

Les infections bactériennes dues aux Staphylocoques, Streptocoques, Entérobactéries et Mycoplasmes urogénitaux, si diverses dans leurs manifestations cliniques, sont parmi les plus fréquentes.

En effet, la plupart des Streptocoques sont des commensaux habituels des cavités naturelles et des téguments, et peuvent dans certaines circonstances particulières, devenir pathogènes pour l'homme.

Les Staphylocoques sont responsables chez l'homme, d'infections qui peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané ; elles peuvent aussi diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique avec un polymorphisme symptomatique extrême.

Les Entérobactéries peuvent être pathogènes spécifiques ou opportunistes du tube digestif de l'homme.

Quant aux Mycoplasmes urogénitaux, *Ureaplasma urealyticum* est impliquée dans 15 % des urétrites non gonococques, dans la stérilité masculine par altération de la mobilité des spermatozoïdes et est mise en cause dans les avortements spontanés à répétition dans 28 % des cas tandis que *Mycoplasma hominis* est responsable de vaginites non spécifiques, d'abcès pelviens, de salpingites et d'endométrie.

La fréquence, la gravité et/ou la mortalité de toutes ces infections bactériennes, traduisent des difficultés de prise en charge de ces infections liées entre autres aux difficultés d'identification microbiologique formelle de ces germes.

Face à cette préoccupation, à l'instar des pays développés, la mise au point de microméthodes d'identification des bactéries (Staphylocoques, Streptocoques, Entérobactéries, Mycoplasmes urogénitaux) simples, fiables, peu onéreuses et permettant une bonne prise en charge du diagnostic bactériologique, a été effectué au Laboratoire de Bactériologie-Virologie du Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec de Dakar.

La mise en route de tels types de méthodes exige un contrôle de qualité et une validation de ces techniques d'identification. Cette exigence est pratique courante dans le domaine industriel où toute nouvelle méthode décrite dans un dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) doit être accompagnée d'un contrôle de qualité et d'une validation complète.

Notre étude s'inscrit dans ce cadre et avait pour objectifs d'obtenir des tests fiable et de coût abordable en mettant en œuvre un ensemble de procédures pour :

- vérifier les différentes phases du test : contrôle de qualité de la microméthode d'identification ;
- assurer que les résultats ont été obtenus dans des conditions techniques satisfaisantes : validation.

# I – LES STAPHYLOCOQUES

## I.1. - DEFINITION

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif, non mobiles, asporules et habituellement non capsulés.

La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives et à catalase positive, à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus subsp. anaerobius*. Ce sont des germes dépourvus d'oxydase en dehors de *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. caseolyticus*.

## I.2. - TAXONOMIE

### I.1.1. – Historique (48)

Les Staphylocoques ont été identifiés par d'éminents microbiologistes à l'instar de KOCH, PASTEUR, OGSTON et ROSENBACH.

En 1878, KOCH souligne le rôle pathogène des bactéries se présentant sous forme de cocci Gram positif. Ces cocci seront ensuite isolés puis identifiés d'un pas par Louis Pasteur en 1880.

Ils seront baptisés en 1883 par OGSTON sous le nom de Staphylocoques, du latin « *Staphylla* » ou grappe et *coccus* ou « grain ».

En 1884, ils sont classés en fonction de la pigmentation des colonies par ROSENBACH en *S. aureus* du latin « orange » et *S. albus*, du latin « blanche ».

### I.1.2. - Habitat

Les Staphylocoques sont des bactéries très répandues dans la nature, aussi bien dans l'air que dans le sol ou dans l'eau. Ce sont des commensaux extrêmement fréquents de la peau et des cavités naturelles de l'Homme et des animaux (avec une prédominance pour les fosses nasales et le périnée) : la plupart des espèces rencontrées sont opportunistes, d'autres peuvent être occasionnellement pathogènes (*S. aureus*).

### **I.2.3. - Classification**

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Micrococaceae* qui comprend trois autres genres :

- *Micrococcus*
- *Planococcus*
- *Stomatococcus*.

Le genre *Staphylococcus* est composé de 39 espèces et sous-espèces qui se distinguent par leurs caractères phénotypiques dont l'espèce type est *S. aureus*.

Les espèces du genre *Staphylococcus* sont classées en deux groupes selon qu'elles produisent ou non une coagulase libre active sur le plasma oxalate de lapin.

#### **■ *Les staphylocoques à coagulase positive***

*Staphylococcus aureus* est le premier agent pathogène, lequel peut être responsable d'infection sévère, et il est important de le différencier des autres staphylocoques opportunistes coagulase négative.

Les autres espèces de staphylocoques coagulase positive sont :

- *Staphylococcus hyicus*
- *Staphylococcus schleiferi* sous-espèce *coagulans*
- *Staphylococcus intermedius*.

Ces souches sont occasionnellement rencontrées dans les infections humaines.

#### **■ *Les staphylocoques à coagulase négative***

Les SCN sont des agents opportunistes pathogènes. On distingue plus de 30 espèces parmi lesquelles on peut citer *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* qui sont moins fréquents dans les infections.

Les espèces les plus impliquées dans les infections sont :

- *Staphylococcus capitis*
- *Staphylococcus cohnii*
- *Staphylococcus haemolyticus*
- *Staphylococcus hominis*
- *Staphylococcus lugdenensis*
- *Staphylococcus schleiferi ssp scheiferi*
- *Staphylococcus warneri*
- *Staphylococcus simulans*

Les Staphylocoques coagulase négative (SNC) peuvent être divisés en six grands groupes. Cependant, les espèces rencontrées en pathologie humaine sont localisées dans deux groupes : le groupe de *Staphylococcus epidermidis* et le groupe de *Staphylococcus saprophyticus*.

**Tableau I : Classification des Staphylocoques responsables d'infections humaines (4, 33, 47)**

	<b>Espèces</b>	<b>Sous-espèces</b>	
STAPHYLOCOQUES COAGULASE POSITIVE	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>aureus</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>anaerobius</i>	
STAPHYLOCOQUES COAGULASE NEGATIVE	<i>Staphylococcus epidermitis</i>		} Groupe S. <i>epidermidis</i>
	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>capitis</i>	
	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>ureolyticus</i>	
	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>hominis</i>	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>novobiosepticus</i>	
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		
	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>		
	<i>Staphylococcus warneri</i>		
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		} Groupe S. <i>saprophyticus</i>
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>cohnii</i>	
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>ureolyticus</i>		
STAPHYLOCOQUES COAGULASE POSITIVE	<i>Staphylococcus caprae</i>		
	<i>Staphylococcus hyicus</i>		
	<i>Staphylococcus intermedius</i>		
	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	<i>coagulans</i>	
	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	<i>schleiferi</i>	
	<i>Staphylococcus simulans</i>		

### **I.3. – CARACTERES BACTERIOLOGIQUES (15, 33, 48, 60)**

#### **I.3.1. – Caractères morphologiques et structuraux**

A l'examen microscopique, les Staphylocoques se présentent sous l'aspect de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes de 3 à 5 éléments positivement colorés au Gram..

Le mode de groupement dit en « grappe » ou en « amas » est plus caractéristique après culture sur un milieu gélose. La disposition en amas s'explique par la division cellulaire des Staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres, et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues.

Sur le plan individuel, ce sont des cocci mesurant 0,7 à 1,2  $\mu\text{m}$ , immobiles asporulés, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule.

