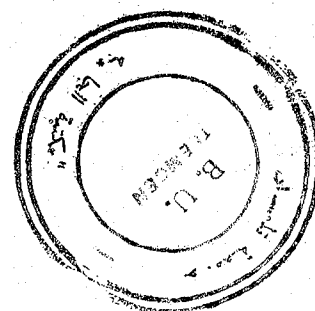


DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE DE PROVENCE  
MENTION SCIENCES  
(CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT ET SANTE)

Houria BOUCHEMAL

**MARQUEURS MOLECULAIRES  
DES BACTERIES RESPONSABLES  
D'INFECTIONS NOSOCOMIALES**



Soutenu le 27 juin 1990 devant la commission

Pr. J. REY  
Pr. Ph. DE MICO  
Pr. J. FRENEY  
Pr. Y. PELOUX  
Pr. C. ROUSSET  
Dr. L. GARDAN  
Dr. C. BOLLET

Je dédie ce travail à mon mari Ahmed qui a toujours su être présent qui m'a donné les armes pour réussir et qui m'a prodiguée de de ses précieux conseils.

Ton soutien moral tout le long de l'élaboration de ce travail m'a beaucoup aidé.

Sois assuré de mon profond respect et mon grand amour.

A mes parents chéris, en signe filiale de reconnaissance et en témoignage de ma profonde affection.

A mes soeurs Nora et Fethia, je dis ici la permanence de ma tendre amitié.

A mes beaux-parents avec tout mon respect.

A toute ma famille.

A toutes mes copines avec sympathie.

## TABLE DE MATIERES

1	INTRODUCTION	4
2	EXPOSE THEORIQUE	6
2.1	Les infections nosocomiales	6
2.1.1	Chaîne de l'infection	6
2.1.1.1	Bactéries responsables	6
2.1.1.1.1	<u>Staphylococcus epidermidis</u>	7
2.1.1.1.2	<u>Corynebacterium</u>	7
2.1.1.1.3	<u>Flavobacterium meningosepticum</u>	7
2.1.1.1.4	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	7
2.1.1.1.5	<u>Acinetobacter baumannii</u>	7
2.1.1.1.6	<u>Serratia marcescens</u>	8
2.1.2	Mode de transmission	8
2.1.2.1	Modification de parasitocénose	8
2.1.2.2	Formes étiologiques	8
2.1.2.2.1	Auto-infection	8
2.1.2.2.2	Hetero-infection	8
2.1.2.2.3	Xeno-infection	8
2.1.2.2.4	Exo-infection	9
2.1.3	Sujets réceptifs	9
2.1.4	Rôle du laboratoire de bactériologie dans la lutte contre l'infection	9
2.1.4.1	Bactériologie dénominative	9
2.1.4.2	Bactériologie épidémiologique	9
2.1.4.3	Utilisation de marqueurs épidémiologiques	10
2.2	Marqueurs épidémiologiques classiques	12
2.2.1	Détermination des biotypes	12
2.2.2	Détermination de sérotypes	12
2.2.3	Détermination des lysotypes	13
2.2.4	Détermination des bactériocinotypes	15
2.2.5	Détermination des antibiotypes	15
2.2.6	Facteurs de virulence	16
2.2.7	Types de colonies	16
2.3	Marqueurs épidémiologiques moléculaires	17
2.3.1	Profil de restriction de l'ADN total	17
2.3.1.1	Enzymes de restriction	17
2.3.1.2	Nomenclature des enzymes de restriction	17
2.3.1.3	Types de coupure	17
2.3.2	Détermination du profil plasmidique	18
2.3.2.1	Exemples d'utilisation de la plasmidotypie	19
2.3.3	Détermination des profils protéiques	20
2.3.3.1	Séparation des protéines	20
2.3.3.2	Application de la technique	20
2.3.4	Les sondes nucléiques	21
2.3.4.1	Clonage moléculaire	21
2.3.4.2	Hybridation moléculaire	22
2.3.4.2.1	Principe	22
2.3.4.2.2	Préhybridation	22
2.3.4.2.3	Lavage des membranes	23
2.3.4.3	Application de la technique	23
2.3.5	Mise en évidence des fragments de chromosome codant pour l'ARN ribosomal	24

2.3.6	Détermination des zymotypes	25
3	TRAVAUX PERSONNELS	28
3.1	MATERIEL ET METHODES	28
3.1.1	La biotypie	32
3.1.1.1	Biotypie de <u>Klebsiella</u>	32
3.1.1.1.1	Recherche d'uréase et indole	32
3.1.1.1.2	Utilisation des sucres	32
3.1.1.1.3	Utilisation du malonate	33
3.1.1.1.4	Utilisation du D-tartrate	33
3.1.1.1.5	Utilisation du mucate	33
3.1.1.1.6	Croissance et production de gaz sur milieu BLVB-T	33
3.1.1.2	Biotypie d' <u>Acinetobacter baumanii</u>	35
3.1.1.2.1	Identification	35
3.1.1.2.2	Etude des sources de carbone	35
3.1.1.3	Biotypie d' <u>Enterobacter cloacae</u>	38
3.1.1.3.1	Milieux nécessaires	38
3.1.1.3.2	Recherche de bêta-xylosidase	39
3.1.1.3.3	Etude de fermentation des sucres	39
3.1.1.4	Biotypie de <u>Serratia marcescens</u>	40
3.1.1.4.1	Milieux nécessaires	40
3.1.1.4.2	Recherche de DNase	41
3.1.1.4.3	Recherche de TTR	41
3.1.1.4.4	Etude d'utilisation des sucres	42
3.1.2	La sérotypie	42
3.1.2.1	Sérotypie des staphylocoques dépourvus de coagulase	42
3.1.2.2	Sérotypie de <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	43
3.1.3	La lysotypie des staphylocoques dépourvus de coagulase	44
3.1.3.1	Bactériophages et leur titrage	44
3.1.3.1.1	Enrichissement en milieu solide	45
3.1.3.1.2	Enrichissement en milieu liquide	45
3.1.3.2	Lysotypie proprement dite	45
3.1.3.3	Lecture des résultats	45
3.1.3.4	Notation des résultats	46
3.1.4	L'antibiotypie	46
3.1.5	Extraction de l'ADN chromosomique	47
3.1.5.1	Culture	47
3.1.5.2	Lyse	47
3.1.5.3	Déprotéinisation	47
3.1.5.4	Précipitation	47
3.1.5.5	Purification de l'ADN	47
3.1.5.6	Dosage de l'ADN	48
3.1.5.7	Coupage de l'ADN	49
3.1.5.8	Electrophorèse en gel d'agarose	49
3.1.5.9	Révélation et étalonnage du gel d'agarose	49
3.1.6	Extraction des plasmides	50
3.1.6.1	Extraction par mini-prep	50
3.1.7	Extraction des protéines cytoplasmiques	51
3.1.7.1	Dosage des protéines	51
3.1.7.2	Appareil d'électrophorèse	52
3.1.7.3	Préparation du gel de polyacrylamide	52
3.1.7.3.1	Traitement des plaques	52
3.1.7.3.2	Recristallisation du SDS	52
3.1.7.3.3	Coulage du gel de séparation	53
3.1.7.3.4	Coulage du gel de concentration	53

3.1.7.4	Mise en route de l'électrophorèse	53
3.1.7.4.1	Préparation des échantillons	53
3.1.7.4.2	Dépôt et migration des échantillons	54
3.1.7.4.3	Coloration et décoloration du gel	54
3.1.8	Préparation d'une sonde	54
3.1.8.1	Préparation de l'ADN et du vecteur	55
3.1.8.2	La ligation	55
3.1.8.3	Préparation des cellules compétentes	55
3.1.8.4	La transformation	56
3.1.8.5	Choix des bactéries ayant incorporés l'ADN recombinant	56
3.1.8.6	Choix des sondes	56
3.1.8.7	Transfert de Southern	56
3.1.9	Hybridation	57
3.1.9.1	Technique de multi-amorçage au hasard	57
3.1.9.2.1	Principe	57
3.1.9.3.2	Marquage de la sonde	58
3.1.9.3.3	Préhybridation	58
3.1.9.3.4	Hybridation	59
3.1.9.3.5	Lavage des membranes	59
3.1.9.3.6	La détection du signal	59
3.1.9.3.7	La coloration	59
3.1.9.2	Technique par luminescence	60
3.1.9.2.1	Principe	60
3.1.9.2.2	Marquage de la sonde	60
3.1.9.2.3	Préhybridation	60
3.1.9.2.4	Hybridation	60
3.1.9.2.5	Lavage des membranes	60
3.1.9.2.5	La détection du signal	61
3.1.9.3	Hybridation ADN-ARN	61
3.2	RESULTATS	62
3.2.1	Biotypie	62
3.2.1.1	Biotypie de <u>Klebsiella</u>	62
3.2.1.2	Biotypie d' <u>Acinetobacter baumanii</u>	65
3.2.1.2.1	Association des biotypes	66
3.2.1.2.2	Sensibilité aux antibiotiques	66
3.2.2	Sérotypie	69
3.2.2.1	Sérotypie des staphyloques dépourvus à coagulase négative	69
3.2.2.2	Sérotypie de <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	69
3.2.3	Lysotypie	71
3.2.3.1	Résultats de titrage des phages	71
3.2.3.2	Expression des résultats	73
3.2.4	Profils protéiques	83
3.2.5	Profils plasmidiques	83
3.2.6	Sondes et hybridation	84
3.2.7	Identification de <u>Campylobacter jejuni</u> par une sonde biotynilée	93
3.2.8	Evaluation d'une sonde biotynilée pour l'identification de <u>Neisseria gonorrhoeae</u>	107
3.2.9	Epidémiologie moléculaire d'une bactérie du groupe <u>EF-4</u> responsable d'infection chez un patient	112
3.3	DISCUSSION	118
4	CONCLUSION	119
5	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Microbiologie Epidémiologie et Hygiène hospitalière Hôpital Salvator, sous la direction de monsieur le professeur Ph. De Micco.

Nous remercions le professeur Ph. De Micco qui nous a accueilli avec bienveillance dans son service et d'avoir voulu diriger ce travail et nous apporter ses critiques pertinentes et consécutives.

Nous faisons d'agréable devoir de remercier le professeur J. Rey. d'avoir accepté de présider le jury. Après nous avoir prodigué votre enseignement, votre présence parmi nous est un grand honneur pour ce travail.

Merci également au docteur C. Bollet pour l'aide qu'il nous a apportée dans la réalisation de ce travail. Nous le remercions plus particulièrement pour avoir dirigé ce travail et de nous avoir initié aux techniques de biologie moléculaire et sans lui ce travail n'aurait pu se faire.

A monsieur le professeur Y. Peloux, nous tenons à exprimer notre reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous remercions le professeur C. Rousset d'être parmi le jury.

Nous remercions le docteur L. Gardan, son dynamisme et sa compétence est un très bon exemple pour les étudiants.

Merci également au professeur J. Freney qui a l'amabilité de juger ce travail. Pour l'aide si précieuse qu'il a bien voulu nous apporter dans la réalisation de cette étude, en particulier par l'envoi de nombreuses souches qui nous ont servi de référence.

Nous remercions madame le docteur C. Gulian pour sa participation dans la réalisation de ce travail.

Merci également aux techniciens du laboratoire plus particulièrement V. Galicher, pour leur aide dévouée et leur sympathie.

## 1 INTRODUCTION

De par sa fonction, l'hôpital réalise une concentration d'agents infectieux, d'où un risque certain de contamination d'un malade à l'autre. Les infections nosocomiales deviennent la hantise des services hospitaliers. Leur importance dans les hôpitaux est reconnue partout, leur incidence oscille entre 5 et 10 % des admissions et environ une personne sur 5000 en meurt.

Les infections nosocomiales sont considérées pour les gouvernements et par le corps médical comme un thème de préoccupation majeure tant au plan social qu'économique. Au cours de ces dernières décades, on a pu observer un changement, une évolution des flores responsables d'infections nosocomiales ; les proportions respectives des bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif changent sous la pression conjuguée de plusieurs facteurs d'environnement ; de nouveaux agents d'infections hospitalières sont reconnus et leur progression dans les hôpitaux constitue une menace permanente surtout pour les malades immuno-déprimés.

A cause de son activité intrinsèque, de l'état immunitaire souvent altéré des patients qui s'y trouvent que l'usage intensif de substances anti-microbiennes que l'on fait, l'hôpital est un endroit privilégié qui voit apparaître et se développer des micro-organismes particulièrement agressifs et résistants.

Pour contrôler l'émergence de ces bactéries et leur propagation, il est indispensable de pouvoir les identifier d'une façon précise. Pour cela, nous disposons d'un certain nombre d'outils parmi lesquels nous pouvons citer : la biotypie, la sérotypie et la lysotypie. L'évolution des techniques microbiologiques amorcé il y a une ou deux décennies a pris depuis cinq ans une allure foudroyante. Il apparaît de plus en plus que les techniques microbiologiques de la fin du XX ème siècle et, plus encore, celles du début du XXI ème siècle seront moléculaires.

C'est ainsi que le rôle d'un laboratoire de microbiologie ne se limite plus à l'identification à l'espèce du micro-organisme en cause et à l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques. Son activité de routine comprend également l'évaluation de l'incidence des micro-organismes habituellement en cause dans les infections nosocomiales. C'est en confrontant les caractéristiques variables à l'intérieur de l'espèce bactérienne, appelées marqueurs épidémiologiques, que l'on peut suspecter l'identité ou la non identité de plusieurs souches, et donc connaître l'origine de la contamination, le cycle de transmission, le réservoir de virus, c'est à dire la signification épidémiologique des bactéries isolées de prélèvements pathologiques (17).

Dans ce contexte, nous développons un système de marquage épidémiologique moléculaire applicable aux bactéries pathogènes pour l'homme, et en particulier aux bacilles à Gram négatif aérobies, et à celles de l'environnement hospitalier dans le cadre de lutte contre l'infection nosocomiale et de l'hygiène hospitalière.



Notre travail comporte trois parties : une première partie où nous envisagerons la présentation bibliographique, la deuxième partie relate notre travail expérimental et la troisième partie contient les différents résultats.

## 2. EXPOSE THEORIQUE

### 2.1 Les infections nosocomiales

On qualifie de "nosocomiale", toute infection contractée à l'hôpital (14,151,107,166).

#### 2.1.1 Chaîne de l'infection.

La chaîne de l'infection comprend trois maillons principaux : le micro-organisme qui provoque l'infection (agent responsable), la voie de transmission de cet agent (mode de contamination) et l'organisme réceptif à l'agent envahisseur (l'hôte). S'il manque un des maillons, la chaîne est bien évidemment incomplète et il n'y a pas d'infection (6).

##### 2.1.1.1 Les bactéries responsables

Autrefois, les infections hospitalières étaient dues à des micro-organismes n'appartenant pas à la flore normale des patients (bactérie pathogène spécifique Bsp), aujourd'hui, ce sont les germes de la flore normale des patients qui de plus en plus reponsables de ces infections (26,1).

Parmi les facteurs ayant contribué à cette évolution, la pression de sélection de l'antibiothérapie a joué un rôle considérable dans les changements de responsabilité dans l'infection hospitalière. Ainsi, les bactéries infections nosocomiales ont subi des variations dans le temps.

De 1945 à 1955, en milieu hospitalier, 65 % des infections étaient liées à des cocci à Gram positif principalement au Staphylocoque doré "pathogène".

Dès cette époque, avec l'introduction de la penicilline, les antibiotiques commencent à jouer un rôle sélectif.

En effet, de 1955 à 1965, l'évolution s'est faite au " bénéfice " des staphylocoques pathogènes résistants à la penicilline. A partir de 1966, cette évolution est suivie d'une troisième phase où l'on voit progressivement sélectionnés des bacilles à Gram négatif comme agents d'infections hospitalières. Cette évolution se fait à la fois sur le plan quantitatif et qualitatif.

Quantitativement, la proportion de bacilles à Gram négatif s'accroît par rapport au staphylocoque doré qui régresse. Sur le plan qualitatif, on voit émerger d'abord E.coli et Proteus puis des espèces notablement plus résistantes : le groupe Klebsiella, Enterobacter, Serratia (groupe KES) qui poursuivent actuellement leur rôle d'agents de l'hospitalisme infectieux.

