberculose humaine	-Responsable de tuberculose bovine, -Pathogène pour l'homme aussi	Essentiellement en Afrique de l'ouest et centrale	Mutant non virulent de <i>M. bovis</i> . Peut être isolé d'adénites ou d'abcès consécutifs à la vaccination.
- Aérobic strict, -Milieu LJ en 21-28 jours : Colonies grosses en "choux-fleurs", rugueuses. - Catalase thermolabile, - Niacine (+) - Sensible à l'isoniazide, - Résistant au TCH	Micro aérophile. Colonies petites, apigmentées, lisses et brillantes au bout de 28 Jours et plus. Catalase thermolabile Niacine test (-) Nitrate réductase (-) Sensible au TCH	Espèce intermédiaire entre les deux : Colonies dysgoniques, Plates avec un bourgeon central, rugueuses et de teinte mate.	Ses colonies ressemblent beaucoup à celles de <i>M. tuberculosis</i>, Mais comme celles de bovis sont : Niacine test (-) Nitrate réductase (-) Sensibles au TCH

Remarque :

Consultez votre cours « Mycobactéries »

III. Diagnostic de la tuberculose :

Le diagnostic de la tuberculose pulmonaire est habituellement suspecté sur un faisceau d'arguments cliniques : AEG (Altération de l'état général), fièvre vespérale, sueurs nocturnes+++, toux prolongée ou non.

La radiographie du thorax et l'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine peuvent renforcer l'impression clinique, mais **le diagnostic de certitude est essentiellement bactériologique** : Isolement + identification de la mycobactérie responsable.

IV. Diagnostic bactériologique de la tuberculose pulmonaire :

La manipulation des prélèvements : frottis, décontamination, mise en culture doit se faire au laboratoire niveau de sécurité P3, sous la hotte à flux laminaire classe 2, avec les outils de protection.



Fig1. Conditions de travail

✚ Méthode classique :

-Le diagnostic de certitude de la tuberculose pulmonaire, se pose sur la microscopie et la mise en culture des prélèvements cliniques.

-Reste le critère essentiel du diagnostic de certitude de la tuberculose

✚ Nouvelles techniques de diagnostic :

Biologie moléculaire : par la mise en évidence de génome bactérien dans les prélèvements pathologiques.

1. Prélèvements :

* Le diagnostic est **tributaire de la qualité du prélèvement recueilli et de son transport rapide au laboratoire.**

* Faits avant tout traitement anti bacillaire.

* **3 à 6** prélèvements par patients sont exigés

1.1. Crachats :

✓ Constituent les prélèvements les plus fréquents au laboratoire.

✓ Le prélèvement se fait le matin au réveil, à jeun, après rinçage de la bouche à l'eau, et un effort de toux profond, vigoureux afin de ramener les mucosités bronchiques.

✓ Mettre dans un flacon propre, à usage unique, en plastique, hermétiquement fermé.

✓ La présence de bacilles étant irrégulière dans les sécrétions bronchiques, les prélèvements sont répétés, plusieurs jours de suite (en moyenne 03).

1.2. Tubage gastrique :

- Pour ceux qui ne savent pas cracher (enfants en particulier)
- Se fait à l'hôpital, à jeun le matin au réveil, recueil des mucosités bronchiques dégluties pendant le sommeil, grâce à une sonde gastrique.

1.3. Aspiration Bronchique, lavage broncho-alvéolaire :

Sous bronchoscopie, en milieu hospitalier.

2) Transport –fiche de renseignements :

✚ Tout prélèvement doit être accompagné d'une **fiche de renseignements** comportant :

- ✓ Identité du malade,
- ✓ Diagnostic clinique,
- ✓ Traitement éventuellement reçu avant le prélèvement,
- ✓ Nom du médecin traitant et service.

✚ **Transport direct** au laboratoire.

✚ S'il se fait en différé, **conserver le prélèvement à +4°C au maximum 48 heures**, pour conserver la viabilité du bacille de Koch (BK) et limiter la multiplication d'éventuels micro-organismes contaminants.

3) Examens microscopiques :

❖ Etape initiale et essentielle du diagnostic de tuberculose puisqu'elle permet de détecter en moins d'une heure, les malades les plus bacillifères, donc les plus contagieux.