#### **I.3. 2. – Caractères cultureux**

Les Staphylocoques sont en général aéro-anaérobie facultatif et poussent sur milieu ordinaire en aérobiose à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus anaerobius* qui sont donc catalase négative.

Certaines souches nécessitent cependant une forte pression en  $\text{CO}_2$  pour une croissance optimale ainsi que la présence d'autres métabolites tels que l'hémine ou la ménadione.

Cependant, certains facteurs de croissance sont indispensables pour la multiplication des Staphylocoques ; ce sont la vitamine B<sub>1</sub> et l'acide nicotinique.

La température optimale de croissance est de +30 à +45°C avec un maximum à 37°C et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5.

- En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les Staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt.

- En milieu solide, on observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (bêta hémolyse) autour des colonies. Ceci est lié au fait que certains Staphylocoques, en particulier *S. aureus*, sont susceptibles de synthétiser quatre hémolysines distinctes et variables d'une souche à l'autre et dont l'activité diffère selon le type d'hématie en cause.

- La plupart des souches de Staphylocoques pousse sur un milieu synthétique contenant entre autres du glucose, des sels minéraux, 14 acides aminés dont la cystéine, la vitamine B1 et l'acide nicotinique.

A +4°C, les Staphylocoques conservent leur vitalité pendant trois mois dans le pus et pendant un an sur gélose ; ils sont détruits à 58°C au bout de 60 mn d'incubation.

### **I.3.3. – Caractères biochimiques**

L'étude des différents caractères biochimiques des souches de Staphylocoques a permis le développement de galeries d'identification rapides et efficaces, permettant de définir les différents profils biochimiques des différentes espèces de Staphylocoques.

#### ***1.3.3.1. – Production d'uréase***

Les bactéries hydrolysent toute l'urée mais, seules celles ayant une uréase constitutive, c'est-à-dire dont la synthèse est indépendante de la présence du substrat, vont arriver à alcaliniser le milieu, entraînant le virage de l'indicateur coloré.

L'uréase est également une enzyme inductible.

La recherche de l'uréase repose sur la libération d'ions ammonium qui alcalinisent le milieu, entraînant le virage de l'indicateur coloré (le rouge de phénol) du jaune au rouge cerise.



### ***1.3.3.2. – Production d'acétoïne***

Les micro-organismes produisent lors de leur métabolisme de nombreux produits de dégradation qui, comme dans le cas ci-présent, peuvent être recherchés.

L'acétoïne en langage courant, ou hydroxy-3-butanone ou encore dans le nomenclature ancienne acétyl-méthyl-carbinol (AMC) est un produit de dégradation du glucose au cours de la fermentation 2-3 butylène glycolique en passant par l'acétolactate et le diacétyl. Elle peut également être obtenues par condensation de deux molécules de pyruvate.

### ***1.3.3.3. – Production de décarboxylases***

Les décarboxylases sont des enzymes qui sont actives à pH acide ; le milieu d'étude sera donc acidifié par la fermentation du glucose puis réalcalinisé par l'action des décarboxylases sur le milieu qui est un acide aminé.

Les décarboxylases scindent les acides aminés avec formation de l'amine correspondante et libération de dioxyde de carbone.

Les enzymes recherchés le plus souvent sont :

- l'ornithine décarboxylase (ODC) ;
- l'arginine dihydrolase (ADH) ;
- la lysine décarboxylase (LDC).

### ***1.3.3.4. – Production de la bêta-galactosidase***

La bêta-galactosidase est une enzyme bactérienne inductible, existant à un niveau de base dans le milieu intracellulaire, capable de scinder la molécule de lactose en sucres simples que sont la glucose et la galactose après avoir traversé la paroi cellulaire sous l'action de la  $\beta$ -galactosidase perméase.

Le test à l'ONPG est une technique relativement simple, basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl-  $\beta$  -D-galactopyranoside, ou le 2-naphtol-  $\beta$  -D-galactopyranoside.

Ceux-ci sont utilisés comme substrats et libèrent respectivement l'orthonitrophénol jaune et le  $\beta$ -naphthol qui se combine au sel de Fast blue B en solution dans le 2-méthoxyéthanol pour donner une coloration rouge pourpre.

#### ***1.3.3.5. – Réduction des Nitrates***

La réduction des nitrates et des nitrites constitue un des caractères biochimiques importants chez les staphylocoques lors de leur identification.

Ce test permet d'étudier la réaction de réduction des nitrates en nitrites sous l'action de la nitrate réductase produite par certains Staphylocoques.

La réaction sera mise en évidence par l'addition d'acide sulfanilique et l'acide  $\alpha$ -naphtylamide qui révèlent la présence de l'ammoniaque libérée.

#### ***1.3.3.6. – Utilisation des hydrates de carbone***

Les glucides sont utilisés de trois manières différentes par les Staphylocoques : soit après conversion par l'action d'isomérases, après hydrolyse en sucres simples ou directement, s'ils sont fournis sous une forme simple (glucose, fructose...).

L'assimilation étudiée surtout par la voie fermentaire mais également par la voie oxydative se traduit presque toujours par l'accumulation de dérivés acides quelle que soit la voie de dégradation.



## **I.4. – IDENTIFICATION**

### **I.4.1. – Milieux d'isolement**

Le milieu le plus fréquemment utilisé est la gélose au sang ordinaire, incubée à 35 – 37°C + 5-10 % CO<sub>2</sub> pendant 16 – 48H.

Les Staphylocoques peuvent être isolés sur d'autres milieux tels que :

- la gélose de CHAPMANN
- la gélose STAPH/STREP sélective
- la gélose au mannitol (Salt) (MSA).

### **I.4.2. – Aspect des colonies**

Sur la gélose au sang les Staphylocoques donnent des colonies généralement opaques, pouvant être blanches ou crémeuses et dès fois jaune-orangé.

Les colonies peuvent être entourées ou non d'une hémolyse.

### **I.4.3. – Aspect microscopique**

Les Staphylocoques sont des cocci Gram positives se présentant sous l'aspect de coques en petits amis, en diplocoques ou en très courtes chaînettes de 3 à 5 éléments.

### **I.3.4. – Tests d'identification**

#### **► *Test à la catalase***

Les Staphylocoques sont catalase positive, à l'exception de *Staphylococcus aureus anaerobius* et *Staphylococcus capitis* qui sont catalase négative.

#### **► *Test à la coagulase***

*Staphylococcus aureus* et les souches de *S. hyicus*, *S. intermedius*, et *S. schleiferi* sous *sp coagulans* sont coagulase positive et thermostable nucléase.

Les autres espèces de Staphylocoques sont coagulase négative et thermostable nucléase négative.

► ***Test à l'identification modifié***

Permet de différencier le genre *Staphylococcus* et du genre *Micrococcus*.

► ***Microméthode d'identification commercialisée sous forme de Kit***

Il s'agit de tests rapides, renfermant des substrats déshydratés et basés sur l'étude des caractères biochimiques des différentes espèces de Staphylocoques.

On peut citer :

- API 20 STAPH (Biomérieux, réf.20.500) : 19 tests ; identification de 20 espèces de Staphylocoques ;
- ID 32 Staph (Biomérieux, réf.32500) : 26 tests; identification de 24 espèces de Staphylocoques;
- MICRO CSB staphylocoque : 15 tests, identification de la plupart des espèces de Staphylocoques rencontrées en clinique humaine.