Une étape plus récente comporte l'apparition d'espèces opportunistes qui étaient, il y a 20 ans, rarement isolées en position de pathogénicité : Providencia, Acinetobacter, Pseudomonas, actuellement beaucoup plus pathogène. Parmi les bactéries d'émergence récente en tant qu'agents

d'infections hospitalières (voir tableau I), on peut citer :

#### 2.1.1.1.1 Staphylococcus epidermidis

Considéré comme une bactérie commensale de la peau, son isolement à partir des produits pathologiques a pu être longtemps interprété comme sans signification. actuellement, on évolue vers la connaissance rapidement croissante du rôle pathogène des espèces de Staphylocoques à coagulase négative (S. epidermidis, prédominant ; S. saprophyticus, S. hominis, S. haemolyticus (11,78,155).

Le pouvoir pathogène de ces souches ainsi que leur résistance aux antibiotiques (108,144) à l'exception de la vancomycine, seraient en relation avec la production d'un polysaccharide de surface favorisant leur adhérence au matériel de perfusion (production de slime) (89).

#### 2.1.1.1.2 Corynebactérum

Certain Corynebactérum saprophytes, présentes normalement sur le revêtement cutané notamment celles désignées groupe JK (92,125,161) sont à l'origine de colonisation ou de surinfection, surtout de prothèses valvulaires ou au cours de transplantations de moelle osseuse ; elles peuvent être isolées de septicémies ou encore de péritonites chez les hémodialysés. Ces bactéries sont souvent multi-résistantes, mais peuvent néanmoins être éradiquées par la vancomycine, la rifampicine ou la ciprofloxacine. L'incidence de ces infections nosocomiales à Corynébactéries est pour le moment difficile à déterminer mais probablement sous-évaluée.

#### 2.1.1.1.3 Flavobacterium meningosepticum

C'est un agent d'infection nosocomiale, principalement dans les unités de réanimation. On le retrouve impliqué dans des infections urinaires, des pneumopathies des septicémies sur cathéter (117). Ce sont des bactéries résistantes : aux bêta-lactamines, aux aminosides et à la colistine.

#### 2.1.1.1.4 Xanthomonas maltophilia

Il est reconnu comme l'une des espèces d'importance croissante, en tant qu'agent d'infection nosocomiale, et serait la deuxième espèce en fréquence parmi les pseudomonas d'infections hospitalières. Sa résistance à l'imipenem favorise cette sélection (100).

#### 2.1.1.1.5 Acinetobacter baumannii.

Il figure parmi les espèces opportunistes les plus résistantes aux antibiotiques (10) il est à l'origine de pneumopathies et des infections urinaires nosocomiales. On peut également le retrouver à l'origine de surinfection sur prothèse de hanche ou sur valves cardiaques, de méningites secondaires et de septicémies ; des souches d'Acinetobacter ont même été isolées récemment de cellulites infectieuses dans un service de réanimation

chirurgicale ; on isole Acinetobacter avec une fréquence croissante dans les surinfections chez les grands brûlés.

#### 2.1.1.1.6 Serratia marcescens

Elle est en cause dans 85 % environ des infections à Serratia. Le tractus digestif n'est pas clairement la source des Serratia responsables des infections nosocomiales : certains auteurs n'ont jamais retrouvé Serratia dans les selles (55) ; d'autres (32) retrouvent S. marcescens chez 2 à 3 % des malades hospitalisés non infectés et chez 33 % des malades infectés par Serratia (59,18,).

#### 2.1.2 Mode de transmission.

On distingue deux niveaux différents

##### 2.1.2.1 Modification de la parasitocénose.

L'individu, entre à l'hôpital avec sa parasitocénose mais il la modifie au cours de son séjour par contact avec l'environnement hospitalier : ainsi il peut acquérir un certain nombre de souches nouvelles sur sa peau, ses muqueuses et dans les vicères creux.

##### 2.1.2.2 Formes étiologiques de l'infection.

###### 2.1.2.2.1 Auto-infection

Le malade peut s'infecter avec ses propres micro-organismes, soit in situ, soit à partir de l'environnement immédiat où il les a dispersés (surface de la peau, vêtements, lit). Les portes d'entrée sont les lésions des muqueuses et les lésions cutanées ; les micro-organismes à potentiel infectieux sont là : bactéries de la peau, de la surface des muqueuses, micro-organismes intestinaux disséminés dans son lit et sur les téguments. Ce mécanisme est extrêmement simple. Le plus souvent ces infections surviennent "spontanément" à partir du malade et de son environnement immédiat.

###### 2.1.2.2.2 Hétéro-infection

Le micro-organisme responsable d'une infection chez un malade peut être transporté chez un autre malade et provoquer une infection croisée ou hétéro-infection. Cet agent pathogène est rarement transmis par contact direct ou par voie aérienne : le plus souvent, le vecteur est le personnel soignant, ses mains, ses instruments de travail, et on parle d'infection "manuportée". Il s'agit donc en général d'infections nosocomiales iatrogènes qui engagent la responsabilité du personnel soignant.

###### 2.1.2.2.3 Xeno-infection

Ce nom est donné à des maladies dues à des bactéries, des virus, des parasites sévissant sous forme endémique ou épidémique dans la population extra-hospitalière l'agent pathogène est importé à l'hôpital par des malades qui en sont atteints ou sont en incubation, par le personnel ou visiteurs. Ces agents infectieux

se transmettent selon leur génie propre (voie aérienne, contact direct ou indirect, etc.), mais ils vont trouver à l'hôpital des victimes particulièrement réceptives et des conditions de transmission facilitées.

#### 2.1.2.2.4 Exo-infection.

Cette étiologie est liée à des erreurs ou des avaries techniques amenant au contact des malades, des micro-organismes pathogènes, alors que toutes les précautions sont en principe prises pour les protéger : stérilisation inefficace, filtre à air fracturé, eau polluée ...etc. Il s'agit de contamination par des micro-organismes en principe systématiquement exclus du contact avec le malade, importés par accident dans la biocénose hospitalière : c'est pourquoi nous appelons exo-infection ce type d'infection nosocomiale.

#### 2.1.3 Sujets réceptifs.

Sont particulièrement réceptifs :

- les malades atteints d'un déficit immunitaire.
- les malades dont le revêtement cutané est largement lésé : brûlés, polytraumatisés, grabatairesescarrhotiques.
- insuffisants cardiaques et respiratoires, porteurs d'escarres et d'ulcères.
- Les nouveaux-nés, surtout prématurés, dont le système immunitaire est immature.
- les diabétiques.

Cette liste n'est pas exhaustive : il existe de multiples causes qui expliquent la fragilisation des malades hospitalisés (14).

#### 2.1.4 Rôle du laboratoire dans la lutte contre les infections nosocomiales.

Il se situe à trois niveaux :

##### 2.1.4.1 Bactériologie dénomminative.

L'activité quotidienne d'un laboratoire de bactériologie, consiste en premier lieu à faire selon la définition de Vilain (5) de la bactériologie dénomminative, qui a pour objectif d'isoler d'identifier et de tester la sensibilité aux antibiotiques des souches responsables des infections chez les malades.

##### 2.1.4.2 Bactériologie épidémiologique.

Celle-ci aura comme objectif :

- recueillir et enregistrer les informations si possible par un système informatique, qui aboutira à une analyse statistique quantitative des micro-organismes rencontrés.

- Comparer entre elles les souches bactériennes isolées dans un même service, une même unité ou un même établissement de soin. Il s'agit d'affirmer le diagnostic d'infection hospitalière croisée ou épidémique et de rechercher le mode de transmission, afin d'arrêter la propagation du micro-organisme responsable. (44).

### 2.1.2.3 Utilisation des marqueurs épidémiologiques.

Pour contrôler l'émergence des bactéries et leur propagation, il est indispensable de pouvoir les identifier d'une manière précise et non équivoque. Il ne sera donc pas suffisant d'identifier au niveau de l'espèce une bactérie suspecte, mais il faudra être capable de distinguer des types à l'intérieur de cette espèce. Pour cela nous disposons d'un certain nombre d'outils, ou marqueurs épidémiologiques citons : la biotypie, la lysotypie, la sérotypie, la bactériocinotypie, la détermination des profils protéiques ainsi que le profil plasmidique (114).

Ils sont utilisés essentiellement pour des contrôles de contamination de l'environnement et les enquêtes épidémiologiques notamment :

- l'évaluation de la qualité des méthodes d'hygiène hospitalière.
- l'étude de la diffusion des souches dans l'environnement.
- recherche des repaires des bactéries (28).

Tableau (I) Principales localisations des infections nosocomiales en fonction des espèces en cause (9,92,93,100,108,117)

Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif
<u>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</u>	<u>ESCHERICHIA COLI</u> et <u>COLIFORMES</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- plaies opératoires</li> <li>- infections osseuses</li> <li>- septicémies</li> <li>- endocardites sur prothèse</li> <li>- médiastinites</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- infections urinaires</li> <li>- plaies opératoires</li> <li>- abcès intra-abdominaux</li> <li>- pneumopathies nosocomiales</li> <li>- septicémies</li> <li>- méningites néonatales</li> </ul>
<u>SREPTOCOQUES</u>	<u>SALMONELLA</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- groupe A, C, G : plaies opératoires, infections tissus mous, septicémies</li> <li>- groupe C : arthrite septique</li> <li>- groupe D : infections urinaires septicémies</li> </ul>	gastroenterites
	<u>GROUPE KES</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- septicémies</li> <li>- pneumopathies nosocomiales</li> <li>- infections urinaires</li> <li>- plaies opératoires</li> </ul>
<u>ANAEROBIES : CLOSTRIDIUM</u>	<u>ANAEROBIES : BACTEROIDES</u>
<u>C. difficile</u> : colite pseudo membraneuse	<u>PSEUDONONAS AERUGINOSA</u>
<u>C. perfringens</u> : gangrène post opératoire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- septicémies</li> <li>- pneumopathies nosocomiales</li> <li>- surinfection chirurgicales</li> <li>- infections urinaires</li> <li>- grands brûlés</li> </ul>
<u>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</u>	<u>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>-infections sur prothèses valvulaires et de hanche</li> <li>- médiastinites</li> <li>- péritonites (dialysés)</li> <li>- endocardites subaiguës (drogués)</li> <li>- septicémies (cathéters)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pneumopathies nosocomiales</li> </ul>
<u>CORYNEBACTERIES</u>	<u>FLAVOBACTERIUM MENINGOSEPTICUM</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- infections sur prothèses valvulaires</li> <li>- péritonites</li> <li>- surinfections greffes de moelle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- méningites néonatales</li> <li>- septicémies</li> <li>- infections urinaires</li> <li>- plaies chirurgicales</li> </ul>
	<u>PSEUDOMONAS MALTOPHILIA</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- septicémies, endocardites</li> <li>- plaies opératoires</li> <li>- méningites secondaires</li> <li>- pneumopathies nosocomiales</li> <li>- infections urinaires</li> </ul>
	<u>ACINETOBACTER CALCOACETITICUS</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- septicémies, endocardites</li> <li>- méningites secondaires</li> <li>- pneumopathies nosocomiales</li> <li>- infections urinaires</li> </ul>

## 2.2 MAQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES CLASSIQUES

### 2.2.1 Détermination de biotypes ou biovars

C'est l'étude des caractères biochimiques ou culturels les plus variables à l'intérieur d'une espèce. Elle permet d'individualiser des biovars qui sont autant de marqueurs épidémiologiques.

La mise en évidence d'un profil biochimique particulier associé parfois à un spectre de résistance aux agents anti-microbiens, est un moyen rapide et facile à mettre en oeuvre. Parmi les systèmes éprouvés citons la subdivision de Serratia marcescens en 19 biotypes (étude de 8 composés organiques en auxanogramme et 3 caractères culturels), et celle de Yersinia enterocolitica en 5 biotypes.

La biotypie est une technique insuffisamment discriminante. Elle peut cependant être aisément effectuée dans un premier temps. Si les souches d'un même biotype sont en cause dans un foyer présumé d'épidémie, il faut ensuite déterminer le type antigénique ; c'est le cas de Klebsiella (120).

Par ailleurs, le manque de sensibilité de quelques tests, fait qu'il existe un certain nombre de souches inclassables et parfois une erreur d'identification, c'est le cas des staphylocoques dépourvus de coagulase (2,35,45,77).

Les infections nosocomiales à Acinetobacter bien-que complexe, peuvent à l'aide de la détermination du biotype être abordées dans un laboratoire de microbiologie en utilisant les galeries API NE (99,152).

### 2.2.2 Détermination des sérotypes

C'est la mise en évidence d'antigènes au niveau de la bactérie. Plusieurs cas de figure existent :

- soit il existe une homologie sérologique à l'intérieur de l'espèce auquel cas tous les individus auront le même sérotype. c'est le cas de Pseudomonas pseudomallei ou de Klebsiella ozaenae.
- Soit il existe plusieurs antigènes qui peuvent être variables selon les individus au sein de l'espèce. On est donc confronté à l'existence de sérotypes. Malgré les compléments apportés à la sérotypie, toutes les souches de P. aeruginosa ne sont pas sérotypables. Les raisons en sont les suivantes :
- La souche isolée est une souche rugueuse qui est alors auto-agglutinable.
- La souche isolée est une souche muqueuse que l'on rencontre dans les mucovidoses les infections urinaires chroniques et pulmonaires.
- La souche n'est ni muqueuse ni rugueuse. Elle agglutine avec



le mélange B (0 : 2, 0 : 5, 0 : 7 et 0 : 8) mais avec aucun des sérums mono-valents. La souche est dite non agglutinable (NAG).

- La souche est polyagglutinable : elle donne une réaction d'agglutination croisée avec au moins 2 immun-sérums mono-valents (28).

Le typage antigénique de Klebsiella utilise la mise en évidence de l'antigène capsulaire K (réaction de gonflement de la capsule de Neufeld). Elle consiste à rechercher au microscope à contraste de phase une réaction antigène-anticorps capsulaire.

Une réaction positive se traduit par opacification de la capsule et son léger gonflement (38,105,121) Il existe 77 types capsulaires différents ; certains d'entre eux sont trouvés chez Klebsiella mobilis (Enterobacter aerogenes).

Les études sur la structure antigénique des Serratia sont relativement récentes : En 1957, Davis et Woodward (30) décrivent six groupes de facteurs O, en 1972, Edward et Ewing (37) en portent le nombre à 15 et reconnaissent 13 facteurs H. En 1977 et 1978, à la suite des travaux de Le Minor et Pigache d'une part et Keber d'autre part, 20 facteurs H sont reconnus (87,88,153) Ces diverses méthodes ont été appliquées à des études épidémiologiques (154).

Pour les acinetobacter, Das a réalisé une immunofluorescence indirecte avec les immun-sérums (marqués à la fluorèsceine digirés contre les antigènes capsulaires). L'immunofluorescence indirecte lui a permis de classer 95 % des souches en trente sérotypes distincts (29).

La technique généralement utilisée est l'agglutination des bactéries sur lame à l'aide d'un immun-sérum spécifique. Sa fiabilité, sa simplicité et sa rapidité place la sérotypie à la portée de tous les laboratoires. De plus, les caractères antigéniques des bactéries sont généralement stables contrairement à certains caractères biochimiques qui peuvent être modifiés sous l'effet d'une mutation.

Les immun-sérums ne sont pas malheureusement disponibles pour tous les micro-organismes. Il se trouve que certaines bactéries parmi celles cités ne sont pas sérotypables à l'aide des immun-sérums usuels, ce qui rend la sérotypie insuffisante dans ces cas là (4).

### 2.2.3 Détermination des lysotypes

Elle consiste à mettre en évidence, suivant un protocole aussi standardisé que possible, l'action lytique d'un bactériophage c'est à dire la multiplication d'un virus hautement spécifique dans une cellule bactérienne possédant l'équipement antigénique nécessaire pour assurer la fixation et se trouvant dans un état physiologique autorisant l'établissement d'un cycle complet de maturation de ce virus.

Les conditions dans lesquelles s'effectue chaque lysotypie découlent des propriétés des bactériophages et des

bactéries sensibles à leur action. La composition du milieu de culture, l'âge de la culture, la densité de l'inoculum, le mode d'ensemencement, la température et la durée de l'incubation doivent être adaptées pour chaque espèce et pour chaque système.

Il faut vérifier l'absence de toute contamination des préparations virales par un bactériophage contaminant dont l'action va masquer ou se substituer à celle du bactériophage spécifique. On doit mesurer le titre des préparations utilisées (pures ou diluées) et la morphologie des plages.