❖ N'est pas très sensible : il faut au moins 10^4 bacilles/ml de produit pathologique pour qu'il soit positif = > L'examen de plusieurs échantillons en améliore la sensibilité.

❖ Deux techniques de colorations :

- Coloration du Ziehl-Neelsen
- Coloration à l'auramine

✚ **Confection du frottis** : prendre une **parcelle mucopurulente** du produit pathologique, l'étaler sur une lame, sécher à l'air, fixer à la chaleur, procéder aux colorations.

✚ **Coloration du Ziehl-Neelsen : à chaud**

-Méthode de référence, très spécifique.

-Temps de lecture long (~ 20mn/lame) car champs microscopiques d'observation petit.

Etape de la Coloration :

1- Fuschine phéniquée : chauffer jusqu'à émission de vapeurs → laisser agir 3 minutes, refaire l'opération 02 fois (au total 10 minutes). Rejeter la fuschine, laver la lame à l'eau de robinet.

2-Temps de décoloration :

Acide sulfurique H₂SO₄ (25%) pendant 03 minutes → laver.

Puis **Alcool 95°** pendant 5 minutes → laver

3-Temps de contre- coloration : Bleu de méthylène pendant 30 secondes → laver et sécher.

Lecture :

- Au microscope optique, objectif x 100, à l'immersion

- Le bacille de Koch apparaît comme **un bâtonnet rouge, légèrement incurvé, isolé ou en petits amas, sur un fond bleu = BAAR.**
- On lit le frottis d'un bout à l'autre de la lame, jusqu'à lire toute la surface du frottis, et on compte le nombre de BAAR trouvés par champs :
 - ✓ **Lame négative (0) : 0 bacille sur 300 champs.** Inscrire : 0 BAAR / 300 champs
 - ✓ **Lame douteuse (+/-) : 1 à 9 bacilles sur 300 champs.**
Exemple : 4 BAAR/300 champs => Refaire l'examen
 - ✓ **Lame faiblement positive (1+), ou (+) : 10 à 99 bacilles sur 100 champs**
Exemple : 35 BAAR/100 champs
 - ✓ **Lame moyennement positive (2+), ou (++) : 1 à 10 bacilles par champ (faire une moyenne sur 10 champs)**
Exemple : 6 BAAR/1 champ
 - ✓ **Lame fortement positive (3+), ou (+++) : >10 bacilles par champ (faire une moyenne sur 10 champs)**
Exemple : 150 BAAR/1 champ

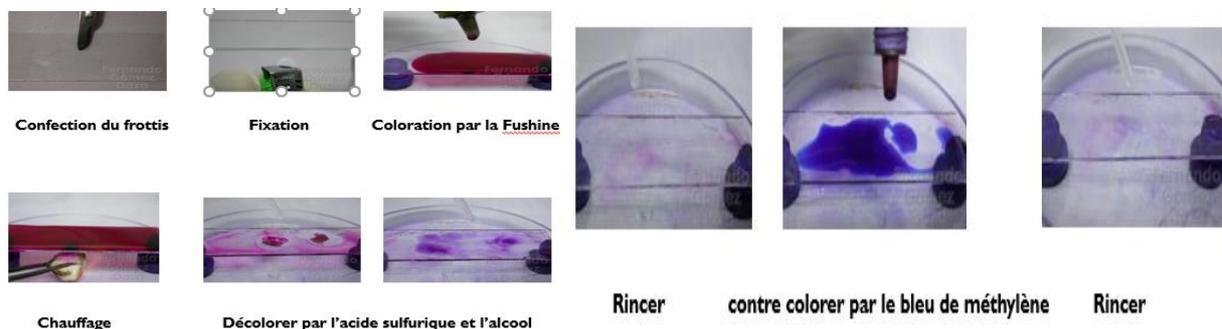


Fig2. Etapes de la coloration du Ziehl Neelsen

✚ Coloration à l'auramine :

- Nécessite un microscope à fluorescence (coût plus élevé) et l'expérience du lecteur
- Faux positifs possibles, tout examen (+) doit être confirmé par le Ziehl-Neelsen.
- Lecture rapide (5' par lame) → adapté au laboratoire recevant beaucoup de prélèvements.