## II – LES STREPTOCOQUES

### II.1. - DEFINITION

Les Streptocoques sont des cocci à Gram positif groupés par paires, chaînettes ou tétrades. Ils sont immobiles, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, dépourvus de catalase et d'oxydase. Ils ne réduisent pas les nitrates et sont résistants aux aminosides.

Les diverses espèces de Streptocoques sont regroupées dans la famille des *Streptococcaceae* qui comporte sept genres :

- *Streptococcus* (genre-type) et *Enterococcus*, fréquemment rencontrés en médecine humaine ;

- *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*, bactéries opportunistes rares en médecine humaine ;

- *Lactococcus* et *Pediococcus* non pathogènes.

Récemment (en 1995), le genre *Abiotrophia* a été décrit. Il regroupe deux espèces : *A. defectiva* et *A. adiacens*, antérieurement rangées avec les streptocoques.

### II.2. - TAXONOMIE

#### II.2.1. – Historique (48)

Le nom *Streptococcus* (*Streptus* = flexible ; *coccus* = grain) fut pour la première fois attribué par BIRLOTH et ERLICH à des coques formant des chaînettes observées dans les prélèvements provenant de blessures infectées.

PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX (1881) rendirent compte d'une infection septicémique obtenue chez les lapins inoculés avec de la salive humaine.

FAHLEISEN (1883) décrivit un coque similaire comme agent de l'érysipèle. Le nom de *Streptococcus pyogenes* fut donné par ROSENBAACH (1884) à des coques groupés en chaînettes et isolés de lésions suppuratives chez l'homme.

NOCARD et MOLLEREAU (1887) découvrirent le « *Streptococcus* » de la mammite de Nocard » qui ensuite, fut appelé *Streptococcus agalactiae*.

LANCEFIELD, en 1933, décrivit les groupes sérologiques de A à F. Les souches de référence de streptocoques du groupe B étaient d'origine bovine. Les infections néonatales dues à ce groupe ont été signalées en 1962 par REITEL, WAHL et collaborateurs ; en 1964 par EICKHOFF et collaborateurs.

SCHULTZ décrivit les Streptocoques isolés de lésions de pneumonie et de gourme chez les chevaux.

SCHLEIFER réalisa la séparation des deux genres *Streptococcus* et *Enterococcus* en 1984. Les infections à Streptocoques qui, autrefois, étaient considérées comme propres aux pays froids et humides, sont maintenant fréquentes en zone tropicale particulièrement en Afrique de l'Ouest.

Pour ce qui est du Sénégal, les premiers travaux ont été décrits avec les infections à Streptocoques hémolytiques du groupe A (19).

### **II.2.2. - Habitat**

Les Streptocoques sont retrouvés à l'état commensal sur la peau et les muqueuses. Ce sont des germes ubiquitaires.

Les Streptocoques du Groupe D sont retrouvées dans l'intestin et ceux du groupe B dans les voies génitales. Dans la bouche, on a les streptocoques non groupables appelés *salivarius*, *sanguis*, *mitis*, *mutans* qui donnent des dextrans jouant un rôle dans les caries dentaires.

### **II.2.3. – Classification (39)**

Les Streptocoques ne sont pas classés sur des critères cliniques ou de pathogénicité, car la plupart des espèces (commensales ou pathogènes) peuvent être responsables d'infections réalisant des aspects cliniques très différents.



Par conséquent, la classification des Streptocoques est basée sur des critères bactériologiques.

### ***II.2.3.1. – Critères de classification***

On distingue :

#### **■ *le pouvoir hémolytique***

- Hémolyse incomplète : Streptocoques alpha-hémolytiques,
- Hémolyse complète : Streptocoques bêta-hémolytiques,
- Pas d'hémolyse : Streptocoques non hémolytiques.

#### **■ *l'équipement antigénique : classification de LANCEFIELD***

Un antigène de la paroi, le polyside C, permet de définir plusieurs groupes : A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, R, S, T, U, V.

Certains Streptocoques dépourvus de polyside C sont dits "non groupables".

#### **■ *les caractères biochimiques***

Ils permettent d'individualiser les espèces dans le genre : *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis*, etc...

Ces classifications ne sont pas superposables ; toutefois, les caractères phénotypiques peuvent permettre en routine de classer et d'identifier la plupart des Streptocoques.

### ***II.2.3.2. – Classification en ensembles et sous-ensembles***

Actuellement, on classe les Streptocoques en "**ensembles**" et "**sous-ensembles**", ce qui n'est guère en conformité avec les règles de la taxonomie bactérienne.

Ainsi, on distingue :

### ■ *les Streptocoques pyogènes*

Cet ensemble comprend plusieurs sous-ensembles :

- *Streptococcus pyogenes*, espèce-type du genre : c'est le Streptocoque bêta-hémolytique du Groupe A ;
- *Streptococcus agalactiae* : Streptocoque bêta-hémolytique du groupe B ;
- les Streptocoques bêta-hémolytiques des Groupes C, G ou L ;
- les souches non hémolytiques d'origine animale.

### ■ *les Streptocoques du Groupe D*

On retrouve dans cet ensemble trois espèces commensales du tube digestif de l'homme :

- *Streptococcus bovis*, le plus fréquemment isolé ;
- *Streptococcus equinus* ;
- *Streptococcus alactolyticus*.

### ■ *les Streptocoques oraux*

On y distingue six sous-ensembles. Ce sont ceux dénommés autrefois Streptocoques *viridans*. Ils sont pour la plupart,  $\alpha$ -hémolytiques, non hémolytiques ou non groupables. Parmi eux, *Streptococcus pneumoniae*.

### ■ *les Streptocoques non classés.*



## II.3. – CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

### II.3.1. – Caractères morphologiques et structuraux (48, 51)

Les Streptocoques se présentent sous forme de coques ovoïdes ou sphériques à Gram positif et groupés en chaînettes. Les chaînettes résultent de la non séparation des paires de coques en division et se présentent comme une succession de diplocoques.

Par contre, la formation des chaînettes est de rigueur dans les milieux artificiels et dans les exsudats purulents des lésions ouvertes.

Les Streptocoques des Groupes A, C, G, caractérisés par de longues chaînettes, donnent sur milieux liquides une culture en dépôt.

Les autres donnent un trouble homogène du bouillon et se présentent alors sous la forme de diplocoques (*S. pneumoniae*) ou de courtes chaînes (*S. bovis*).

### II.3.2. – Caractères cultureux (4, 6, 48)

Les Streptocoques peuvent pousser sur des milieux usuels mais néanmoins, ils ont des exigences nutritives très complexes.

Tous les Streptocoques sont aéro-anaérobies. Ce sont des germes très fragiles. La température idéale de croissance est comprise entre 42°C avec un optimum à 35 – 37°C.

#### ► Culture sur milieux usuels

La plupart des Streptocoques poussent sur ces milieux et réalise sur gélose nutritive des colonies très fines, transparentes, dispersées à la surface en grain de semoule avec une couleur légèrement bleutée.

Cette culture étant difficile, il est préférable de la réaliser sur milieux enrichis.

### ► Culture sur milieux enrichis

Certaines substances sont habituellement utilisées pour enrichir les milieux. Ce sont les peptones, les extraits de viande ou infusion de cœur – cerveau, le sang, le sérum et ou l'ascite.