Toute lysotypie, est en grande partie tributaire de l'étendue des connaissances taxonomiques de l'espèce étudiée, aussi que l'utilisation d'un jeu de phages convenablement choisis. C'est ainsi que les difficultés dans l'établissement d'une lysotypie des mycobactéries sont dues à l'absence de critères certains de différenciation entre les diverses espèces de mycobactéries atypiques pathogènes ou saprophytes pendant de nombreuses années.

Quand à la valeur de la lysotypie, elle est très bonne pour plusieurs raisons :

- C'est un caractère stable car étroitement lié à la paroi bactérienne.
- C'est un caractère épidémiologique qui peut intervenir soit seul comme pour le cas de Salmonella typhi pour lequel on distingue 72 lysotypes (127) soit lié à d'autres techniques de marquage.

L'application de cette technique en milieu hospitalier, permet en cas d'infection grave à Staphylocoque à coagulase négative (endocardites, infection du liquide céphalo-rachidien) de définir la proportion d'auto-infection, l'importance des portes d'entrée non veineuses et la fréquence des infections croisées épidémiques (21).

Vieu et Klein de l'Institut Pasteur, ont pu individualiser 115 lysotypes au sein d'une collection de 2200 souches d'Acinetobacter, en majorité d'origine hospitalière. A l'aide d'un système de lysotypie (21 bactériophages introduits en 1982) a permis de subdiviser des souches non typables en 20 sous groupes et un groupe de souches insensibles (160).

Il existe des phages adaptés aux Bacillus : groupe 1 B. antracis, groupe 2 B. cereus et un troisième groupe aux deux (149).

Perrin (111) a pu typer par les phages spécifiques, environ 90 % de souches de Staphylococcus aureus avec 11,2 % seulement de souches non typables. Jamet a pu identifier 82 % de staphylocoques (68).

La lysotypie est moins utilisable pour le typage des souches de Klebsiella (104,119,137).

La majorité des systèmes de lysotypie ne sont disponibles que dans des centres spécialisés auxquels on peut envoyer les souches. Sous réserve d'une bonne standardisation de la méthode, la lysotypie peut donner de précieuses indications, en ce qui concerne le degré de parenté de deux souches lors d'une poussée épidémique.

#### 2.2.4 Détermination des bactériocinotypes

De nombreuses bactéries secrètent des bactériocines substances antibiotiques protéiques exerçant leur action sur des souches de la même espèce et sur des souches très voisines. C'est un procédé de typage intéressant car stable.

En effet, la formation d'une bactériocine est due à la présence d'un gène plasmidique appelé bactériocinogène ; se comportant comme un prophage hautement défectif, ne produisant qu'une protéine qui se fixe aux sites récepteurs pariétaux de la souche indicatrice, ce qui donne à cette technique une très bonne spécificité et une très bonne valeur épidémiologique (128).

La technique la plus utilisée est la pyocinotypie (36,39,47,48,) qui intervient comme marqueur surtout lorsqu'on a affaire à :

- Une souche muqueuse.
- une souche non agglutinable.
- Une souche auto-agglutinable.

Des auteurs italiens (Pierto, Varaldo et Giuseppe) (156) ont montré que dans certaines conditions, les staphylocoques produisent une activité bactériolytique facilement détectable. Ces activités sont de plus différentes ce qui placerait ce caractère parmi les éléments de marquage épidémiologique.

Une étude, réalisée sur 1954 souches de Staphylocoques a permis de définir 6 profils différents d'activité bactériolytique ou plus précisément lyogroupes, en utilisant des milieux différents.

Lors d'une épidémie à Serratia marcescens, 155 souches de la même espèce, ont été testées dont 88,4 % ont été subdivisées en 18 groupes différents (40) ; 92 % des souches d'un lot de 50 ont été subdivisées en 16 groupes (164).

Hilary et Adrews ont étudié la sensibilité et la production de bactériocines. Sur 176 souches d'Acinetobacter, 65 % sont typables par production de bactériocines en neuf modèles distincts (62).

La technique est assez délicate et demande de nombreux contrôles, mais elle peut dans certains cas servir pour une identification supplémentaire. Il en est ainsi pour les infections à Pseudomonas aeruginosa.

#### 2.2.5 Détermination des antibiotypes

Elle consiste à déterminer un profil de résistance aux antibiotiques, il s'agit d'un outil d'identification des souches bactériennes, largement utilisé dans les laboratoires de microbiologie.

Plusieurs cas de figure sont possibles :

- On est en présence d'une souche très sensible aux antibiotiques et la valeur discriminante de ce test n'est très bonne.

- On est en présence d'une souche présentant un profil de résistance classique :
  - Résistance aux bêta-lactamines de type pénicillinase de S. aureus.
  - Induction de la résistance aux macrolides par l'erytromycine chez les S. aureus.
  - Résistance hétérogène à la methicilline.

Là encore la valeur de l'antibiotype n'est pas très discriminante.

- Par contre, si on est en présence d'un type de résistance plasmidique particulier (résistance à la gentamicine) on dispose d'un marqueur épidémiologique intéressant.

L'antibiotypie est intéressante chez les Entérobactéries surtout avec les aminosides, en effet, la très grande variété d'enzymes codant pour la résistance permet d'observer des profils qui peuvent être considérés comme des marqueurs épidémiologiques.

Elle ne peut pas affirmer que les souches sont semblables, car ces dernières peuvent acquérir (27) ou perdre (133) un plasmide de résistance au cours d'une épidémie comme pour le cas de Klebsiella. l'identité présumée doit être recherchée par d'autres marqueurs (types antigéniques capsulaires, biotypes).

#### 2.2.6 Facteurs de virulence

Certains facteurs de virulence ont été utilisés avec succès comme la production de slime chez les staphylocoques. Elle est associée à des propriétés d'adhérence aux matières plastiques et peut être utilisée pour différencier pathogènes et contaminants, mais aussi comme marqueur épidémiologique (110).

#### 2.2.7 Morphologie des colonies

L'étude génétique des modifications phénotypiques des colonies est actuellement un des rares marqueurs disponibles pour Candida albicans et les espèces voisines (143).

## 2.3 MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES MOLECULAIRES

### 2.3.1 Profil de restriction de l'ADN total

#### 2.3.1.1 Enzymes de restriction

Les endonucléases de restriction sont des enzymes d'origine bactérienne ou fongique, qui ont la propriété de couper les molécules d'ADN double brin à des sites spécifiques. Il existe 400 enzymes parmi lesquels, une centaine est disponible dans le commerce.

Chaque enzyme reconnaît une séquence spécifique, souvent palindromique appelé site de restriction (126) Voici quelques exemples :

Enzyme	Séquence reconnue
- <u>EcoRI</u>	G↓AATTC CTTAA↑G
- <u>HindIII</u>	A↓AGCTT TTCGA↑A
- <u>BamHI</u>	G↓GATCC CCTAG↑G

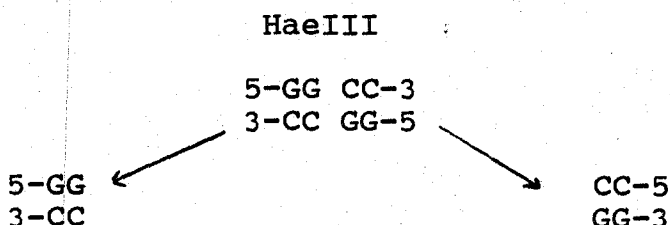
#### 2.3.1.2 Nomenclature des enzymes de restriction

En 1973, Smith et Nathans (138) ont proposé une nomenclature des endonucléases. Elle est constituée de trois lettres : la première désigne le nom de la bactérie à partir de laquelle l'endonucléase a été extraite ; les deux lettres suivantes correspondent au genre de la bactérie ; ces trois lettres sont suivies d'un chiffre romain qui représente le numéro d'ordre de découverte de l'enzyme.

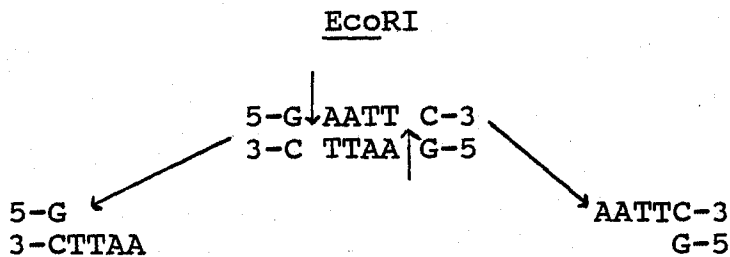
#### 2.3.1.3 Types de coupure

Il en existe deux :

- Coupure à bouts francs (blunt ends ou flush ends) l'enzyme exactement au même niveau sur les deux brins du DNA ; il ne peut donc pas y avoir d'association spontanée entre les fragments.



- Coupure à bouts cohésifs : ici les coupures sont décallées l'une par rapport à l'autre sur les deux brins. Après une coupure de ce type les parties simples brins complémentaires peuvent s'apparier.



La réalisation d'un profil de restriction de l'ADN total nécessite de disposer dans un premier temps d'un ADN suffisamment purifié pour être sensible à l'action des endonucléases.

La bactérie est d'abord lysée de manière à libérer son contenu, puis son ADN est extrait et purifié (voir technique). Le choix de l'enzyme sera guidé par la production d'une série de bandes les plus nettes possible et qui constitueront une véritable " empreinte " génétique de la souche bactérienne étudiée.

### 2.3.2 Détermination du profil plasmidique

On peut admettre que la bactérie possède deux types de génome. Le chromosome codant pour les constituants essentiels à la survie de la bactérie, et le plasmide, élément extra-chromosomique, de forme circulaire ; sa répllication est complètement indépendante de celle du chromosome bactérien. Une bactérie peut posséder un très grand nombre de copies (plusieurs centaines) ; ils sont transférables d'une bactérie à l'autre lors de la conjugaison ; leur taille est comprise entre 2 et 5000 kilobases (24,75, 113,118).

Un plasmide contient un certain nombre de gènes qui confèrent à la bactérie des propriétés non indispensables à la survie dans son environnement normal, mais qui néanmoins pourraient le devenir dans des conditions particulières citons les exemples suivants :

- fertilité (accouplement par conjugaison)
- résistance à différents antibiotiques, métaux lourds divalents (Hg<sup>++</sup>), activité bactéricide du sérum (couplement)
- production d'antibiotiques, bactériocines, toxines, hémolysines, néoplasies végétales.
- dégradation de différents sucres, solvants organiques (toluène), herbicides.
- fixation d'azote (plantes légumineuses) (86).

La plupart des espèces bactériennes, à Gram négatif ou positif semblent contenir des plasmides. Les souches sauvages isolées dans la nature, celles provenant du milieu hospitalier, peuvent en contenir en nombre variable et de différente taille. De plus, le

contenu plasmidique d'isolements effectués à différents moments et à différents endroits, mais dérivant d'un clone bactérien initial démontre souvent constance et stabilité.

En règle générale, on pourra parler de spécificité du contenu plasmidique pour une souche bactérienne donnée, dans un intervalle de temps déterminé et dans une région géographique délimitée. En d'autres termes le plasmidotype (plasmid fingerprinting) pourra être utilisé comme outil épidémiologique pour autant qu'il puisse être mis en évidence à la fois rapidement et simplement (114).

### 2.3.2.1 Exemples d'utilisation de la plasmidotypie.

Cette technique est utilisée dans le cadre hospitalier pour suivre une épidémie intra-hospitalière ou établir la réalité de l'épidémie survenant à des moments différents et qui sont toutes causées par une même souche bactérienne (41,70,95,135).

Parmi les nombreux travaux parus dans la littérature nous pouvons mentionner celui de Schaberg et al (136) : ces auteurs ont étudié plusieurs épidémies hospitalières, et ont montré que pour chacune d'elles, les isolements présentaient un même plasmidotype. En revanche les souches de la même espèce isolées simultanément, mais non reliées à l'épidémie en cours se caractérisent par un contenu plasmidique différent.

Dans un autre travail, Parisi et Hecht (109) ont révélé l'intérêt de la plasmidotypie pour étudier l'épidémiologie des infections nosocomiales à Staphylococcus epidermidis.

Cette technique a été utilisée dans plusieurs cas d'épidémies et d'infections de Salmonella et E. coli, et vis à vis des bactéries pour lesquelles il n'existe pas de système de typage : Enterobacter, Pseudomonas cepacia et Legionella pneumophila (70). C'est un outil épidémiologique efficace. Elle est reproductible puisqu'elle aboutit toujours au même résultat pour une même souche bactérienne.

Elle est simple et rapide, puisqu'à partir de cultures, six heures sont nécessaires pour obtenir les plasmides d'une vingtaine d'isolements. Elle est peu coûteuse, car elle nécessite peu de matériel de base : un équipement pour électrophorèse, une micro-centrifugeuse.

Certains inconvénients doivent être signaler :

- Absence de plasmide chez certaines espèces bactériennes
- Difficulté de la mise en évidence de certains plasmides de taille très élevée.
- La technique de lyse doit être adaptée selon l'espèce bactérienne.
- Le transfert du plasmide d'une bactérie à l'autre ce qui complique une enquête épidémiologique (41,51).

### 2.3.3 Détermination des profils protéiques

Elles sont parfois constituées de plusieurs polypeptides ce qui leur donne une structure complexe (25), la présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) ; ce détergent non ionique s'absorbe sur les protéines. Il semble qu'environ 1 g de SDS soit absorbé par gramme de protéine. On obtient ainsi une particule de type bâtonnet, dont la longueur ne dépend que du poids moléculaire (69,165).

#### 2.3.3.1 Séparation des protéines

Ce sont des molécules qui ont leur propre charge électrique et qui par conséquent migreront une fois placées dans un champ électrique. Il existe plusieurs techniques pour séparer les protéines, la plus utilisée est l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1964 par Ostein et Davis (31,106). La formation d'un gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation de l'acrylamide qui fournit des longues chaînes carbonées saturées et d'un monomère de liaison, le N-N méthylène-bis acrylamide, ce dernier porte quelques ponts méthylène interchaînes.

Les deux produits sont polymérisés en présence d'un catalyseur : le persulfate d'ammonium (ou parfois la riboflavine) en présence d'un oxydant N, N, N-tetra-méthyl-éthylènediamine (TEMED). L'addition de 2-mercaptoéthanol au milieu d'incubation réduit les ponts disulfures et on peut ainsi trouver le nombre de chaînes polypeptidiques composant la protéine.

Le gel peut être considéré comme un support poreux. La taille des pores est du même ordre de grandeur que la taille des molécules de protéines. Ainsi le gel jouera le rôle de tamis vis à vis d'un mélange de protéines : plus la taille de la protéine sera faible, plus sa vitesse de migration sera importante (31).

#### 2.3.3.2 Application de la technique

L'analyse des protéines en gel de polyacrylamide, prend un intérêt croissant en taxonomie bactérienne (67,73,147). Lorsqu'un milieu standardisé est utilisé pour la culture des bactéries, la composition d'une souche apparaît très constante. Il devient alors possible de comparer deux cultures bactériennes en comparant leur profils protéiques ou électrophorégramme. Cette méthode de taxonomie bactérienne est devenue très performante avec l'apparition de densitomètres qui effectuent une lecture automatique et parfaitement objective des profils protéiques. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de l'hybridation ADN/ADN (65, 66,67,75,145). Elle a été utilisée avec succès pour l'identification et le marquage de Clostridium difficile, Haemophilus influenzae et Staphylococcus aureus.

Dijkshoorn en 1987 a décrit une méthode d'électrophorèse qui montre une grande variété de modèles ne permettant pas actuellement de faire une classification absolue des souches d'Acinetobacter (33,34).



#### 2-3-4 Les sondes nucléiques

Les techniques diagnostiques par sondes nucléiques reposent sur le principe de l'hybridation, c'est à dire la capacité qu'ont deux brins d'acide nucléique complémentaires de s'associer de manière fort et très spécifique en un hybride ou duplex (ADN/ADN, ADN/ARN, ARN/ARN).

Les bases conceptuelles et expérimentales des techniques des sondes actuelles, prennent leur source dans les travaux fondamentaux de Marmur en 1963 (96) et de Gillespie et Spigel en 1965 (49), sur l'hybridation ADN/ADN ou ADN/ARN utilisant comme marqueur (signal) le phosphore radioactif P-32 (sondes chaudes).

L'intérêt de ces premiers travaux était restreint à des études fondamentales taxonomiques (97) : caractérisation des souches et détermination du degré de parenté. Ce n'est qu'en 1970 que furent entrevues les énormes potentialités des techniques d'hybridation par Kourilsky (79) qui propose les premières applications diagnostiques, avant même la publication par Moseley en 1980-81 du premier test diagnostic connu (détection E. coli) (101,102,103) et aussi les premières sondes froides (immuno-enzymatiques biotinylées par exemple).