Etape de coloration :

- 1- Temps de coloration : **Auramine** pendant 10 minutes.
- 2- Temps de décoloration : mélange **acide-alcool** : 04 minutes
- 3- Contre-coloration : **permanganate de potassium 1%** : 1 minute.

Lecture :

Au microscope à fluorescence au grossissement 25' (grand champ microscopique) : **Les bacilles apparaissent comme des petits bâtonnets brillants (fluorescents) jaunes sur fond noir.**

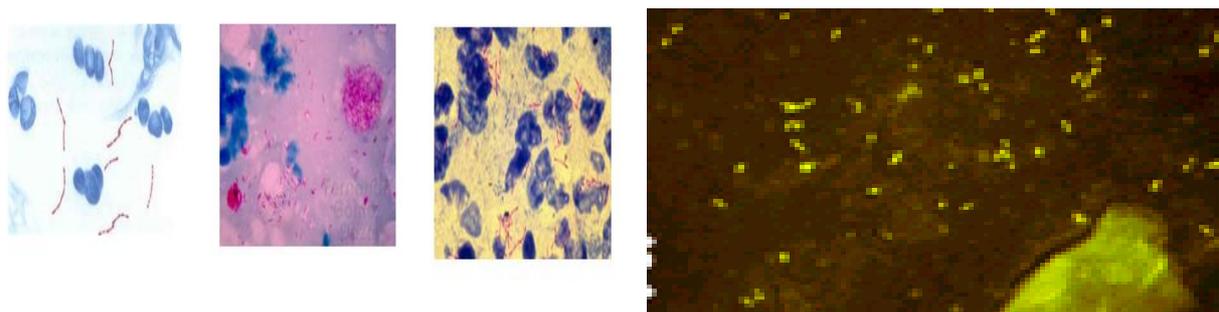


Fig3. Aspects après coloration du Z-N et de l'auramine

4. Mise en Culture :

- ✓ Méthode de **référence**.
- ✓ C'est le moyen le plus sûr pour le diagnostic, beaucoup plus sensible que l'examen microscopique.
- ✓ Permet l'identification de la mycobactérie isolée, ainsi que la mesure de sa sensibilité aux antituberculeux.

4.1. Fluidification-Décontamination :

➤ Les mycobactéries sont exigeantes, nécessitent un milieu de culture enrichi, et poussent lentement => les prélèvements contaminés doivent donc être décontaminés (éliminer les bactéries commensales) avant d'être ensemencés.

➤ On fait une fluidification = liquéfaction des produits visqueux avec du N acétyl cystéine, puis une décontamination avec de la sonde ou des acides dilués (H₂SO₄), selon des **protocoles rigoureux**.

4.2. Mise en culture :

- Le milieu de culture le plus couramment employé car, riche, très sensible et peu couteux est le milieu solide à l'œuf de Lowenstein-jensen
- Les prélèvements sont ensemencés à raison de 02 gouttes par tube de Lowenstein-jensen et pour chaque prélèvement on réalise 02 tubes.
- Incubation des milieux à 25-37°C.
- Autres milieux : Middle brook solide et liquide.



Fig4. Milieu de Lowenstein-jensen

4.3. Lecture :

Lectures : **48H, 1^{er} semaine, 28^{ème} Jours, 42^{ème} J et 72^{ème} J.**

- Après 48H : pour éliminer les prélèvements contaminés,
- Après une semaine : éliminer les mycobactéries à croissance rapide (les mycobactéries atypique)
- Puis envisager une lecture chaque semaine,
- Lectures obligatoires : 28, 42 et 72 Jours
- Les garder jusqu'à **72^{ème} J** pour les déclarer définitivement nég

-Les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent en 21-28J, *M. bovis* et *africanus* après plus d'un mois => colonies typiques.

-Ces colonies typiques sont vérifiées par une coloration microscopique (apparaissent comme des BAAR) => **la culture est déclarée positive, les résultats sont exprimés quantitativement en nombre de colonies par tube.**

4. Identification :

Repose sur :

- ✚ Les caractères **culturels** : temps de croissance, morphologie.
- ✚ Des épreuves **biochimiques simples** permettent de différencier *Mycobacterium du complexe tuberculosis* et les mycobactéries non tuberculeuses :

Mycobacterium du complexe tuberculosis est sensible au PAS, possède une catalase thermolabile : (+) à 22°C, (-) à 68°C.