Les milieux peuvent se présenter soit sous forme liquide soit sous forme solide :

#### ● *Milieux liquides d'enrichissement*

Les Streptocoques supportent très mal les milieux glucosés. En effet, le glucose par voie fermentative donne de l'acide lactique avec un abaissement du pH qui rend le milieu hostile. C'est la raison pour laquelle on utilise le **bouillon glucosé tamponné** (B.G.T.).

On peut également utiliser le **bouillon streptosel**. Les Streptocoques donnent sur ce milieu soit :

- un trouble homogène avec ou sans dépôt (groupe B, D) ;
- une pousse granulaire avec sédimentation rapide, le surnageant pouvant être limpide ou légèrement trouble (A, C, G)

#### ● *Milieux solides d'isolement*

Les milieux les plus généralement utilisés sont les géloses enrichies au sang (sang de mouton ou de cheval). Ces milieux permettent de voir la capacité des Streptocoques à lyser les hématies.

L'aspect de la zone d'hémolyse et sa dimension sont fonction de l'hémolysine élaborée par la souche, du sang utilisé mais également du milieu.

On distingue trois types d'hémolyse :

- **hémolyse alpha** : les globules rouges ne sont que partiellement lysés sur un diamètre d'environ 1 à 2 mm. Cette hémolyse peut quelquefois être accompagnée

d'un verdissement du milieu, on parle d'une hémolyse  $\alpha$ -viridans. Le mécanisme de cette coloration est mal connue.

- **hémolyse bêta** : les hématies sont complètement lysés sur un diamètre d'environ 3 à 4 mm autour des colonies.

- **hémolyse gamma** ou absence d'hémolyse : il n'existe aucun trace d'hémolyse ; on utilise couramment le terme streptocoque non hémolytique.

### **II.3.3. – Caractères biochimiques**

Les Streptocoques ne possèdent ni catalase, ni peroxydase

- ***Absence de catalase***

Elle permet d'établir un diagnostic différentiel entre *Streptococcus* d'une part et *Staphylococcus*, *Micrococcus* d'autre part. L'absence de catalase constitue alors un caractère clef d'orientation vers les streptocoques.

La mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation de sucres et de la croissance en milieu hostile, à l'aide de microméthodes, permet l'identification des différentes espèces de Streptocoques.

Les caractères biochimiques des Streptocoques sont présentes dans le **tableau IV**.



## **II.4. – IDENTIFICATION**

### **II.4.1. – Critères d'identification**

Après isolement sur les milieux de culture adéquates, les Streptocoques sont identifiés suivant :

- l'aspect des colonies = examen macroscopique ;
- la coloration de Gram = examen microscopique ;
- le test de groupage de LANCEFIELD ;
- le test de sensibilité à l'optochine ;
- le test de solubilité à la bile.

Une identification future peut être possible en utilisant des tests commercialisés, basés sur les caractères biochimiques. Ces tests permettent le diagnostic différentiel des différentes espèces de streptocoques.

### **II.4.2. – Milieux d'isolement**

- Gélose au sang ordinaire incubé à 35 – 37°C + 5 % CO<sub>2</sub> pendant 24 – 48H.
- Gélose au sang cuit + gentamicine incubé à 35 – 57°C + 5 % CO<sub>2</sub> pendant 48 H pour les pneumocoques.
- Gélose STAPH/STREP incubé à 35 – 37°C pendant 16 – 48H à l'étuve.
- Gélose anaérobie facultative incubé en anaérobiose pendant 16 – 48H.



### II.4.3. – Aspects des colonies

**Tableau V**

Organisme « Group »	Hémolyse	Caractéristiques de la croissance sur gélose au sang après incubation à 35 – 37°C pendant 16 – 24H
Streptocoques bêta-hémolytique	$\beta$	Approximativement 0,5 mm, bordure entière peuvent avoir un aspect sec. Les colonies peuvent être difficiles à prélever.
Streptocoques « <i>viridans</i> »	$\alpha$ ou NH	Colonies ont un diamètre de 0,5 - 1,0 mm
<i>S. pneumoniae</i>	$\alpha$	Colonies mesurent 1 – 2 mm. Après incubation en anaérobiose, les colonies peuvent être larges et mucoïdes.
<i>S. anginosus</i>	$\alpha$ , $\beta$ ou non	Colonies sont petites 0,5 mm Hémolyse est variable.

N.H. = non hémolytique

### II.4.4. – Aspect microscopique

#### ► *Coloration de Gram*

Les Streptocoques sont des cellules à Gram positives rondes ou ovoïdes groupés par paires, en chaînettes courts ou longs et des fois en grappe.

*Streptococcus pneumoniae* présentent un aspect de diplocoques en flamme de bougie (lancéolés), en « 8 » ou en courtes chaînettes, Gram positif. Les formes virulentes sont capsules.

#### **II.4.5. – Procédures des tests**

- ***Test à la catalase***

Les Streptocoques sont catalase – négative.

- ***Test de l'hydrolyse de l'esculine par la bile***

Les Streptocoques du Groupe D de LANCEFIELD hydrolyse esculine en présence de 40 % de bile, contrairement aux autres streptocoques.

- ***Test de la sensibilité à l'optochine***

*S. pneumoniae* est spécifiquement sensible à l'optochine, ce qui n'est pas le cas des autres streptocoques qui sont résistants à l'optochine.

- ***Test de solubilité à la bile***

*S. pneumoniae* est soluble dans 10 % de sels biliaries, les autres Streptocoques alpha-hémolytiques ne le sont pas.

- ***Test de groupage de LANCEFIELD***

Il permet d'identifier les groupes A, B, C, D, F ou G.

*Streptococcus pyogenes* est positive.

- ***Microméthode d'identification commercialisé sous forme de Kit***

Basé sur l'identification des espèces par leurs caractères biochimiques.



## III – LES ENTEROBACTERIES

### III.1. - DEFINITION

Toutes les espèces d'Entérobactéries ont en commun les caractères suivants :

- bacilles Gram négatif de dimensions moyennes : 0,5  $\mu$  sur 3  $\mu$  ;
- immobiles ou mobiles grâce à leur ciliature péritriche
- se développant aisément sur milieux ordinaires
- aérobies facultatifs ;
- faisant fermenter le glucose avec ou sans gaz ;
- ne possédant pas d'oxydase ;
- réduisant les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi *Erwinia*).

### III.2. - TAXONOMIE

#### III.2.1. – Historique (26, 30, 41, 50)

La naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe en 1937 lorsque Otto RAHN proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper des micro-organismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquelles on trouvait déjà des noms tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* ou *Shigella*.

Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67.

Les travaux des équipes de DON BRENNER et de Patrick A.D. GRIMONT a permis une véritable explosion de cete famille avec un très grand nombre de nouveaux genres et espèces décrits depuis une vingtaine d'années.

En 1972, EDWARDS et EWING rapportaient 11 genres et 26 espèces dans les *Enterobacteriaceae*.

En 1985, FARMER et coll. décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

En 1971, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisées.

### **III.2.2. - Habitat**

Les Entérobactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux d'où leur nom. Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif, des entérobactéries pouvant en effet proliférer en abondance dans l'environnement (sol et eau) et participer aux grands cycles des matières organiques.