Deux techniques importantes permettent de fabriquer les sondes : le clonage moléculaire est maintenant devenu une technique relativement facile ; les fragments d'ADN peuvent être synthétisés par réaction chimique en oligo-nucléotides pouvant également servir de sondes.

##### 2.3.4.1 Le clonage moléculaire

Il s'agit d'introduire in vitro, un fragment d'ADN dans un vecteur de clonage (plasmide, phage, cosmide) et ensuite de transformer dans une bactérie-hôte (E. coli) (50,63,94).

La multiplication à partir de la cellule unique, donne naissance à une colonie génétiquement homogène ou clone (descendance d'un seul individu).

Pour le transfert, des bactéries fraîchement cultivées en bouillon sont remises en suspension dans une solution de chlorure de calcium qui va fragiliser leur paroi. Les bactéries rendues perméables sont alors capables d'incorporer le plasmide vecteur de l'ADN recombinant c'est ce qu'on appelle la transformation (81,139,157).

La résistance aux antibiotiques du plasmide vecteur est mise à profit pour sélectionner les bactéries qui renferment l'ADN recombinant.

Prenons l'exemple du plasmide pBR 322 qui porte les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. L'ADN étranger est intégré après coupure par EcoR1 et BamH1. La coupure par BamH1 inactive le gène de résistance à la tétracycline. Lorsque l'ADN plasmidique et l'ADN étranger, sont soumis à l'action de l'ADN ligase, on recueille trois populations bactériennes : l'une renferme le plasmide recombinant, l'autre le plasmide initial et la dernière aucun plasmide (bactéries non transformées).

En étalant le mélange sur un milieu gélosé contenant l'ampicilline, on sélectionne les seuls clones bactériens résistants à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline c'est à dire hébergeant le plasmide pBR 322 (86).

D'autres plasmides ont été choisis pour réaliser le clonage, le pUC 18 et pUC 19, qui présentent les avantages suivants (158) :

- Ils possèdent un grand nombre de sites uniques dans la région polylinker. Et chaque fragment peut être inséré avec la T4 ligase.
- Les clones sont facilement détectés par transformation d'E.coli cultivée sur milieu contenant 5-bromo-4-chloro-bêta-galactosidase (x-gal) donnant des colonies bleues.
- Ils possèdent une petite taille donc facile à transférer chez E.coli en plusieurs copies.

Une fois les sondes sont préparées, des techniques de marquage radioactifs ont été proposées (84,148) (voir figure 1).

### 3.3.4.2 L'hybridation moléculaire

#### 3.3.4.2.1 Principe

Lorsque l'on porte une solution d'ADN bicaténaire à une température élevée (près de 100°C) les liaisons de faible énergie, se rompent ; la cohésion de la molécule d'ADN n'est plus assurée et les deux brins se séparent : c'est la dénaturation de l'ADN. Deux ADN dénaturés, d'origine différentes et mélangés dans des conditions appropriées ne pourront former des molécules hybrides que s'ils possèdent des séquences complémentaires.

Dans l'hybridation sur support solide : la sonde nucléique est en solution (préparée par clonage au hasard) et l'ADN cible est immobilisé sur un support ; généralement celui-ci est constitué de nitrate de cellulose ou de nylon en utilisant le transfert de Southern (72,141) (voir figure 2).

#### 2.3.4.2.2 Préhybridation

Elle doit toujours se faire avant l'hybridation. En effet l'ADN transféré n'a saturé qu'une faible portion des sites de fixation potentiels de la membrane. Si la sonde était apportée directement elle se fixerait immédiatement sur ces sites plutôt que s'hybrider avec les séquences complémentaires de l'ADN génomique.

#### 2.3.4.2.3 L'hybridation

Classiquement, elle s'effectue à 42°C durant une nuit (voir détails partie matériel et méthodes).

#### 2.3.4.2.4 Lavage des membranes

Cette étape particulièrement critique doit être conduite avec soin et d'une manière raisonnée. En effet la stabilité des hybrides dépend fortement de la composition du milieu qui conditionne la stringence.

Comme les solutions diluées destabilisent les hybrides on dit qu'elles sont très stringentes ; à l'inverse une solution très concentrée en sel sera dite faiblement stringente. Dans la pratique le lavage est progressif, la stringence étant augmentée au fur et à mesure des lavages successifs (72).

#### 2.3.4.3 Application de la technique d'hybridation

La première application de la technologie d'hybridation remonte à 1980 où des sondes spécifiques de gènes codant pour les toxines d'E. coli ont été développées (103) Cette technique s'est avérée d'une part très spécifique et reproductible et d'autre part beaucoup plus rapide que les réactions biologiques conventionnelles.

On a observé ces dernières années, une éclosion formidable du clonage de génomes de pathogènes et plusieurs de ces gènes clonés ont déjà servi ou serviront incessamment à détecter ces pathogènes. A titre d'exemple, des sondes ont été construites pour l'identification de Shigella et de E. coli entéro-invasifs, dans les selles d'enfants atteints de diarrhée aiguë (134) ; aussi pour le diagnostic de l'agent causal de la fièvre typhoïde à l'aide du gène de l'antigène de virulence de Salmonella typhi (129), la détection de Clamidia trachomatis (64) responsable d'infections génitales, pour la détection de Vibrio cholerae, de Corynebacterium diphtherie etc.

Des approches ont été utilisées pour la construction de sondes d'espèces spécifiques capables de détecter par exemple Legionella pneumophila (56) ; pour la numération de différentes espèces de Bacteroides (80,131).

Cette technique a permis également de différencier des souches de Salmonella enterica subesp. enterica serovar Dublin présentant des profils de restriction de plasmide identiques. Par ailleurs, elle a mis en évidence le caractère conservé du serovar enteritidis, suggérant une dissémination clonale (150).

La précision, la fiabilité et la qualité de l'information fournie par la détection des hybrides nucléiques, font de cette technique un outil moléculaire extrêmement puissant, probablement l'un des plus importants actuellement disponibles.

Du point de vue diagnostic les sondes nucléiques représentent le même enjeu que celui des anticorps monoclonaux au tout début de la découverte.

### 2.3.5 Mise en évidence des fragments de chromosome codant pour l'ARN ribosomal.

Les gènes codant pour les ARN 16 S et 23 S et t-RNA forment un opéron qui est présent en une ou plusieurs copies dans le chromosome bactérien. Le nombre de ces opérons et la localisation des copies par rapport aux sites de restriction diffèrent selon les espèces bactériennes, de sorte que les profils de restriction des gènes codant pour l'ARN ribosomal, apportent une information taxonomique utilisable pour l'identification. Lorsqu'à l'intérieur de certaines espèces des profils de restriction sont observés, ceux-ci constituent alors des marqueurs épidémiologiques intéressants.

Grimont en 1986 (54) a décrit une méthode universelle d'identification ou de typage basée sur l'utilisation d'une sonde constituée d'ARN (16 S + 23 S) d'E. coli, visualisant les profils de restriction des gènes codant pour l'ARN ribosomal.

Cette technique a été appliquée pour l'identification de Legionella. Deux endonucléases de restriction ont été choisies, lorsque l'ADN des diverses espèces était clivé par EcoRV, 2 à 5 bandes hybridant avec l'ARN ribosomal étaient visualisées. Le clivage des ADN par HindIII permettait de voir 2 à 10 bandes. Chaque espèce est caractérisée par un profil spécifique. Une détermination soigneuse de la taille des fragments hybridés permet d'identifier une souche inconnue de Legionella.

Picart-Pasquier a fait une étude sur l'ADN de 20 souches préalablement classées en zymotypes qui ont été hybridées avec la sonde ARN ; les souches sont classées en 5 classes de profils de restriction correspondant aux zymotypes. Ces données montrent que la classification basée sur le polymorphisme de l'ARN confirme celle établie par le polymorphisme des enzymes (52,112).

Pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la technique, Grimont a mis au point un test d'hybridation moléculaire non radioactif, utilisent l'acétoxy-acétyl-amino-fluorène (AAF) pour marquer l'ARN ribosomal. Après hybridation, le duplex ARNr/ADNr est détecté sur la membrane grâce à un anticorps monoclonal anti AAF et une technique enzymo-immunologique.

Les résultats obtenus montrent que l'ARN ribosomal d'E. coli marqué par AAF est un outil utilisable en taxonomie et en épidémiologie moléculaire quelque soit le groupe bactérien (98,148).

Altweeg a utilisé le plasmide PK 3535, dérivé du pBR 322 contenant un opéron ribosomal (ARNr), pour déterminer les modèles de restriction de l'ARN. Il permet de comparer les différentes souches, et les modèles obtenus sont identiques à ceux de l'hybridation avec l'ARN marqué par P 32 (3,23,142).

Dans le genre Serratia, on distingue parfaitement les biotypes de Serratia marscecens et de Serratia odorifera. Dans d'autres genres, tels que Brucella, la taille et le nombre de fragments codant pour l'ARN ribosomal sont constants et correspondent à des marqueurs de genre ou d'espèce (54).

### 2.3.6 Détermination des zymotypes

La mise en évidence d'enzymes extra-cellulaires (zymotypie) telles qu'estérases ou bêta-lactamases est un marqueur très reproductible, mais assez peu utilisé : l'électrophorèse bidimensionnelle des estérases a été appliquée à Yersinia et a permis de détecter des profils spécifiques de certains biotypes de Y. enterocolitica (53).

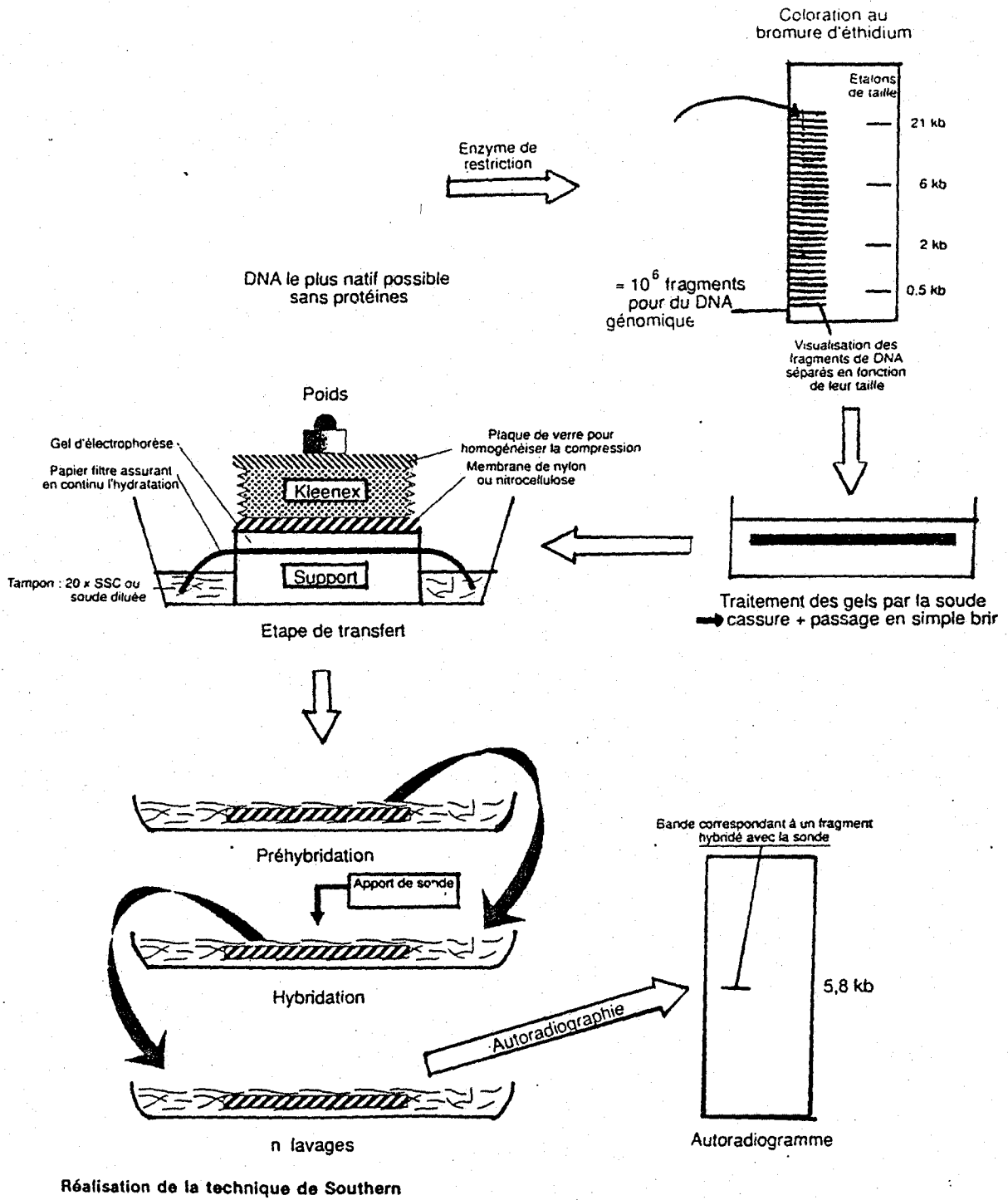
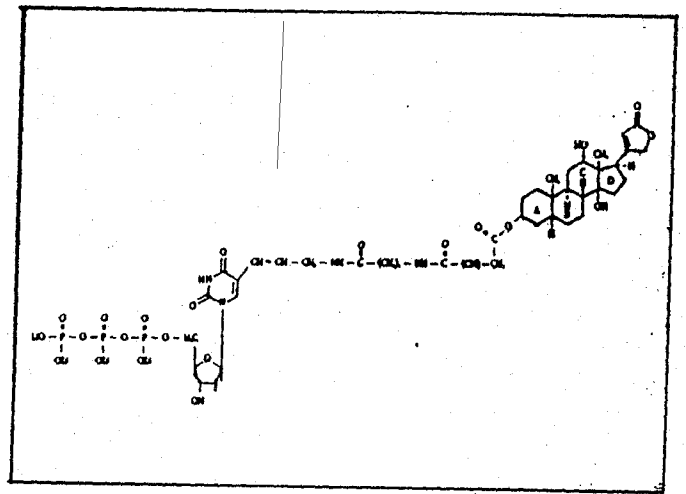
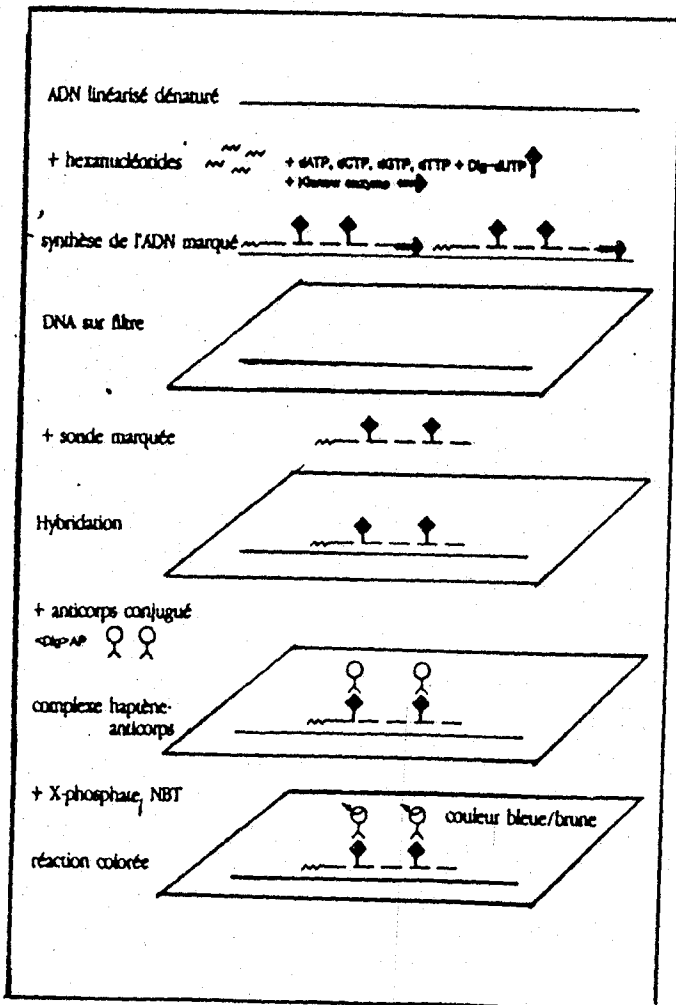


Figure (1) Réalisation du transfert de Southern

## PRINCIPE DE CETTE TECHNOLOGIE



dUTP-dig

Figure (2) Principe de la technique de multi-amorçage au hasard

### 3. TRAVAUX PERSONNELS

#### 3.1 Matériel et méthodes

Dans le cadre d'une enquête épidémiologique, au sein d'un environnement particulier, il est impératif de pouvoir comparer les micro-organismes isolés chez les malades et ceux de l'environnement. Pour y parvenir, il faut effectuer de nombreux prélèvements et comparer les résultats.