✚ Identification moléculaire :

✓ Epreuve d'hybridation avec une sonde spécifique du complexe *tuberculosis*, Fluorescente => si positive = mesure de la fluorescence par chimio-luminomètre
 Délai = quelques heures, spécificité = 100%.

✓ PCR

Tab2. Diagnostic d'espèce du complexe *M. tuberculosis* et diagnostic différentiel avec les Mycobactéries non tuberculeuses

Mycobactéries	Colonies	Croissance Favorisée par Le pyruvate	TCH	PAS	NR	Catalase	Niacine Test
<i>M. tuberculosis</i>	Grosses, Rugueuses (Eugoniques)	(-)	R	S	(+)	(-) 68°C	(+)
<i>M. africanum</i>	Petites, Rugueuses (Dysgoniques)	(+)	V	S	V	(-) 68°C	V
<i>M. bovis</i>	Petites, Lisses (Dysgoniques)	(+)	S	S	(-)	(-) 68°C	(-)
<i>M. bovis</i> Var BCG	Petites Rugueuses	(-)	S	S	(-)	(-) 68°C	(-)
M. atypiques	Variables	(-)	R	R	V	(+) 68°C	(-)

5. Antibiogramme :

- Il est indispensable en cas de :
 - Rechute, pour re-traiter le malade.
 - Résistance au traitement = culture positive après 4 mois de traitement.
- En milieu solide = Méthode de référence.
- Utilisé la **méthode des proportions**, après ensemencement des tubes de L-J avec et sans ATB.
- Résultats obtenus après 4-6 semaines d'incubation (total = 2-3 mois après le prélèvement).

- **Antibiogramme direct** : un antibiogramme peut être lancé directement à partir du prélèvement lorsque l'examen microscopique révèle une quantité suffisante de bacilles (au moins 1/champ).

6. Autres méthodes de diagnostic bactériologique :

Plus rapides :

6.1. Respirométrie radiométrique : BACTEC⁴⁶⁰.

✓ **Détection rapide de la croissance des mycobactéries en milieu de culture liquide : Middlebrook 7H12 et 7H13 en 8-14 Jours.**

✓ Consiste en la mesure du CO₂ marqué par le carbone 14^{14C} libéré par les mycobactéries au cours de leur croissance dans un bouillon sélectif (Middlebrook 7H12 ou 7H13 + ATBS), contenant comme seule source de carbone de l'acide palmitique marqué par du ¹⁴C.

✓ Même sensibilité que la méthode utilisant les milieux de culture solide, mais plus rapide.

✓ Emploi limité : coût élevé, radioactivité, impossible d'observer la morphologie des colonies, de détecter les cultures mixtes, fréquence des contaminations.

6.2. Automate BD BACTEC™ MGIT

✓ MGIT = *Mycobacteria* Growth Indicator Tube

✓ L'instrument BD BACTEC™ MGIT™ utilise une **technologie basée sur la fluorescence**. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité d'oxygène consommée par les micro-organismes.

✓ Système spécifiquement dédié aux mycobactéries et totalement automatisé

✓ Détection en milieu liquide et antibiogramme sur le même automate

✓ Résultats fiables et rapides grâce une détection précoce de la croissance

✓ Simplicité d'utilisation

✓ Sécurité grâce à l'utilisation des tubes en plastique à bouchon visse



T

Fig5. Automate Bactec MGIT

6.3. Méthodes de biologie moléculaire :

✓ PCR : Amplification de séquences nucléotidiques spécifiques de *M. tuberculosis* (séquences cibles) et détection

✓ **Permet de déceler en moins de 24 heures la présence d'une mycobactérie appartenant au complexe tuberculosis, à partir du prélèvement pathologique.**

✓ Rapide, mais moins performante que la culture.

✓ **Exp** : le test Xpert MTB/RIF (permet la détection de la bactérie et une éventuelle résistance à la rifampicine par mutation)