### **III.2.3. - Classification**

Parmi toutes les espèces décrites à ce jour, seule une vingtaine est habituellement rencontrée depuis longtemps et de façon régulière en clinique humaine ; la plupart des espèces nouvellement décrites demeurant d'isolement rare.

Ainsi, les espèces d'entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine sont classées dans 12 genres qui peuvent être regroupés en 5 groupes (**tableau VI**).

**Tableau VI : Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquents en clinique humaine (24, 51)**

		Genre	Espèces
<b>GROUPE I</b>	<i>EDWARDSIELLEAE</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>SALMONNELLEAE</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella enteridis</i>
<b>GROUPE II</b>	<i>ESCHERICHIEAE</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>LEVINEAE</i>	<i>Levinea</i>	
<b>GROUPE III</b>	<i>KLEBSIELLEAE</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	
<b>GROUPE IV</b>	<i>PROTEAE</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
<b>GROUPE V</b>	<i>YERSINIEAE</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

### III.3. – CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

#### III.3.1. – Caractères morphologiques et structuraux (51)

Toutes les entérobactéries ont une morphologie très voisine ; ce sont des bacilles **Gram négatif**, de 0,5  $\mu$  sur 3  $\mu$  en moyenne, généralement polymorphes : on rencontre parfois des éléments coccoïdes, mais aussi des formes pseudo-filamenteuses. .

Lorsqu'elles sont mobiles, les entérobactéries se déplacent plus ou moins vite grâce à leur **ciliature péritriche**.

Les entérobactéries peuvent être capsulées (*Klebsiella*). Elles ne sont jamais sporulées.

#### III.3.2. – Caractères cultureux

Les entérobactéries poussent sur milieux ordinaires en 24 heures à 37°C, à pH voisin de la neutralité.

1° - Sur gélose, on observe plusieurs types de colonies :

- **colonies S** (Smooth) lisses, de 1,5 à 3 mm de diamètre, régulièrement arrondies, limitées par un bord régulier, légèrement bombées, de surface lisse, translucides, ayant souvent des reflets bleutés ;

- **colonies R** (rough), rugueuses, de 1,5 à 3 mm de diamètre, limitées par un bord irrégulier finement dentelé, assez plates, de surface rugueuse, translucides et grisâtres.

Cet aspect correspond généralement à de vieilles souches.

- **colonies M** muqueuses, plus volumineuses, arrondies, limitées par un bord régulier, très bombées, de surface lisse, brillante, opaques : elles réalisent l'aspect en « coulée de miel ».

- **colonies naines** seulement visibles à la loupe.

2° - En bouillon, les formes S donnent en 24 heures un trouble homogène avec des ondes moirées lors de l'agitation du tube.

Les formes R donnent une culture grumuleuse, déposée dans le fond du tube. Le surnageant reste clair.

La culture des formes M se traduit par un trouble intense.

3° - En gélose en pente, les colonies des entérobactéries apparaissent dans toute la hauteur du tube : ces bactéries sont donc aérobies facultatives.

### III.3.3. – Caractères biochimiques (24)

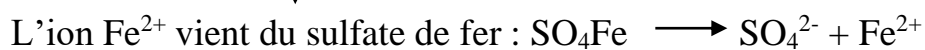
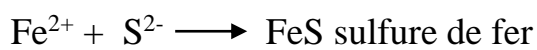
#### 1° - Production de SH<sub>2</sub> (hydrogène sulfuré)

La production de SH<sub>2</sub> par les micro-organismes est mise en évidence par incorporation de fer ou de plomb dans le milieu destiné à cette étude.

Il se forme une précipité noir de sulfure de fer ou de plomb.

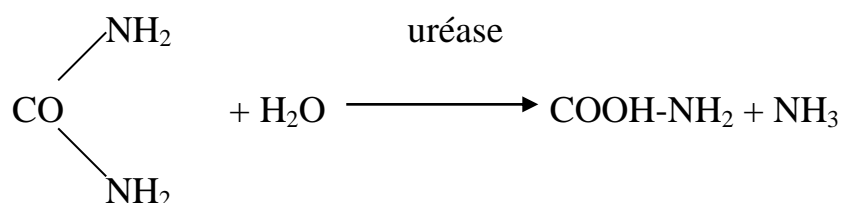


Ce soufre réduit va se combiner avec le fer ferreux Fe<sup>2+</sup> selon la réaction :



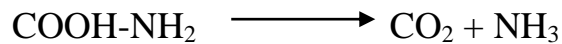
#### 2° - Recherche de l'uréase

Toutes les bactéries hydrolysent l'urée :

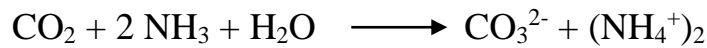




Seule une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



$\text{CO}_2 + \text{NH}_3$  se combinent donnant du carbonate d'ammonium :

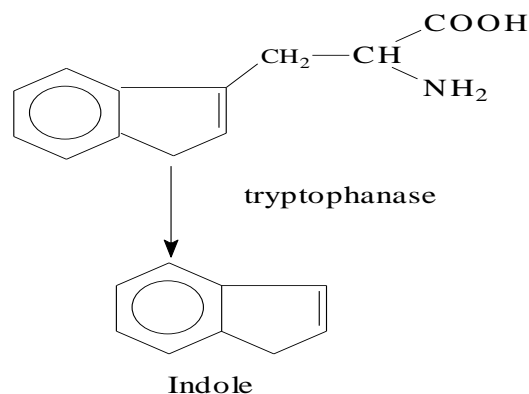


Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu que traduit le virage de l'indicateur coloré de l'orange au rose framboise ou dès fois au rouge violacé.

### 3° - Production d'indole

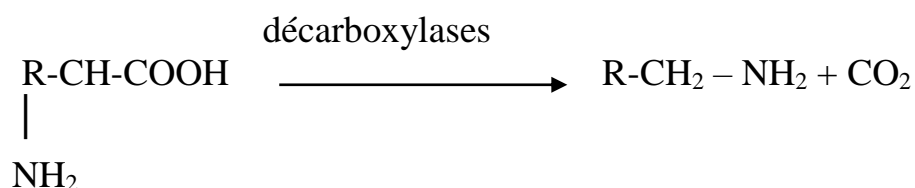
Certaines bactéries dégradent le tryptophane, grâce à une tryptophanase. Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac.

L'indole est apolaire et réagit fortement avec le paradiméthylamino-benzaldéhyde en milieu acide et donne un anneau rouge qui remonte en surface.



### 4° - Recherche des décarboxylases

Les décarboxylases (LDC, ODC, ADH) scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de  $\text{CO}_2$  suivant la réaction :



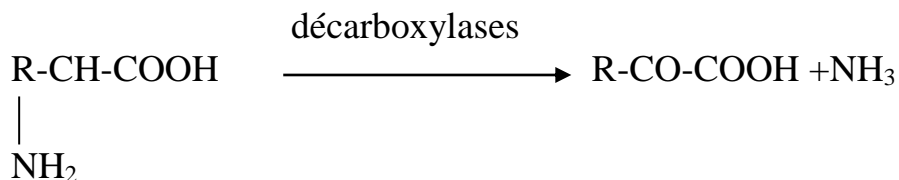
Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH optimum : 3,5 à 5,5) et des conditions anaérobioses.

Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré (le rouge phénol) et bien entendu l'acide aminé.