#### Souches des malades

Plusieurs prélèvements ont été effectués :  
peau et muqueuses : au niveau des aisselles, pli du coude, front, genou et pulpe des doigts.  
prélèvements biologiques divers : urines, sang, plaies, matériel médical (prothèse valvulaire, cathéter)

#### Technique de prélèvement

Peau et muqueuses : les prélèvements ont été effectués selon une des trois techniques suivantes :

- écouvillonnage de la peau et des muqueuses à l'aide d'un écouvillon en coton ou en alginate.
- les empreintes des doigts, elles ont été réalisées par application sur une gélose au sang de mouton de type Columbia enrichi de 5 % de sang de mouton.
- prélèvements cutanés à l'aide de l'appareil de Fleurette.  
Autres types de prélèvements : selon les techniques habituelles de prélèvements pathologiques.

#### Souches de l'environnement

Ce sont surtout les prélèvements de l'air, surfaces humides (robinets, siphons) et de surfaces sèches (sol, paille, tablette, de malades, téléphone).

#### Types de prélèvements

- Prélèvements d'air : nous avons utilisé un appareil collecteur à entonnoir à faible vitesse d'impact (Ochlogerne GV2) avec boîte de gélose au sang de mouton.
- Surfaces humides : par écouvillonnage.
- Surfaces sèches : par empreintes à l'aide de gélose Count-tact (Bio Merieux).

Les différents prélèvements sontensemencés dès leur arrivée au laboratoire et les milieux de cultures sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 h.

La première étape de notre travail consistait donc à recueillir



les souches épidémiologiques significatives, elle s'est déroulée de façon très active avec l'unité d'Hygiène Hospitalière du CHRU de Marseille. Plusieurs centaines de souches ont été ainsi recueillies dans les principaux services du groupe hospitalier. Toutes les souches ont été répertoriées et conservées congelées dans un soucier.

Dans un deuxième temps, après l'étude des souches recueillies et l'identification à l'espèce aussi précisément que possible, nous avons mis en oeuvre des techniques de marquage épidémiologiques traditionnelles telles que la biotypie, la sérotypie et la lysotypie. Puis nous avons développé des techniques de marquage moléculaire : profil plasmidique, profil protéique ...

Troisième temps : analyse des résultats, comparaison de différents systèmes de marquage et l'élaboration d'un véritable système d'identification.

Tableau (II)  
 Origine de prélèvement des souches de P. aeruginosa  
 (groupe O:12)

N° de souche	Laboratoire	origine de prélèvement
89481	H.E.H	hémoculture
89482	H.E.H	drain
89483	H.E.H	drain
89484	H.E.H	Trachée
89485	H.E.H	suppuration
89486	H.E.H	hémoculture
89487	H.E.H	hémoculture
89488	H.E.H	hémoculture
89489	H.Gabriel	urine
89490	H.Gabriel	pus de pied
89491	Hôtel-Dieu	sécrétion bronchique
89492	Hôtel-Dieu	urine
89493	Hôtel-dieu	méas urinaire
89494	Dekrousse	coproculture
89495	Institut Pasteur	
89496	Institut Pasteur	
89497	H.Gabriel	escarre sacrée
89498	H.Gabriel	oreille
89499	H.Gabriel	plaie
89500	H.Gabriel	crachat
89501	H.Gabriel	urine
89502	H.Gabriel	pistule testicule
89503	H.Gabriel	urine
89504	H.Gabriel	urine
89505	H.Gabriel	crachat
89506	H.Gabriel	crachat
89507	Lyon sud	urine
89508	Lyon sud	urine
89509	H.E.H	supuration
89510	Lyon sud	urine
89511	Lyon sud	urine
89512	Lyon sud	urine
89513	Lyon sud	escarre
89514	Lyon sud	crachat
89518	H.Gabriel	crachat
89519	H.Gabriel	urine
89520	H.Gabriel	urine
89521	H.Gabriel	urine
89522	H.Gabriel	urine
89523	H.Gabriel	crachat
89524	H.Gabriel	urine
89525	H.Gabriel	urine
89534	H.Gabriel	urine
89535	H.Gabriel	sacrum
89536	H.Gabriel	crachat
89537	H.E.H	hémoculture
89538	Lyon sud	urine
89565	H.E.H	hémoculture

Suite du tableau (II)

89582	H. Gabriel	urine
89672	Lyon sud	crachat
89673	Lyon sud	hématome abdominal
89695	H. Gabriel	urine
89696	H. Gabriel	cicatrice
50366	H. Salvator	urine
50383	H. Salvator	urine
50386	H. Salvator	urine
50387	H. Salvator	urine
50388	H. Salvator	urine
30600	H. Ste Marguerite	aspiration bronchique
30599	H. Ste Marguerite	aspiration bronchique
30976	H. Salvator	expectoration
30807	H. Salvator	expectoration
30846	H. Salvator	expectoration
30134	H. Salvator	expectoration
30352	H. Ste Marguerite	aspiration bronchique
30229	H. Ste Marguerite	aspiration bronchique
30062	H. Salvator	expectoration
30009	H. Salvator	expectoration
30934	H. Salvator	expectoration
30900	H. Salvator	expectoration
30026	H. Salvator	expectoration
30061	H. Salvator	expectoration
30060	H. Ste Marguerite	aspiration bronchique
10342	H. Ste Marguerite	cutané
10379	H. Ste Marguerite	produit pathologique
10446	H. Salvator	drain
10773	H. Salvator	cutané
10778	H. Salvator	aspiration bronchique
20069	H. Ste Marguerite	cyto bactériologie urinaire
20081	H. Ste Marguerite	produit pathologique
80000	Belgique	produit pathologique
80001	Belgique	produit pathologique
80002	Belgique	produit pathologique
80003	Belgique	produit pathologique
80004	Belgique	produit pathologique
80005	Belgique	produit pathologique
80006	Belgique	produit pathologique
80007	Belgique	produit pathologique
80008	Belgique	produit pathologique
80009	Belgique	produit pathologique
80010	Belgique	environnement hospitalier
80011	Belgique	environnement hospitalier
80012	Belgique	environnement hospitalier
80014	Belgique	environnement hospitalier
80015	Belgique	environnement hospitalier
80017	H. Salvator	produit pathologique
80018	Belgique	hémoculture
80019	Belgique	aspiration trachéale

### 3.1.1 La biotypie

#### 3.1.1.1 Biotypie de Klebsiella

Les tests utiles au biotypage de Klebsiella sont les suivants :

- recherche d'uréase et indole.
- utilisation des sucres :
  - sorbose
  - dulcitol
  - rhamnose
  - adonitol
- utilisation du malonate
- utilisation du D-tartrate
- utilisation du mucate
- croissance et production de gaz en milieu BLVB-T à 44°C.

On pratiquera comme suit : faire une suspension très dense en eau physiologique (3 oses /10 ml environ) à partir d'une culture (24 ou 48 h) sur un tube de gélose incliné (gélose ordinaire ou trypticase soja).

#### 3.1.1.1.1 Recherche d'uréase et indole

- Prélever les colonies sur milieu trypticase soja, sur Kligler-Hajna-Rolland ou sur Worfel-Ferguson, ces deux derniers milieux favorisent la synthèse d'uréase.
- lire après 24 à 48 h d'incubation à 37°C ; répartir en deux parties aliquotes ou lire successivement dans cet ordre :
- uréase positive si couleur fuschia (il y a alcalinisation).
- uréase négative si couleur jaune (si jaune citron l'indole sera négatif).
- Indole : ajouter quelques gouttes de réactif de Kovacs ; s'il y a un anneau rouge en surface la réaction est positive (122).

#### 3.1.1.1.2 Utilisation des sucres

##### - Préparation des solutions

Pour 80 ml de solution prête à l'emploi (19 tests il faut ajouter, 0,95 ml de bleu de bromothymol, 8 ml de sucre à 10 %, 71,05 ml d'eau peptonée et ajuster le pH à 7,5 avec la soude 10 N.

##### - Technique

A partir d'une suspension bactérienne de 24 ou 48 h,ensemencer

les milieux préalablement préparés avec 4 à 5 gouttes et incubé ensuite à 37°C.

- Lecture

L'utilisation des sucres (sorbitol, dulcitol, rhamnose, adonitol) entraîne l'acidification du milieu et par conséquent le virage du bleu au jaune (si doute passer au vortex et regarder la couleur).

3.1.1.1.3 Utilisation du malonate

Mettre 2 à 3 ml de malonate dans un tube (22 mm de diamètre). Ensemencer avec 3 à 5 gouttes de la suspension bactérienne en eau physiologique. Passer au Vortex légèrement. Incuber à 37°C, lire après 24 à 48 h.

La lecture se fait comme suit :

bleu : réaction positive  
vert, bleu-vert : réaction négative.

3.1.1.1.4 Utilisation du D-tartrate

Utiliser de D-tartrate dilué à 1 % en eau peptonée (plus bleu de bromothymol) : 4 à 5 ml par tube. Ensemencer avec 4 à 5 gouttes de la suspension bactérienne en eau physiologique. Passer au Vortex légèrement ; incubé à 37°C ; lire au bout de 2 à 3 jours (on peut ensemencer 3 tubes et lire à J1, J2, J3).

Pour la lecture : on ajoute 0,5 ml d'acétate de plomb par tube. On laisse reposer 10 mn sur la paillasse.

3.1.1.1.5 Utilisation de mucate

Comme pour les sucres : déposer 4 à 5 ml de la solution de mucate (1 % de mucate en eau peptonée + bleu de bromothymol) par tube. Ensemencer avec 4 à 5 gouttes de la suspension bactérienne en eau physiologique.

Incuber à 37°C, lire au bout de 24 h (48 h si nécessaire). Lecture comme pour un sucre :

couleur jaune : réaction positive  
couleur bleue : réaction négative.

3.1.1.1.6 Croissance et production de gaz en BLVB-à 44°C

Utiliser le milieu BLVB en poudre (Diagostics pasteur codes 64056, 64057 ou 64058) ; ce milieu est composé de peptone, bile de boeuf, lactose vert brillant, on peut ajouter du L-tryptophane (milieu BLVB-T), en vue de la recherche d'indole à une température de 44°C (test de Mackensie) (115).

Formule du milieu BLVB-T :

L-tryptophane pur	3 g
BLVB déhydraté	40 g
eau distillée	1 litre

Dissoudre par agitation à une température ne dépassant pas 50°C. Stériliser par filtration (membrane millipore) ou autoclaver à 110-115°C pendant 30 mn. Répartir à raison de 10 ml dans des tubes à vis, 17 x 170 mm contenant une cloche en verre de Durham (Diagnostic Pasteur. 6-7 x 45 mm).

Ensemencer le milieu avec 7 gouttes d'une suspension bactérienne. Si nécessaire, chasser l'air de la cloche par retournement brusque.

Incuber à 44°C au bain-marie.

Lecture : examiner la croissance et la production de gaz sous cloche au bout de 24/48 h. On peut peut rechercher la présence d'indole en ajoutant du réactif de Kovacs.

La détermination des biotypes est réaliser à l'aide du tableau de C. RICHARD.

Tableau (III)

Schéma et distribution des biotypes de "Klebsiella"

Biotypes	a	b	c	d	Da	Db	Dc	Dd
Dulcitol	-	-	-	-	+	+	+	+
Sorbose	-	-	+	+	-	-	+	+
D-tartrate	+	-	+	-	+	-	+	-

E. aerogenes = biotype a, b, Da, Db.  
K. pneumoniae = tous les biotypes.  
K. oxytoca = biotype c, d, Dc, Dd.  
K. ozaenae = biotype a, b, c, d.  
K. rhinoscle-  
romatis = biotype b.

Chez K. pneumoniae, les caractères mucate, uréase et malonate permettent de compléter la détermination des biotypes.

Pour K. oxydoca il est intéressant de rechercher la tétrathionate réductase (présente dans 1/3 des cas).

Les K. ozaenae de type capsulaire 22 appartiennent toujours au biotype, les K. rhinoscleromatis toujours au biotype b.

### 3.1.1.2 Biotypie d'Acinetobacter baumanii

La technique utilisée est celle de Bouvet et Grimont (19).

Le désouchage est effectué selon la technique habituelle.

#### 3.1.1.2.1 Identification

A partir d'une colonie isolée, identifier l'espèce A.baumanii.

Faire une galerie API NE (152) Comparer les caractères au tableau (IV).

Test de croissance à 44°C : inoculer 1 ou de colonie isolées d'Acinetobacter dans un bouillon tryptocase-soja, faire la lecture de la croissance (se traduit par un trouble du milieu de lecture) après 24 à 48 h d'incubation. Si la souche se développe à cette température il s'agit Acinetobacter baumanii.

#### 3.1.1.2.2 Etude des sources de carbone

La technique est basée sur la croissance en milieu minimum. 5 substrats sont utilisés comme sources de carbone :

- lévulinate
- citraconate
- L-phénylalanine
- 4 hydroxy-benzoate
- L-tartrate

Deux techniques peuvent être utilisées :

#### - Technique en tube

Répartir les milieux contenant les sources de carbone, dans des tubes à hémolyse à raison de 2,5 ml par tube puis inoculer avec une suspension bactérienne ajustée à 1,5 sur l'échelle de Mac Farland à raison de 100 µl (4 gouttes) de suspension. Incuber à 37°C.

Faire la lecture de la croissance après 24 h, puis 48 h d'incubation. Noter et comparer les résultats au tableau (V) de manière à déterminer le biotype.

#### - Technique utilisant des galeries d'identification

Utilisation de la galerie API 50 AA et 50 AO.

- Répartir dans 5 tubes 10 ml de milieu minimum conservé à 4°C, dont la composition et la suivante :

bacto yeast (Difco)	6,7 g
agar noble (Difco)	1,5 g
tampon Sorensen M	q.s.p 1000 ml

- Dans un tube, réaliser une suspension bactérienne avec 3 à 4 colonies puis ensemercer les galeries.

API 50 AO : cupule 30 : L-tartrate  
 " 33 : lévulinate  
 " 35 : citraconate  
 " 44 : 4- hydroxy-benzoate

API 50 AA : cupule 14 : L-phényalanine

Les galeries sont incubées à 30°C. La lecture se fait après 48 h.

Tableau (IV)

Identification des 6 principales espèces à partir des caractères de galeries API NE

Espèces	calco aceticus	lwoffii	baumanii	haemolyticus	junii	johnsonii
Glucose	+	d	+	d	-	-
Gelatine	-	-	-	+	-	-
Malate	-	d	+	+	+	d
Citrate	+	-	+	+	d	+
phenyl-acetate	+	+	d	-	-	-

+ : 90 à 100 % (+)  
 d : 11 à 89 % (+)  
 - : 0 à 10 % (+)

La détermination de différents biotypes d'Acinetobacter baumanii se fait selon le tableau (V), établie par Bouvet et Grimont.



Tableau (V)  
 Biotypes d'Acinetobacter baumanii

Substrats Biotypes	Levuliniate	Citraconate	L-phenylalanine	4-oH benzoate	L-tartrate
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	-	-
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	+	+
6	-	-	+	+	-
7	-	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+
9	-	-	+	+	-
10	-	-	+	-	-
11	-	-	-	+	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	+	-
14	+	+	-	+	-
15	-	-	+	-	+
16	+	+	+	+	+
17	+	+	-	-	+

+ : pousse en deux jours  
 - : absence de pousse en deux jours

### 3.1.1.3 Biotypie d'Enterobacter cloacae

#### 3.1.1.3.1 Milieux nécessaires

- Galeries API 20 E
- Tubes de 10 ml d'eau peptonée + bleu de bromothymol.
- Tubes de 10 ml bouillon au malonate (Difco 0395-02)
- Bouillon trypticase-soja
- Disques pour la recherche de la bêta-xylosidase.