Chez les bactéries à métabolisme fermentatif, la fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme ; l'alcalinité due à l'amine entraîne ensuite le virage de l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement. Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide donc jaune.

### 5° - Recherche des désaminases oxydatives

Les désaminases, enzymes induites, agissent sur les acides aminés en entraînant la formation des acides cétoniques correspondants selon la réaction :



#### **Acide aminé**

Les acides cétoniques formés ont la propriété de donner des complexes colorés avec les ions  $\text{Fe}^{+++}$ , réaction utilisée pour la lecture.

### 6° - Utilisation du citrate de Simmons (CS)

L'utilisation du citrate, comme seule source de carbone, par les bactéries se traduit par une alcalinisation du milieu (virage au bleu).

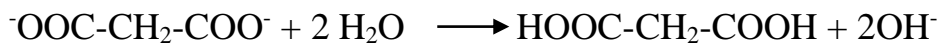
Nous avons la réaction suivante :



### 7° - Utilisation du malonate

Le malonate inhibe le cycle de Krebs (inhibition de la succinate déshydrogénase). Seules les bactéries qui peuvent utiliser le cycle glyoxylique sont capables de pousser sur un milieu au malonate.

L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions OH<sup>-</sup> alcalinisants suivant la réaction :



### **Acide malonique**

#### **8° - Milieu au citrate de Christensen (CC)**

A la différence de Simmons, ce milieu contient une faible quantité de glucose et d'extrait de levure (qui permet le départ de la culture) et une source d'azote organique. Dans ces conditions, certaines bactéries citrate-négatives sur milieu de Simmons sont capables d'utiliser le citrate en milieu de Christensen. La formation d'ions hydroxyles alcalinise le milieu (virage du jaune au rose).

#### **9° - Recherche de l'acétoïne ou réaction de Voges-Proskauer (VP)**

On étudie la formation de l'acétylméthyl carbionol (AMC, ou acétoïne) soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit à partir du glucose. En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétal).

#### **10° - Test à l'ONPG (orthonitrophényl β-D-galactopyranoside)**

Le terme ONPG hydrolase est plus à propos que celui de bêta-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose. En effet, il existe des germes qui reconnaissent que l'ONPG du côté nitro-2-phénol et non celui du bêta-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas les lactoses.

Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside ou le 2-naphtol-bêta-D-galactopyranoside. Ceux-ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le bêta-naphtol.



### III.4. – IDENTIFICATION

L'identification de la souche isolée est assurée par différents techniques à savoir :

- l'examen microscopique ;
- l'examen microscopique ;
- le test à l'oxydase ;
- l'étude des caractères biochimiques avec des microméthodes d'identification commercialisées sous forme de Kit, qui permet de faire le diagnostic différentiel d'espèces des entérobactéries.

#### ● *Milieus d'isolement*

Les entérobactéries poussant sur :

- gélose trypticase soja incubé à 37°C pendant 24 heures ;
- gélose EMB : éosine bleu de méthylène , incubé à 37°C pendant 24H.

#### ● *Aspect des colonies*

Les colonies des Entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « S »). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse type « R ».

Les colonies des Entérobactéries capsulées telles que les *Klebsiella* sont mucoïdes, de grande taille.

#### ● *Examen microscopique*

Les Entérobactéries sont des bacilles Gram négatif asporulés. Certains genres sont composés de bactéries toujours immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*), d'autres sont mobiles.

La présence de capsules est fréquent chez les *Klebsiella*.

- *Test à l'oxydase*

Les Entérobactéries sont oxydase négative.

- *Etude des caractères biochimiques*

Effectué avec des microméthodes d'identification commercialisés sous forme de Kit. On peut citer entre autres :

- le test API<sup>R</sup> 20 ENTERO ;
- le test Micro CSB System ENTERO.

## IV – LES MYCOPLASMES

### IV.1. - DEFINITION

Micro-organismes ubiquitaires retrouvés chez l'Homme, l'animal, les plantes et les insectes, les Mycoplasmes sont des bactéries aux propriétés originales. Ce sont les plus petits procaryotes capables de se multiplier de façon autonome.

### IV.2. - TAXONOMIE

#### IV.2.1. – Historique

Les Mycoplasmes sont connus depuis les travaux de ROUX et NOCARD en 1898. Ce n'est qu'en 1937 que DIENES et ESDALL isolent le premier spécimen humain dans un pus de bartholinite.

D'abord nommés « Pleuro-Pneumoniae Organisms » (PPO) et rattachés aux shizomycètes, ces microorganismes, les plus petits vivants à l'état libre ont été individualisés en 1967 dans la classe des bactéries sans paroi.

En 1954, SHEPARD isole à partir des voies génito-urinaires humaines des mycoplasmes formant des colonies de petite taille ; les souches « T » (tinny = minuscule) appelées aujourd'hui *Ureaplasma*.

#### IV.2.2. – Habitat

Les Mycoplasmes sont largement répandus dans la nature. Chez l'Homme, ils colonisent les muqueuses respiratoires et génitales. Certains seraient peut-être présents au niveau du tractus intestinal.

#### IV.2.3. – Classification

Le terme mycoplasme est utilisé pour l'ensemble de la classe des mollicutes. Cette classe comporte quatre ordres : (**tableau VIII**)

- les Mycoplasmatales ;
- les Entomoplasmatales ;

- les Acholeplasmatales ;
- les Anaéroplasmatales.

- L'ordre des Mycoplasmatales comprend une seule famille : les *Mycoplasmataceae*. Cette famille est caractérisée par son exigence en stérols. Elle est constituée de deux genres :

- le genre *Mycoplasma* est constitué de 100 espèces dont 13 espèces humaines (**tableau IX**).

- le genre *Ureaplasma* est constitué de six espèces dont une seule est pathogène pour l'homme. *Ureaplasma urealyticum*. Sa localisation principale est urogénitale.

- L'ordre des Entomoplasmatales comprend deux familles : les *Entomoplasmataceae* et les *Spiroplasmataceae*. La famille est *Entomoplasmataceae* qui colonise les plantes et les insectes est constituée de deux genres :

- *Entomoplasma* ;
- *Mesoplasma*.

La famille des *Spiroplasmataceae* comprend un seul genre : *Spiroplasma* avec trois espèces dont *Spiroplasma citrii*.

- L'ordre des Acholoplasmatales comprend une seule famille : *Acholeplasmataceae* avec un seul genre : *Acholeplasma*.

- L'ordre des Anaéroplasmatales comprend une seule famille : *Anaeroplasmataceae* constituée de deux genres : *Anaeroplasma* avec deux espèces et *Asteroplasma*.

Il existe un genre à position taxonomique incertaine : le genre *Thermoplasma* avec une seule espèce.