#### Préparation de la solution substrat

- Dissoudre 200 mg de paranitro bêta-xylopyranoside (PNXP), dans 10 ml d'eau pour préparation injectable. Agiter pour dissoudre. Chauffer si nécessaire sans dépasser 40°C. Filtrer (Millex 0,22  $\mu$ ).

#### Préparation des disques

- Stériliser les disques vierges.
- Déposer les disques stériles sur une gaze tendue sur une boîte de Pétri.
- Humecter chacun des disques avec 2 x 20  $\mu$ l de la solution substrat, respecter 5 min de délai entre chacun des deux dépôts sur le même disque.
- Les disques sont mis à sécher à 37°C pendant 4 à 6 h, puis conservés à 4°C dans des flacons stériles en présence d'un desséchant.
- Mucate (Sigma M 2253).
- Alpha- méthyl glucoxyranoside.
- Glycérol pour usage bactériologique (Difco 0282-17)
- Disques pour étude des fermentations d'hydrates de carbone :
  - Adonitol (Difco 1600-33-3)
  - Lactose (Difco 1607-33-6)
  - Rhamnose (Difco 1614-33-7)
  - Dulcitol (Difco 1603-33-0)
  - Salicine (Difco 1615-33-6)
  - Saccharose (Difco 1617-33-4)

#### Technique

- A partir d'une colonie bien isolée sur milieu de Mueller-Hinton ou BCP, faire une galerie API 20 E, lire la galerie et noter le profil.

Doc 570-19/01

B/158

DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE DE PROVENCE  
MENTION SCIENCES  
(CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT ET SANTE)

Houria BOUCHEMAL

D30

**MARQUEURS MOLECULAIRES  
DES BACTERIES RESPONSABLES  
D'INFECTIONS NOSOCOMIALES**

Soutenu le 27 juin 1990 devant la commission

- Pr. J. REY
- Pr. Ph. DE MICO
- Pr. J. FRENEY
- Pr. Y. PELOUX
- Pr. C. ROUSSET
- Dr. L. GARDAN
- Dr. C. BOLLET

### 3.1.1.3.2 Recherche de bêta-xylosidase

- Répartir 0,5 ml d'eau distillée stérile en tube à hémolyse, faire une suspension dense (blanche) à partir de la boîte d'isolement (22).
- Ajouter dans chaque tube un disque imprégné de paranitro-bêta-xlylopyranoside (PNXP).
- Incuber à 37°C et lire :
  - 1 h apparition d'une coloration jaune franc
  - 3 h
  - 6 h
  - 18-24 h une légère teinte jaune de la suspension doit être considérée comme positive

### 3.1.1.3.3 Etude de la fermentation des sucres

- Répartir un disque du sucre à étudier dans l'eau peptonée contenant le de bromothymol.
- Ajouter aseptiquement 3 gouttes de glycérol filtré (filtre millex 0,22 µ) à l'aide d'une seringue.

Dissoudre 1 g de glycopyranoside dans 10 ml d'eau stérile. Ajouter 1 ml de cette solution après filtration (la concentration finale est donc de 1 %).

- Le mucate est faiblement soluble. Dissoudre 1 g d'acide mucique, dissoudre dans 10 ml de NaOH 2 M. Ajuster le pH à 6,4 (avec HCl). Si une reprecipitation apparaisse, chauffer à la flamme du bec bunsen (sans porter à ébullition) ajouter alors la suspension obtenue encore chaude à raison de 1 ml par tube d'eau peptonée contenant bleu de bromothymol.
- Faire une suspension dans l'eau stérile des souches à biotyper (10 ml). Inoculer les tubes préparés à raison de 1 ml de la suspension.
- Lire les tubes ensemencés, au bout de 24 h et 48 h.
- Interprétation : relever les résultats dans l'ordre qui suit et coder conformément au code octal ou les digits binaires sont séparés par groupe de trois à partir de la gauche et ou les poids 1,2,4 sont attribués aux digits binaires de chaque groupe (124).

Adonitol	1
Lactose	2
ONPG ( API )	4
Mucate	1
Malonate	2
B. Xylosidase	4
Rhamnose	1
Dulcitol	2
Salicine	4
Saccharose	1
CH3-glucoside	2
Glycérol	4
Gélatinase	1
ODC (API)	2
ADH (API)	4

### 3.1.1.4 Biotypie de Serratia marcescens

Elle est basée sur le système proposé par Grimont (57), système conçu à la suite d'une étude de taxonomie numérique du genre Serratia.

#### 3.1.1.1 Milieux nécessaires

- Galeries API 20 E.
- Eau peptonée + rouge de phénol + arabinose (1 ml d'une solution à 10 %).
- Eau peptonée + rouge de phénol + D-xylose (1 ml d'une solution à 10 %).
- Gélose pour recherche de DNase.
- Bouillon nutritif.
- Milieu minimum A et B :

#### - solution A

Faire dissoudre dans 980 ml d'eau distillée et dans l'ordre :

chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	30 mg
sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	246 mg
phosphate monopotassique (K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1360 mg
phosphate dipotassique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5220 mg
solution métaux 70	20 ml

Compléter à un litre, ajuster le pH à 7,2 et autoclaver 20 mn à 105°C.

#### - Solution B

Faire dissoudre dans un litre d'eau distillée

chlorure de sodium (NaCl)	14 g
sulfate d'ammonium (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2 g

Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH 1 N. Ajouter et faire dissoudre 30 g d'agar purifiée et autoclaver à 120°C pendant 20 mn.

#### - Solution métaux 70

Eau distillée	1000 ml
Acide phosphorique (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	1960 mg
sulfate ferreux (FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	55,6 mg
sulfate de zinc	28,7 mg

(ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O)	
sulfate de manganese	22,3 mg
(MnSO <sub>4</sub> ,4H <sub>2</sub> O)	
sulfate cuivreux	
(CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O)	2,5 mg
nitrate de cobalt	3 mg
(Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O)	
acide borique	6,2 mg
(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	

Cette solution est stockée à 4°C.

#### - Technique

Réaliser une galerie API 20 E (étude de la fermentation d'arabinose et xylose).

##### 3.1.1.4.2 Recherche de DNase :

Prélever une colonie sur milieu de Mueller-Hinton et ensemercer en rayon ou en spot. Le témoin positif est nécessaire. Incuber ensuite pendant 24 h à 37°C.

Lecture : recouvrir la boîte de HCl 1 N lecture au bout de 5 mn lire.

halo translucide : réaction positif  
absence d'halo : réaction négatif

Le reste de la gélose est opaque.

##### 3.1.1.4.3 Recherche de la tétrathionate réductase (TTR)

###### composition du milieu

tétrathionate de potassium	5 g
(K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> )	
solution de bromothymol	25 ml
eau peptonée pH 7	1 l

Stériliser par filtration (filtre millipore 0,45 µ).

- Dans un tube à hémolyse stérile contenant 1 ml du milieu TTR, ensemercer avec une colonie prélevée sur milieu de Mueller-Hinton, incuber 24 h à 37°C (penser à faire un témoin négatif et un témoin positif).

Lecture : le témoin négatif reste bleu réaction positive s'il y a virage au jaune (123).

#### 3.1.1.4.4 Etude de l'utilisation des sucres

##### Milieu

- Faire dissoudre la solution B
- Peser les différents sucres (source de carbone)

Mesoérythritol	200 mg
Trigonelline	200 mg
Acide hydroxy-4-benzoïque	200 mg
Acide hydroxy-3-benzoïque	200 mg
Benzoate	200 mg
D-L carnitine	200 mg
Lactose	400 mg

- Dissoudre chacun des sucres dans 5 ml d'eau, en plaçant au bain-marie.
- Ajouter les sucres dans la solution A après filtration.
  - De manière aseptique, mélanger :
    - 100 ml de solution B
    - 100 ml de solution A additionnée de la source de carbone étudiée.
- Répartir en boîtes de Pétri et conserver à 4°C.

##### Méthode

- Faire un témoin positif et un témoin négatif
- Dépot de 20  $\mu$ l de bouillon (ensemencé la veille et incubé à 30°C). Lire ensuite au bout de 3 jours puis tous les jours jusqu'à une semaine.

##### Remarque

En cas de lecture douteuse, prélever la souche sur le milieu contenant le sucre à étudier, réaliser une suspension dense dans de l'eau stérile. Inoculer une nouvelle boîte de milieu minimum contenant le sucre à étudier. Les résultats seront lus dans la semaine qui suit.

#### 3.1.2 La sérotypie

##### 3.1.2.1 Sérotypie des Staphylocoques dépourvus de coagulase

La technique que nous avons utilisée est celle décrite par Pillet et Orta (116). Les tests sont réalisés par agglutination sur lame des micro-organismes en contact avec les immun-sérums absorbés spécifiques.

Nous disposons d'immun-sérums spécifiques permettant la caractérisation des espèces : S. saprophyticus, S. cohnii, S. xylosum, S. hominis, S. warneri, S. haemolyticus, S. simulans, S. capitis, S. epidermidis, S. sciuri, S. hyicus.

Nous disposons également de deux immun-sérums absorbés permettant la caractérisation de deux sérotypes : serums 52260 et 52186.

#### - Technique

A partir d'une colonie bien isolée, ensemencer 10 ml de milieu de culture pour la sérotypie (commercialisé par Diagnostics Pasteur) incubé à 37°C pendant 16 à 18 h. La culture est ensuite centrifugée et le culot remis en suspension dans 1 ml de milieu de culture stérile et formolé à 50 % (vol/vol).

L'addition de formol au milieu, entraîne une légère acidification qui n'est complète qu'après 24 à 48 h, il est important de vérifier le pH du milieu formolé et de le ramener à la neutralité s'il y a lieu.

#### - Agglutination :

La réaction s'effectue à l'aide d'un agitateur de Kline. Déposer sur les plaques de celui-ci une goutte de chacun des sérums absorbés. Ajouter une goutte de l'émulsion de la souche à typer. Agiter environ 15 mn, et effectuer la lecture.

#### 3.1.2.2 Sérotypage de pyocyanique

Le classement en groupe 0 des souches de bacille Pyocyanique a fait l'objet de nombreux travaux. Nous avons adopté cette classification établie par Habs et complétée par le sous-comité international de sérotypie de Pseudomonas (60).

#### - Sérums-mélanges

Pour faciliter le typage, 4 mélanges de sérums sont préparés et leur composition est la suivante :

PMA = P1 + P3 + P4 + P6  
PMC = P9 + P10 + P13 + P14  
PME = P2 + P5 + P15 + P16  
PMF = P7 + P8 + P11 + P12

#### - Sérums monovalents

16 sérums mono-valents numérotés de 1 à 16 sont disponibles. Il existe de fortes réactions croisées entre les groupes 0:2 et 0:5 d'une part, et entre les groupes 0:7 et 0:8 d'autre part, ainsi qu'entre les groupes 0:13 et 0:14.

Les sérums mono-valents correspondant à ces groupes sont absorbés en conséquence.



#### - Méthode

Elle repose sur l'agglutination d'une suspension bactérienne vivante avec un sérum anti-O.

- Rechercher d'abord l'agglutination dans les quatre sérums mélanges, puis dans les quatre sérums spécifiques correspondant au mélange donnant une agglutination nette.

Prélever les bactéries à la surface d'une gélose assez sèche cultivée à 37°C depuis 16 à 18 h.

- Mettre les bactéries en suspension dans une goutte de chaque sérum-mélange déposée sur une lame, en ayant soin de faire une suspension très homogène, par adjonction progressive du sérum avec une pipette Pasteur.

L'agglutination O apparaît en quelques minutes, elle est fine et régulière et se distingue très facilement de fragments de colonie bactérienne mal émulsionnés éventuellement présents.

- Rechercher ensuite l'agglutination avec les sérums spécifiques
- En cas d'échecs (par exemple avec les souches produisant beaucoup d'antigènes muqueux) il est conseillé d'effectuer une suspension très épaisse en eau distillée des colonies prélevées sur gélose, de chauffer cette suspension à 120°C pendant 30 mn (autoclave). Cette suspension est centrifugée, le surnageant est écarté, et les agglutinations sont à nouveau recherchées à partir du culot bactérien (159).

#### 3.1.3. Lysotypie des staphylocoques dépourvus de coagulase

La technique utilisée au laboratoire est celle préconisée par le Centre International de références (Public Health Laboratory of Londres).

##### 3.1.3.1 Bactériophages et leur titrage

Le lot utilisé comprend 20 phages avec chacun sa souche propagatrice qui porte le même nom et le même numéro que le phage.

La suspension bactériophagique est diluée en bouillon Oxoid N°2 de 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-6</sup> en utilisant à chaque fois une pipette stérile. Chaque phage est titré sur sa souche de référence afin de déterminer la dilution de routine (RTD) c'est à dire la plus grande dilution phagique donnant une lyse subtotale sur la souche de référence.

Les souches bactériennes sont cultivées en bouillon jusqu'à la phase exponentielle de croissance, puis elles sont cultivées pour inonder les boîtes de Pétri contenant la gélose Oxoid N°2 (bouillon nutritif N°2 20 g, agar bactériologique 7 g, NaCl 5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,4 µg/ml pH 7.) séchage à l'étuve. Les dilutions phagiques sont déposées à la surface à l'aide d'un multi-inoculateur (Denley).

Pour être utilisable, la suspension doit donner au moins six

plages avec 20  $\mu$ l de la dilution 10<sup>-6</sup>. Dans le cas contraire, on procède à un enrichissement dont il existe deux techniques.

#### 3.1.3.1.1 Enrichissement en milieu solide

Nous utilisons la technique de Williams et Ripon (congélation-décongélation) (167).

- A partir d'un bouillon de 18 heures de la souche propagatrice, inonder une boîte de gélose, aspirer l'excès et faire sécher 20 à 30 mn à 37°C.
- Déposer en spot les phages purs.
- Attendre que les spots soient secs, incuber les boîtes ensuite à 37°C pendant 24 heures.
- Mettre les boîtes au congélateur pendant 24 heures.
- Décongeler les boîtes en grattant toute la surface de la gélose. Le lysat obtenu est centrifugé deux fois à 3500 tr/mn pendant 15 mn. Le surnageant sera titré ensuite comme décrit ci-dessus.

#### 3.1.3.1.2 Enrichissement en milieu liquide

- Les souches propagatrices sont cultivées pendant 18 heures, à partir du bouillon faire une dilution au 1/10, est mise en agitation à 37°C.
- Après une heure d'agitation, ajouter 50  $\mu$ l de la solution phagique (pour les phages ayant un titre moyen) et 500  $\mu$ l (pour les phages ayant un titre faible).
- Une préparation témoin ne contenant pas de phages permettra de vérifier la précocité et l'importance de la lyse dans le tube à essai.

#### 3.1.3.2 Lysotypie proprement dite

Pratiquer la lysotypie sur une culture pure provenant d'une colonie bien isolée, pour éviter une co-infection. Chaque souche est réisolée sur gélose nutritive, une colonie est ensemencée dans un bouillon Oxoid N°2. Les cultures sont incubées à 37°C 4-6 heures jusqu'à ce qu'un début de croissance soit visible. Les boîtes sont inondées, séchées à l'étuve 30-45 mn. Les phages à la dilution de routine sont appliqués à la surface des géloses à l'aide d'un multi-inoculateur.

#### 3.1.3.3 Lecture des résultats

Après incubation 18 heures à 30°C, la lecture se fait boîte ouverte, par transparence en utilisant un éclairage artificiel. Une loupe peut être utilisée pour distinguer les petites plages de lyse. On peut examiner les boîtes sur un fond noir. Certaines souches sont insensibles aux bactériophages ç la dilution de routine ou donnent des réactions lytiques faibles. Elles sont

Elles sont alors testées par des suspensions phagiques plus concentrées ; nous avons utilisé des concentrations de 100 et 1000 RTD.

#### 3.1.3.4 Notation des résultats

Les degrés de lyse sont notés comme suit :

- ++++ : lyse totale avec ou sans culture secondaire
- +++ : lyse subtotale ou semi-confluence
- ++ : 50-100 plages
- + - : moins de 50 plages

Toutes les réactions lytiques de plus de 50 plages sont considérées comme des réactions fortes, les moindres degrés de lyse comme réactions faibles.

Les résultats de la lysotypie d'une souche mentionnent la liste des phages donnant sur cette souche toutes les réactions fortes. Si des réactions faibles sont observées, nous l'indiquons par le signe (+) placé après la liste des lyses significatives.