**Tableau VIII : Classification des Mycoplasmes (69)**

<b>Classification</b>	<b>Habitat</b>
<p><b><u>ORDRE 1</u> : MYCOPLASMATALES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Famille 1 : <i>Mycoplasmataceae</i></li> <li>Genre 1 : <i>Mycoplasma</i></li> <li>Genre 2 : <i>Ureaplasma</i></li> </ul>	<p>Homme, animaux, plantes, insectes</p> <p>Homme, animaux.</p>
<p><b><u>ORDRE 2</u> : ENTOMOPLASMATALES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Famille 1 : <i>Entomoplasmataceae</i></li> <li>Genre 1 : <i>Entomolasma</i></li> <li>Genre 2 : <i>Mésoplasma</i></li> <li>• Famille 2 : <i>Spiroplasmataceae</i></li> <li>Genre 1 : <i>Spirolasma</i></li> </ul>	<p>Plantes, insectes</p> <p>Plantes, insectes.</p> <p>Arthropodes (insectes inclus), plantes</p>
<p><b><u>ORDRE 3</u> : ACHOLEPLASMATALES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Famille 1 : <i>Acholeplasmataceae</i></li> <li>Genre 1 : <i>Acholeplasma</i></li> </ul>	<p>Animaux, plantes, insectes</p>
<p><b><u>ORDRE 4</u> : ANAEROPLASMATALES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Famille 1 : <i>Anaeroplasmataceae</i></li> <li>Genre 1 : <i>Anaeroplasma</i></li> <li>Genre 2 : <i>Astéroplasma</i></li> </ul>	<p>Ruminants</p> <p>Ruminants</p>

**Tableau IX : Les différentes espèces humaines de *Mycoplasmes* (49)**

<b>Classification</b>	<b>Localisation principale</b>	<b>Pouvoir pathogène</b>	<b>Premier isolement</b>
<i>Mycoplasma buccale</i>	Respiratoire	-	1965
<i>Mycoplasma faucium</i>	Respiratoire	-	1969
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Urogénitale, sanguine	±	1952
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Urogénitale	±	1981
<i>Mycoplasma hominis</i>	Respiratoire, urogénitale	+	1937
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	respiratoire	-	1974
<i>Mycoplasma pirum</i>	Sanguine	±	1968
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Respiratoire	+	1962
<i>Mycoplasma primatum</i>	Respiratoire	-	1955
<i>Mycoplasma orale</i>	Respiratoire	-	1964
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Respiratoire	-	1953
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	Génitale	±	1991
<i>Mycoplasma penetrans</i>	urogénitale	±	1991

- Non pathogène

± probable

+ certain

### **IV.3. – CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES MYCOPLASMES**

#### **IV.3.1. – Caractères morphologiques et structuraux**

Les Mycoplasmes sont des cellules simples. Ils ont la forme d'un coccus. Ils sont difficiles à observer au microscope optique même en contraste de phase. C'est au microscope électronique que leur morphologie a été étudiée.

Les Mycoplasmes présentent un grand pléiomorphisme : il existe des formes allongées, fusiformes ou filamenteuses. Le diamètre des plus petits cocci capables de se répliquer est de 300 nm environ. Cette taille leur permet de passer à travers les filtres de porosité 450 nm.

Ils sont dépourvus de paroi, ce qui leur confère les propriétés suivantes :

- une sensibilité à la pression osmotique du milieu, au pH, aux variations de température et aux agents tensio-actifs. La pression osmotique est maintenue par le chlorure de sodium des différents milieux de culture ;
- une résistance aux antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi comme les bêta-lactamines ;
- une grande plasticité.

Les Mycoplasmes sont entourés d'une membrane plasmique à trois feuilletts. Cette membrane est constituée de lipides, de protéines, de polysaccharides et de lipopolysaccharides. Ils possèdent également de nombreux ribosomes, un ADN filamenteux au centre et parfois des corps dont on ne connaît pas la nature exacte.

#### **IV.3. 2. – Caractères structuraux**

Du fait de leur petit génome, les Mycoplasmes ont une capacité de biosynthèse limitée. Les Mycoplasmes sont des bactéries exigeantes. Leurs milieux de culture sont complexes et comportent du sérum de cheval ou de poulain et de l'extrait de levure.

Le sérum est non décomplémenté et stérilisé par filtration. Il apporte des protéines naturelles, des lipides non toxiques, du cholestérol non estérifié. Ce cholestérol est incorporé dans la membrane et leur confère la solidité vis-à-vis de l'environnement.

L'extrait de levure apporte des vitamines et des ions minéraux.

Le milieu de base est constitué de macération de viande, de protéines animales ou végétales, de glucose à 0,1 % et de NaCl à 0,5 %. Il peut être rendu solide par addition de gélose.

Les milieux adaptés à la croissance de *Mycoplasma hominis* dérivent des milieux de HAYFLICK et des milieux SP4. Ils présentent un pH ajusté à 7,2 – 7,5 et contiennent de l'arginine, du rouge de phénol et des inhibiteurs des contaminants. Le temps d'incubation est de 1 à 3 jours (alcalinisation du milieu par dégradation de l'arginine).

Sur milieu gélosé, après incubation sous atmosphère anaérobie ou sous CO<sub>2</sub>, les Mycoplasmes donnent des colonies de 100-300 µm de diamètre visibles au microscope optique. Ces colonies présentent l'aspect d'œufs sur le plat.

Les milieux pour les Ureaplasmes dérivent du milieu de SHEPARD et contiennent du chlorure de manganèse qui donnent aux colonies d'*Ureaplasma urealyticum* une couleur brun-noire. Les colonies sont petites (10 – 50 µm de diamètre) irrégulières et présentent un aspect d'oursin. Le temps de croissance est de 1 – 3 jours à 37°C en anaérobiose. En revanche, la détection en milieu liquide s'effectue plus rapidement par l'activité uréasique puissante des Uréaplasmes (18 heures pour obtenir une alcalinisation du milieu).

#### **IV.3.3. – Caractères biochimiques**

Les mycoplasmes fermentent le glucose, hydrolysent l'urée et l'arginine. Ces trois propriétés sont utilisées dans le diagnostic biologique et permettent de les différencier (**tableau X**).

**Tableau X : Profil biochimique des *Mycoplasmes* (49)**

Classification	Caractères biochimiques		
	Glucose	Arginine	Urée
<i>Mycoplasma buccale</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma faucium</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	+	-	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma pirum</i>	+	+	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-	-
<i>Mycoplasma primatum</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma orale</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma salivarium</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma urealyticum</i>	-	-	+

#### IV.4. – IDENTIFICATION

Cette identification repose sur deux critères essentiels :

- l'aspect des colonies en milieu solide ;
- les caractères biochimiques.

Le diagnostic rapide est possible grâce à la détection du génome par PCR ou par hybridation moléculaire. Ces techniques ont une sensibilité et une spécificité supérieure à celle de la culture en milieu liquide.

Des tests sérologiques de Mycoplasmes urogénitaux ont été proposés pour la recherche d'anticorps spécifiques, mais la présence de plusieurs sérotypes (7 pour *Mycoplasma hominis* et 14 pour *Ureaplasma urealyticum*) complique leur réalisation et certains ne sont utilisables chez les sujets traités par des antibiotiques inhibiteurs métaboliques. Etant donné le caractère peu immunogène, la sérologie ne permet d'effectuer qu'un diagnostic différentiel entre une infection profonde (salpingite, endométrite, prostatite, septicémie du *post-abortionum* et du *post-partum*...) et une infection basse à mycoplasme.

Les trois techniques les plus connues sont : l'inhibition métabolique ; l'ELISA et l'immunofluorescence.

## V – LE CONTROLE DE QUALITE ET LA VALIDATION

### V.1. - DEFINITION

Le domaine de la qualité utilise un vocabulaire spécifique qu'il est important de maîtriser pour tout biologiste..