#### 3.1.4 L'antibiotypie

Détermination de la sensibilité des souches aux différentes substances antibiotiques. Nous avons utilisé la technique de diffusion sur gélose.

- Préparation d'une culture en phase exponentielle de croissance de la bactérie à étudier à partir d'une colonie sur une gélose nutritive. Une ou deux colonies identiques sont placées dans 10 ml de bouillon nutritif ou d'eau distillée stérile.
- Inondation en nappe de gélose Mueller-Hinton par les suspensions de bactéries à étudier.
- Les disques sont distribués au moyen d'un dispositif spécial (Push Down Firmley).
- Chaque boîte est ensuite placée à l'étuve à 37°C pendant une nuit.

#### Lecture des résultats

Elle correspond à la lecture du diamètre moyen d'inhibition autour du disque grâce à un pied à coulisse calibré. Les mesures des différents diamètres sont enregistrées manuellement.

L'interprétation est effectuée automatiquement par l'appareil, dans lequel sont enregistrés les différents diamètres moyens pour l'ensemble des antibiotiques testés.

#### Interprétation

Les souches sont rendues sensibles (S), résistantes (R), ou intermédiaires (I) en comparant le diamètre d'inhibition de chaque antibiotique avec le diamètre critique déterminé par le comité national de l'antibiogramme.

### 3.1.5 Extraction de l'ADN chromosomique

Cette technique appliquée aux bactéries à Gram négatif, doit être adaptée pour chaque groupe bactérien.

#### 3.1.5.1 Culture

Ensemencer 150 ml de gélose ordinaire (ou trypticase soja agar) avec un bouillon (20 ml) de 18 heures. Incuber 1 à 2 jours à 37°C (jusqu'à la phase stationnaire). Les cultures sur gélose sont décollées et récupérées à l'aide de billes de verre en tampon TEK (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,01 M pH 8). Le bouillon est centrifugé à 4000 tr/mn, 15 mn puis repris dans le même tampon .

#### 3.1.5.2 Lyse

Après action du lysozyme (sigma ref. L6876) à 1% pendant 30 mn à 37°C, les cultures sont lysées par addition de SDS (dodecyl sulfate de sodium-Sigma réf. L5750) à 10 % et de pronase self-digest à 1 % (Calbiochem, réf. 53702). Cette dernière réduit les contaminations par les protéines. L'incubation est poursuivie heure à 60 °C.

#### 3.1.5.3 Déprotéinisation

Ajouter le TEK-phénol-chloroforme (24/24/1) 0,8 % l'alcool isoamylique, homogénéiser, jusqu'à obtention d'une phase laiteuse. Centrifuger à 4000 tr/mn, 15 mn. Récupérer le surnageant, en éliminant la partie inférieure et l'interface qui contient les protéines .

#### 3.1.5.4 Précipitation de l'ADN

Ajouter 3 ml de NaCl 1M. Précipiter avec l'alcool absolu froid (-20°C) (2 volumes d'alcool /1 volume de surnageant). Utiliser une pipette pasteur pour enrouler l'ADN éliminer le plus possible l'alcool de l'ADN, et le mettre dans un autre tube. Ajouter du tampon TEK selon la quantité d'ADN (10 à 100 ml). Laisser dissoudre une nuit dans un bain-marie à 37°C en ajoutant de l'ARNase à 0, 2 % (sigma. réf. R4875).

L'ADN peut être conservé ainsi plus d'un an à 4°C et il est préférable de ne pas le congeler, car la prise en glace et la décongélation provoquent des contraintes mécaniques qui se traduisent par de nombreuses cassures de la molécule.

#### 3.1.5.5 Purification de l'ADN

##### - Dialyse sur filtre, la plus utilisée

- Dans le fond d'une boîte de Pétri, verser environ 30 ml de tampon contre lequel on veut dialyser ; on peut utiliser de l'eau distillée stérile.

- A l'aide d'une pince, déposer un filtre VS de millipore (0,025  $\mu\text{m}$ ) et déposer en le faisant flotter sur le tampon, la face brillante du filtre doit être vers le haut. Attendre 1 mn pour que le filtre s'imbibe.
- Au centre du filtre, déposer l'échantillon à l'aide d'une micro-pipette. Il est possible de déposer de 2 à 100  $\mu\text{l}$ .
- Dialyser 1 heure 30 mn à 2 heures (maximum) à la température du laboratoire.
- L'échantillon est récupéré à l'aide d'une micro-pipette.

#### - Dialyse en sacs

- préparer un sac à dialyse :

mettre les gants, prendre un sac à dialyse (d'environ 20 cm), préalablement bouilli en EDTA 2 M pH 7 deux fois 15 mn autoclavé et conservé à 4°C.

- Faire un double noeud soigneusement serré à une extrémité.
- Introduire avec une pipette automatique l'ADN à dialyser.
- Faire un noeud à l'extrémité supérieure et y attacher avec une ficelle.
- Plonger le sac à dialyse dans un erlenmeyer contenant le tampon TEK. Avec un ruban adhésif, fixer la ficelle à l'extérieur de l'erlenmeyer de manière à ce que le noeud soit juste au dessus du niveau d'eau.
- Incrire la référence de l'ADN sur le ruban adhésif pour identifier le contenu du sac à dialyse.
- Mettre un barreau-aimanté dans l'erlenmeyer, dialyser une nuit à 4°C au dessus d'un agitateur magnétique.

Le lendemain, sortir les sacs à dialyse, couper l'extrémité supérieure et verser le contenu dans un tube conique Eppendorf 1,5 ml.

#### 3.1.5.6 Dosage de l'ADN

Il est rarement nécessaire d'effectuer un dosage très précis et dans la pratique une simple estimation de la concentration est effectuée par photométrie. L'ADN dilué au 1/20 en eau distillée et titré au spectrophotomètre.

Une unité de densité optique à 260 nm correspond à :

- une solution d'ADN double brin à 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- une solution d'ADN simple brin à 25  $\mu\text{g/ml}$ .

Ces valeurs s'appliquent à des acides nucléiques parfaitement purs et en solution homogène. Certains contrôles doivent être effectués. Il convient de rechercher :

- Une éventuelle contamination protéique (les protéines absorbent non seulement à 280 nm mais aussi à 260 nm). Pour cela on effectue une seconde mesure de DO à 280 nm. Un ADN pur doit avoir un rapport :

Do 260/DO 280 compris entre 1,8 et 2,0.

- Une éventuelle contamination par le phénol recherchée en mesurant l'absorption à 270 nm.

Ces contaminations entraînent une surestimation de la concentration réelle d'ADN, elles risquent d'inactiver les enzymes qui seront utilisées ultérieurement.

### 3.1.5.7 Coupure de l'ADN

10  $\mu\text{g}$  d'ADN sont coupés sous un volume de 20  $\mu\text{l}$ . Dans un microtube stérile (Eppendorf 1,5 ml) on introduit successivement :

10  $\mu\text{g}$  d'ADN, 2  $\mu\text{l}$  de tampon correspondant à l'enzyme ou un tampon universel (NaCl 50 mM, Tris HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Dithiothérol 1 mM, pH 7,5) et de l'eau distillée stérile q.s.p 20  $\mu\text{l}$ . L'enzyme (Boehringer) est ajoutée à raison de 2 U /  $\mu\text{g}$  d'ADN (une unité d'enzyme coupe un  $\mu\text{g}$  d'ADN du phage lambda en une heure à 37°C).

La réaction s'effectue dans un bain-marie à 37°C pendant au moins une heure. Elle est arrêtée par l'addition de 2  $\mu\text{l}$  de la solution d'arrêt (glycérol 50 %, EDTA 100 mM, SDS 1 %, BLEU de bromophénol 0,1 % pH 8) et une incubation pendant 10 mn à 65°C.

### 3.1.5.8 Electrophorèse en gel d'agarose

20  $\mu\text{l}$  du mélange de digestion sont nécessaires pour chaque électrophorèse. Les conditions retenues pour obtenir une bonne séparation des fragments d'ADN sont les suivantes : concentration en agarose (Sigma. A. 6877) 0,7 %, champ électrique 3V/cm, migration en cuve horizontale une demi-heure pour le petit gel et quelques heures pour le grand gel, tampon de migration TE (Tris acetate 40 mM, EDTA 1 mM, bromure d'éthidium).

L'ADN du phage lambda digéré par l'enzyme HindIII (12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -Boehringer) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire, les coupures génèrent six fragments de PM respectivement : 23,1 Kb, 9,4 Kb, 6,6 Kb, 4,4 kb, 2,3 Kb et 2 Kb.

### 3.1.5.9 Révélation et étalonnage des gels d'agarose

- Le bromure d'éthidium se glisse entre les bases des acides nucléiques. Cette molécule spontanément non fluorescente, présente une fluorescence orange lorsqu'elle est intercalée entre les bases des acides nucléiques.
- la révélation des bandes d'ADN s'effectue par transillumination aux UV courts (longueur d'onde 302 nm), l'ADN est visualisé sous forme de bandes oranges.

- Le gel est ensuite photographié avec un film très sensible en utilisant le système MP-4 land camera (Polaroid), en utilisant les films (667, 3000.ASA).

La migration est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases du fragment ; d'où l'utilité d'utilisation de marqueur de poids moléculaire connu .

### 3.1.6 Extraction des plasmides

#### 3.1.6.1 Extraction par mini-prep

- Les bactéries sont cultivées dans 10 ml de bouillon nutritif. Quand la densité bactérienne atteint environ  $2,5 \cdot 10^8$  bactéries /ml, on effectue une centrifugation à 4000 tr /mn d'une quantité de 1,5 ml de la culture précédente. Le culot est mis en suspension tampon TEK.
- La paroi bactérienne est perméabilisée par un traitement au lysozyme (Sigma) suivi par une lyse avec une solution de lyse KADO (base Kado, NaOH 4 M) la réaction se fait en milieu alcalin (soude) (71).

Grâce à ce traitement l'ARN et le plasmide passent en solution (lysate clair). L'ADN chromosomique reste emprisonné dans les restes bactériens. La purification consiste à détruire les ARN avec l'ARNase à 0,2 % (sigma), l'enzyme et les protéines bactériennes étant ensuite éliminés par extraction phénolique.

- Après une précipitation à l'acétate de potassium 3M et l'alcool absolu froid, le plasmide est enfin récupéré après lavage à l'alcool à 70 %, séché sous vide puis repris dans 50  $\mu$ l d'eau distillée stérile.

Deux techniques permettent d'obtenir des plasmides beaucoup plus purs, il s'agit de l'ultra-centrifugation et CLHP.

- L'ultra-centrifugation se pratique en gradient de chlorure ou de sulfate de césium en présence de bromure d'éthidium (BET). Le plasmide est sédimenté sous forme d'une bande localisée vers le milieu du tube que l'on visualise par les UV les restes d'ADN bactérien sont rassemblés en une bande qui sédimente moins vite. Le plasmide est récupéré par ponction à l'aiguille au travers de la paroi du tube .

Les sels de Césium et le bromure d'éthidium sont éliminés par dialyse et une série d'extraction.

Depuis peu, des colonnes échangeuses d'ions (Nucléogen DEAE 4000), très performantes, sont disponibles en CLHP.

La chromatographie s'effectue en présence d'urée 5M ou de formamide 50 %. L'élution est obtenue par gradient salin. Le plasmide est récupéré par précipitation à l'isopropanol puis resolubilisé dans le tampon TEK.

Quelle que soit la technique, s'il n'y a aucune incompatibilité entre la bactérie et le plasmide, le rendement est d'environ 500  $\mu$ g à 2 mg de plasmide par litre de culture. Pour la "mini-prep" le

rendement est de l'ordre de 1  $\mu\text{g}$  à 10  $\mu\text{g}$  par ml de culture bactérienne.

### 3.1.7 Extraction des protéines cytoplasmiques

Les bactéries sont cultivées dans 50 ml de bouillon de Schaedler jusqu'à obtention de la phase stationnaire de croissance. Centrifuger alors 5 mn à 4000 tr/mn, en utilisant une centrifugeuse réfrigérée (4°C). Les culots sont récupérés et mis en suspension dans un tampon Tris 10 mM.

L'obtention de protoplastes ou de sphéroplastes (selon qu'il s'agit de bactéries Gram positif ou négatif), est réalisée par un traitement au lysozyme à 1 % (Sigma).

La lyse est complétée par un traitement mécanique à l'aide d'ultra-sons trois fois une minute, avec une amplitude maximale, en maintenant les suspensions dans un bain-marie glacé pour éviter les dénaturations par élévation thermique.

Le lysat, légèrement opalescent est centrifugé ; le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (82).

#### 3.1.7.1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford modifiée

- Préparer une gamme d'étalonnage en utilisant une solution de sérum albumine bovine (SAB) à 1 mg/ml comme indiqué dans le tableau suivant :

$\mu\text{l}$ de SAB à 1 mg/ml	300	600	900	1200	1500	1800	0
$\mu\text{l}$ d'eau distillée	1700	1400	1100	800	500	200	2000
$\mu\text{g}$ de SAB lors de mesure à A 595	5	10	15	20	25	30	blanc

- Dans chaque tube, ajouter 1 ml de NaOH 3N. Placer les tubes dans un bain-marie bouillant durant 10 mn. Puis les refroidir en les plaçant dans la glace.
- Directement dans des cuves en plastique pour spectrophotomètre : pour chaque point de la gamme, introduire 50  $\mu\text{l}$  d'échantillon et ajouter 2,5 ml de réactif de Bradford (10 mg de bleu de comassie G-250, 5 ml d'alcool absolu et 10 ml d'acide O-phosphorique. Compléter à 100 ml d'eau).

pour les extraits protéiques, prendre des prises d'essai de 75  $\mu\text{l}$  et de 100  $\mu\text{l}$ . Ajouter 2,5 ml de réactif de Bradford.

- Bien mélanger. Laisser les tubes durant 5 mn à la température du laboratoire. Lire l'absorbance à 595 nm contre le blanc.
- Déterminer la concentration en protéines de l'échantillon à partir de la droite de référence construite en utilisant la



gamme étalon. Cette technique permet de détecter 5 à 30  $\mu\text{g}$  de protéines lors de la mesure, soit 0,1 à 0,6 mg de protéines par ml (20).

Il existe un kit commercialisé "Bio-Rad protein assay". La méthode utilisée est basée sur celle de Lowry (91). Elle présente plusieurs avantages : elle est simple, rapide, économique et sensible.

### 3.1.7.2 Appareil d'électrophorèse

Il s'agit d'un système pour gel vertical se composant de deux réservoirs avec électrodes qui contiennent le tampon de migration, deux plaques en verre dont l'une est échanvrée et de trois baguettes en matière plastique qu'on appelle espaceurs.

### 3.1.7.3 Préparation du gel de polyacrylamide.

#### 3.1.7.3.1 Traitement des plaques

- Les plaques sont lavées avec un détergent ou avec un mélange d'acide sulfurique et d'acide nitrique, rincées à l'eau très chaude, à l'eau distillée stérile et enfin séchées à l'étuve.

#### 3.1.7.3.2 Réalisation de la cuve

- Mettre la plaque pleine bien à plat sur la pailleasse. Sur les deux côtés (hauteur quand le gel sera en place) et sur le fond (largeur), poser un espaceur en veillant à ne pas toucher la plaque avec les doigts. Déposer ensuite la plaque échanvrée.
- A l'aide d'une spatule, disposer les trois espaceurs de façon à ce qu'ils soient en retrait d'environ 1 mm par rapport aux bords des plaques. Faire déborder le fond de la cuve sur le bord de la pailleasse et mettre les deux pinces sur l'espaceur formant le fond de la cuve. Bien ajuster les deux espaceurs latéraux pour qu'ils soient en contact étroit avec l'espaceur du fond. Mettre 2 pinces sur chaque espaceur latéral.
- La cuve étant en équilibre sur deux pinces et à l'aide d'une pipette Pasteur, remplir avec une solution d'agarose à 1,5 % ( $\sigma$ ) la rainure ménagée par le retrait des espaceurs. Laisser solidifier environ 5 mn. On assure ainsi la parfaite étanchéité de la cuve.

#### 3.1.7.3.3 Recristallisation du SDS

C'est un moyen de purification du SDS.

- 100 g de SDS, ajouter 450 ml d'éthanol à 95° et chauffer à 55°C.
- Ajouter 50 à 75 ml d'eau très chaude jusqu'à dissoudre le SDS, ajouter 10 g de charbon actif (Prolabo. 22638-296) et laisser reposer 10 mn au bain-marie à 55°C.