Pour cela, il convient de se reporter aux définitions, de la Norme ISO 8402 Version 1994, et du Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale pour les termes suivants :

**Qualité** : la qualité est l'aptitude d'un produit, d'un procédé ou d'un service rendu, à satisfaire les besoins exprimés et implicites de l'utilisateur.

**Contrôle de qualité** : ensemble des procédures mises en œuvre dans un laboratoire en vue de permettre un contrôle de qualité des résultats des analyses au fur et à mesure de leur exécution.

**Validation** : opération permettant d'assurer qu'un résultat a été obtenu dans des conditions techniques satisfaisantes et tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle.

**Echantillon de contrôle** : échantillon adapté à la méthode utilisée et destiné à apprécier l'exactitude et la précision des résultats.

### V.2. - ASSURANCE INTERNE DE LA QUALITE : CONTROLE DE QUALITE (11)

Le contrôle qualité interne est indispensable pour permettre de déceler les anomalies et les erreurs des mesures pour y remédier immédiatement. Il est organisé par le biologiste.

Il comporte toutes les mesures destinées à vérifier les différentes phases de l'activité permettant l'obtention des résultats et notamment, l'analyse d'échantillons de contrôle effectué dans les mêmes conditions que celles appliquées aux échantillons biologiques.

Les procédures opératoires doivent préciser la fréquence de passage des échantillons de contrôle et les valeurs acceptables pour chaque constituant. Elles doivent également comporter les instructions concernant les mesures à prendre en cas d'anomalies constatées.

Il est rappelé que les échantillons de contrôle ne peuvent en aucun cas se substituer aux échantillons de calibrage des mesures et, inversement, les échantillons de calibrage ne peuvent être utilisés en même temps comme échantillon de contrôle.

Chaque laboratoire a un programme de vérification de la qualité de ses propres tests.

Le contrôle interne de la qualité comprend théoriquement :

- une surveillance continue de la qualité des tests ;
- une vérification complète à chaque étape du test.

### **V.2.1. – Les paramètres de contrôle de qualité**

#### ***1° - Vérification du pH***

Le pH d'un milieu préparé n'a pas besoin d'être systématiquement vérifié lorsqu'il est correctement préparé à partir de poudre déshydratée. Si le milieu est préparé à partir des constituants de base, il faut le laisser refroidir avant de vérifier son pH. Les milieux solides seront testés à l'aide d'une électrode de surface, ou après macération dans de l'eau distillée.

Si le pH s'écarte de plus de 0,2 unités de la norme, l'ajuster avec un acide ou une base ou préparer un nouveau lot.

#### ***2° - Epreuve de stérilité***

Il faut pratiquer les épreuves de stérilité habituelles sur les milieux auxquels on a ajouté du sang ou autres éléments après autoclavage. Prélever 3 à 5 % de chaque lot et incuber à 37°C pendant deux jours. Réfrigérer le reste.



Si l'on observe pour :

- les réactifs un trouble du milieu ;
- les milieux de culture, plus de deux colonies par boîte, il faut jeter l'ensemble du lot.

### ***3° - Epreuve d'efficacité***

Le laboratoire doit conserver une série de souches de référence pour surveiller l'efficacité du milieu. Une liste de ces souches est proposé dans le **tableau XI**. Elles peuvent être obtenues dans le cadre du travail ordinaire, achetées dans le commerce ou être fournies par des laboratoires efficaces.

La démarche à suivre lorsqu'on effectue des épreuves d'efficacité sur de nouveaux lots est la suivante :

- préparer une suspension de la souche de référence avec un trouble à peine visible, équivalent à celui de l'étalon Mac Farland 0,5 et utiliser le contenu d'une anse comme inoculum ;
- laisser incuber pendant la durée habituelle. Lire le résultat comme d'habitude ;
- noter soigneusement le résultat.

### ***4° - Autres critères de qualité***

Les autres critères de qualité d'un test diagnostique sont les suivants :

- la fiabilité : le résultat est-il correct ?
- la reproductibilité : obtient-on le même résultat lorsqu'on répète le test ?
- la rapidité : le test est-il suffisamment rapide pour être utile ?
- le rapport coût/Avantage : le coût du test est-il raisonnable au regard des avantages qu'il présente pour la communauté ?

**Tableau XI : Souches de référence proposées pour le contrôle de la qualité**

<b>Streptocoques</b>	<b>Staphylocoques</b>
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus agalactiae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Strepto D</i> non entérocoques <i>Streptococcus milleri</i> <i>Streptococcus equinus</i> <i>Streptococcus sanguis</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus equi</i> <i>Streptococcus mutans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus sp</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus capitis</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Staphylococcus cohnii</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus warneri</i>
<b>Entérobactéries</b>	<b>Mycoplasmes urogénitaux</b>
<i>Salmonella typhi</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Citrobacter malonaticus</i> <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Mycoplasma hominis</i>

### **V.3. – PROCEDURES DE VALIDATION ET DEFINITION DE QUELQUES PARAMETRES DE VALIDATION (58)**

La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves effectives du fait que les prescriptions particulières d'une méthode analytique en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies.

La validation a pour principal objectif de s'assurer qu'un test microbiologique déterminée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte-tenu du but de l'analyse. Il faudra donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles le test sera utilisée et le but dans lequel il sera employé.

En effet, la validation inclut la spécification des exigences, la détermination des caractéristiques des tests, ainsi qu'une déclaration relative à la validité.

Ainsi, la validation d'une méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique (reproductibilité, répétabilité, précision, exactitude, spécificité, linéarité et domaine d'utilisation, sensibilité, limite de détection) et d'en préciser les limites de validité.

La validation peut se décomposer en différents modules correspondant à l'évaluation de chacune de ses caractéristiques :

- linéarité et domaine d'utilisation ;
- répétabilité et reproductibilité ;
- limite de détection ;
- précision ;
- exactitude ;
- sensibilité ;
- spécificité.

### ***1° - Linéarité ou domaine d'analyse***

C'est l'évaluation de la limite haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyte et la dilution effectuée.

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons.

### ***2° - Limite de détection***

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée, avec une probabilité connue, d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions.

### ***3° - Précision***

C'est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents.

### ***4° - Répétabilité et reproductibilité***

Evaluation de la dispersion des résultats obtenus à partir des aliquotes d'un même spécimen distribuées dans un même série d'analyse (répétabilité) ou dans des séries différentes (reproductibilité).

#### **► Répétabilité**

La mesure de la variation des résultats obtenus au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps.

#### **► Reproductibilité**

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes, généralement dans des laboratoires différents, à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser.

### **5° - Spécificité**

C'est l'aptitude d'une méthode à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon.

### **6° - Sensibilité**

C'est l'aptitude d'une méthode à détecter de petites variations de concentration.

### **7° - Exactitude et justesse**

Evaluation de l'exactitude d'une méthode B par rapport à une méthode A reconnue pour sa fiabilité (technique de référence), avec des spécimens de contrôle.

L'exactitude d'une méthode est le degré de concordance entre les résultats obtenus et la vraie valeur de la grandeur mesurée.

### **Remarque**

Toutes ces caractéristiques ne sont pas toujours applicables à toutes les méthodes d'essai ni à tous les produits à analyser.

Dans tous les cas, chacune des caractéristiques de performance applicable à la méthode analytique doit faire l'objet d'une évaluation fondée sur des données expérimentales.