- Filtrer rapidement avec un filtre Whatman, laisser reposer ensuite 24 h à 4°C et 24 h à -20°C.
- Collecter les cristaux dans un entonnoir à verre fritté en ajoutant 800 ml d'éthanol froid.
- Répéter la cristallisation sans charbon actif et à la fin laisser les cristaux dans l'entonnoir pendant une nuit sous vide.

#### 3.1.7.3.4 Coulage du gel de séparation

- Vérifier l'horizontalité de la cuve lorsqu'elle repose sur les deux pinces du fond. Dans un Erlenmeyer de 100 ml préparer de gel de séparation (tampon pour gel de séparation 10 ml, solution d'Acrylamide 16,8 ml, SDS à 2 % 2 ml, eau distillée stérile 8,16 ml)

La présence d'oxygène inhibant la polymérisation du gel on dégaze le mélange précédent sous vide durant 30 mn. En fin de dégazement, ajouter en premier le persulfate d'ammonium (Merck, Art.1201) et ensuite le N,N,N,N-Tétraméthyl-éthylènediamine (TEMED-Sigma, réf. T 8133) ce dernier accélérant le processus de polymérisation.

- Verser doucement le gel dans la cuve, en inclinant légèrement vers l'extérieur. La cuve doit être remplie jusqu'à environ 4 à 5 cm de l'échancrure.
- Vérifier l'absence de fuite et à l'aide d'une pipette pré-éffilée, recouvrir la surface du gel avec de l'éthanol à 95°.
- Laisser polymériser durant 45 mn à la température du laboratoire. Ne pas toucher le gel pendant la polymérisation.

#### 3.1.7.3.5 Coulage du gel de concentration

- Eliminer l'alcool à la surface du gel de séparation en retournant la cuve. Eponger la surface du gel avec un papier absorbant non pelucheux.
- Préparer 20 ml de gel de concentration à 4,5 % (tampon pour gel de concentration 15 ml, SDS à 2 % 1,5 ml, solution concentrée d'acrylamide 4,5 ml, eau distillée stérile 3 ml).
- Remplir la partie supérieure de la cuve. Mettre le peigne en place, enfoncez les dents environ 1 cm.
- Laisser polymériser durant 30 mn à la température du laboratoire.

#### 3.1.7.4 Mise en route de l'électrophorèse

- Enlever doucement le peigne. Rincer les puits à l'aide d'une pissette d'eau distillée stérile. Enlever les débris du gel restant au niveau des puits, à l'aide d'une spatule.
- Enlever les deux pinces et retirer l'espaceur du fond du gel.

Rincer la surface du gel avec de l'eau distillée stérile.

- Placer le gel dans le réservoir inférieur. Remplir les deux réservoirs par le tampon de migration (glycine 0,192 M, SDS 2 %, Tris 0,025 M, eau distillée stérile).

#### 3.1.7.4.1 Préparation des échantillons

- Dans un microtube stérile (Eppendorf 1,5 ml), mélanger un volume d'extrait de protéines et un volume d'une solution de solubilisation (Tris HCl 6,25 %, SDS 2 %, glycérol 10 %, MgCl<sub>2</sub> 0,25 %, 3-4 % mercapto-éthanol, bleu de bromophénol, 0,01 %) laisser 30 mn à la température ambiante et 10 mn à 100°C. Le mercapto-éthanol coupe les liaisons disulfures des protéines. Le bleu de bromophénol marque les bandes de migration. Le glycérol augmente la densité des extraits protéiques.

#### 3.1.7.4.2 Dépôt et migration des échantillons

- Les échantillons peuvent être déposés dans les puits à l'aide d'une micro-seringue de 50 µl, qui sera rincée soigneusement entre chaque dépôt.
- Il importe de déposer doucement l'échantillon pour ne pas contaminer les puits voisins.
- Mettre un marqueur de poids moléculaire connu (Boehringer calibration proteines for SDS gel electrophoresis-Combithek 233 292).
- Connecter la cuve au générateur, le pôle positif étant au réservoir inférieur. Faire migrer à 100 volts durant 4 heures.

#### 3.1.7.4.3 Coloration et décoloration du gel

- Retirer le gel de l'appareil, retirer les deux espaceurs, décoller le gel et le placer dans le bac de coloration (bleu de comassie 0,5 %, acide acétique glacial 10 %, éthanol 95° 30 %, eau distillée stérile) pendant une nuit sous une légère agitation.
- La décoloration se fait avec une solution contenant : 5% acide acétique glacial, 16,5 % méthanol et de l'eau distillée stérile pendant 1 à 2 heures jusqu'à la visualisation totale des bandes.

### 3.1.8 Préparation d'une sonde

La première étape pour construire une sonde consiste à isoler puis amplifier un fragment d'ADN considérée comme spécifique. Ce fragment d'ADN va être ligaturé à l'aide de l'enzyme T4 ADN ligase, avec le vecteur choisi pour donner l'ADN recombinant.

#### 3.1.8.1 Préparation de L'ADN et du vecteur

L'ADN et le vecteur sont coupés par EcoRI et BamHI (cas

d'utilisation du pBR 322) ou par EcoRI dans le cas de pUC.

- purification de l'ADN et le vecteur
- Ajouter 205  $\mu$ l de tampon TEK et extraire une fois avec 200  $\mu$ l TEK- phénol-chloroforme, et une fois avec 100  $\mu$ l chloroforme et 25  $\mu$ l d'alcool isoamylique.
- Ajouter 25  $\mu$ l de LiCl 8 M et 750  $\mu$ l d'éthanol à 95°(froid).
- Refroidir 15 mn à -80°C.
- Centrifuger 10 mn et jeter le surnageant.
- Laver le culot avec 1 ml d'alcool à 70 %.
- Centrifuger 5 mn, jeter l'alcool et sécher le culot sous vide.
- Redissoudre le culot dans 10  $\mu$ l de TEK.

### 3.1.8.2 La ligation

Le mélange suivant est effectué dans un microtube sterile.

vecteur restreint	1 $\mu$ l
ADN digéré	1 $\mu$ l
tampon de ligation 10	1 $\mu$ l
eau distillée stérile	7 $\mu$ l
T4 ligase	1 $\mu$ l

puis incubé une nuit à 15°C ou à 4°C selon la nature du vecteur.

### 3.1.8.3 Préparation de cellules compétentes

Les souches utilisées sont : E.coli JM 83 E.coli JM 109 et E. coli HB 101.

- Préculture des souches dans 5 ml de milieu L (bacto-tryptone 10 g, extrait de levure 5 g, NaCl 10 g, eau distillée stérile q.s.p 1000 ml) avec agitation durant 18 heures.
- Ensemencer 10 ml de milieu L avec 100  $\mu$ l de la préculture, incuber 2h 30 mn à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 10 mn à 4°C (centrifugeuse réfrigérée).
- Reprendre le culot dans 5 ml de CaCl 100 mM.
- Mettre la suspension dans un bain-marie glacé durant 30 mn, centrifuger 1 à mn à 6000 g.
- Reprendre le culot dans 200  $\mu$ l de cacl 100 mM en le passant au vortex.
- Mettre la suspension dans un bain-marie glacé au moins 4 heures (généralement on la laisse 24 h)

Les cellules ainsi traitées sont conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

#### 3.1.8.4 Transformation

Dans un microtube stérile et préalablement refroidi à 4°C mélanger 100 µl de cellules compétentes. 10 µl (au maximum) d'ADN ligué.

- Mettre durant 30 mn dans un bain-marie glacé.
- Sortir les tubes et les mettre 5 mn dans un bain-marie à 42°C ensuite 10 mn dans un bain-marie glacé.
- Ajouter stérilement 1 ml de milieu L, mélanger par inversions répétées du tube et incubé 1 h 30 mn à 37°C.
- Étaler environ 200 µl du mélange de transformation, sur boîtes de Pétri contenant le milieu sélectif : milieu Mueller- Hinton avec 100 µg/ml d'ampicilline et le même milieu avec 12,5 µg/ml de tétracycline (en cas d'utilisation de pBR 322 comme vecteur) dans le cas de pUC, le milieu sélectif est à base de milieu L avec ampicilline 100 µg/ml, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-B-D-galactoside (X-gal) et sopropyl-B-D- thiogalactoside (IPTG).

#### 3.1.8.5 Choix des bactéries ayant incorporées l'ADN recombinant (choix des clones)

Cette sélection est obtenue après culture sur milieu sélectif, là où les propriétés apportée (s) par le plasmide étant utilisée (s) comme moyen de sélection.

- Dans le cas de pUC se sont les colonies blanches apparues sur le milieu sélectif.
- Dans le cas de pBR 322 se sont les clones qui apparaissent sur les boîtes contenant l'ampicilline.

Il est impératif de faire un témoin pour chaque transformation.

#### 3.1.8.6 Choix des sondes

Disposant d'un certain nombre d'ADN recombinant dans E.coli, il est nécessaire d'analyser une partie de ces plasmides afin de sélectionner celui ou ceux, contenant un fragment d'ADN susceptible d'être utilisé comme sonde.

Dans ce but, on extrait les plasmides (voir technique) qui sont coupés avec les mêmes enzymes de restriction (15). Après migration sur gel à 1,2 % d'agarose, la sonde est sélectionnée par la présence d'un marqueur de poids moléculaire connu.

#### 3.1.8.7 Transfert de l'ADN cible sur support solide (transfert de Southern) (141)

Il se fait par capillarité.

- Dépuration : après migration des ADN coupés, le gel est agité dans une solution de HCl 25 mM durant 10 mn.

- Incuber le gel 30 mn dans une solution dénaturante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M). La soude a la propriété de diffuser à l'intérieur du gel, et de casser l'ADN en fragments courts ce qui est indispensable pour l'hybridation ultérieure.
- Passer le gel dans une solution neutralisante (NaCl 1,5 M, Tris HCl 0,5 M, EDTA 1 mM pH 7,8) durant 45 mn.
- Pendant ce temps, découper la membrane de nylon (hybon + ECL Amersham, NK 8848) à la taille exacte du gel (en portant des gants)
- Découper deux feuilles de papier Whatman 3 MM une à la taille exacte du gel et l'autre de même largeur que la longueur du gel et de 35 cm de longueur.
- Tremper la membrane de nylon et la petite feuille Whatman, dans du tampon SSC x 2.
- Tremper la grande feuille de papier Whatman dans le tampon le tampon SSC x 20 (NaCl 3 M, citrate trisodique 0.3 M pH 7) et déposer cette feuille en pont sur une plaque en verre, les extrémités trempant dans le tampon SSC x 20 ( voir figure 1).
- Déposer soigneusement le gel au milieu, en évitant d'emprisonner les bulles d'air.
- Sur le gel, placer soigneusement la membrane de nylon, placer la petite feuille de papier Whatman dessus, le tout est couvert d'un épais papier à propriété hydrophile et un poids d'environ 500 g.
- Laisser transférer pendant 16 heures.
- Fixer la membrane à 80°C pendant deux heures, ou placer le gel coloré au bromure d'éthidium sur un transilluminateur à UV (302 mn) pour qu'il reçoive 10 uw/cm<sup>2</sup> pendant 5 mn ou l'équivalent de radiation cumulée.

L'ensemble des opérations permet de récupérer la totalité de l'ADN séparé en fragments sur support solide, supportant très bien les traitements nécessaires à l'hybridations.

### 3.1.9 L'hybridation

Deux techniques différentes ont été utilisées :

#### 3.1.9.1 Technique de multi-amorçage au hasard

##### 3.1.9.1.1 Principe

Elle est fondée sur l'hybridation d'un mélange de tous les hexa-nucléotides possibles sur de l'ADN simple brin, le brin complémentaire est synthétisé à partir de l'extrémité 3 OH de l'amorce d'hexa-nucléotide par l'enzyme de Klenow (42,43).

### - purification de la sonde par électro-élution

Les vecteurs contenant les inserts devront être digérés par les enzymes de restriction appropriés. Après migration en gel de 1 % d'agarose, la bande d'insert sera coupée à l'aide d'un scalpel et transférée dans un sac de dialyse, puis immergée dans une cuve d'électrophorèse, le courant sera appliqué (100 volts pendant 2 h) Pendant ce temps, l'ADN est électroélué du gel et migre sur la paroi interne du boudin de dialyse.

Il est détaché de la paroi du sac en inversant la polarité du courant pendant 5 minutes. L'ADN élué est aspiré lors du sac à l'aide d'une pipette Pasteur et précipité par adjonction de deux volumes d'éthanol glacial puis laissé reposer à -20°C (1 heure à une nuit).

Après centrifugation rincer le culot avec de l'éthanol à 70 % (-20) et le remettre en solution dans de l'eau distillée, la concentration peut être déterminée par spectrophotométrie.

### 3.1.9.1.2 Marquage de la sonde

L'ADN est marqué par l'incorporation d'un déoxyuridine triphosphate, marquée par la digoxigénine (d'UTP-dig) suivant la technique de "RANDOM" (85).

- La sonde est coupée par l'enzyme de restriction, purifiée par une extraction phénol-chloroforme et précipitée à l'alcool 95° -20°C.
- La sonde est dénaturée par chauffage 10 mn à 95°C et refroidissement 5 mn dans de la glace.
- Dans un microtube stérile faire le mélange suivant :

sonde fraîchement dénaturée	1 µg
hexanucléotide (tube n°5 du kit)	2 µl
dNTP (mélange de marquage)	2 µl
enzyme de Klenow	1 µl

- Incuber 1 h à 37°C.

- Stopper la réaction. Ajouter 2 µl d' EDTA 0,2 M et précipiter avec 2 µl de LiCl 4 M/l et 60 µl d'éthanol à 95°.
- Placer pendant 30 mn à -80°C.
- Centrifuger à 12000 g. Laver le culot avec l'éthanol à 70 %. Sécher sous vide et mettre en suspension en le tampon TEK.

### 3.1.9.1.3 Préhybridation

Pour 1 cm<sup>2</sup> de membrane, préparer 0,2 ml d'une solution de

préhybridation (5 x SSC, 5 % réactif de blocage, 0,02 % SDS, 50 % formamide désionisée). Mettre en contact avec la membrane pendant 1 heure à 42°C sous agitation.

#### 3.1.9.1.4 Hybridation

Pour hybrider, rejeter la solution de préhybridation, placer la membrane dans la même solution à laquelle on rajoute 100 ng de sonde fraîchement dénaturée (0,025 ml de solution sont nécessaires pour 1 cm de membrane). Hybrider avec agitation à 42°C durant 18 heures.

#### 3.1.9.1.5 Lavages des membranes

Premier lavage : les membranes sont lavées deux fois 5 mn avec la solution suivante : (2 x SSC, 0,1 % SDS (0,5 ml /cm<sup>2</sup>)).

deuxième lavage : il s'effectue avec la solution suivante : 0,1 x SSC, 0,1 % SDS, 2 x 15 mn à 68°C ( 0,1 ml/cm<sup>2</sup> ).

#### 3.1.9.2.6 Détection du signal

Après hybridation sur l'ADN cible, les hybrides sont détectés par réaction enzymatique à l'aide d'un anticorps conjugué (anti-digoxigénine, marqué par la phosphatase alcaline).

La réaction colorée catalysée par l'enzyme, apparaît en présence de 5-bromo-4-chloro-3-indodyle phosphate (x-phosphate) et de nitrobleu de tétrazolium (NBT) (58,140).

- Elle se fait à la température ambiante sous agitation. Laver la membrane en tampon : (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5), pendant 1 mn.
- Incuber la membrane pendant 30 mn en tampon : (0,5 % de réactif de blocage dans Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,5) pendant 1 mn.
- La membrane est lavée une seconde fois avec le tampon : Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,5) pendant 1 mn.
- Incuber la membrane 30 mn avec 150 µg/ml d'anticorps anti-digoxigénine en tampon : Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5)
- Laver 2 x 15 mn en tampon : (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5) (1 ml/cm<sup>2</sup>). 2 mn en tampon : (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 0,05 M, pH 9,5)

#### 3.1.9.1.7 Coloration

La solution de coloration (3,4 mg NBT, 1,75 mg BCIT dilué en tampon : Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M MgCl<sub>2</sub> 0,05 M, pH 9,5) est mise en contact avec la membrane (0,1 ml/cm<sup>2</sup>). Le signal apparaît dès les premières minutes mais on peut le laisser se développer pendant plusieurs heures. Cette étape se fait sans agitation. La coloration est stoppée en tampon : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).



### 3.1.9.2 Technique par luminescence

#### 3.1.9.2.1 Principe

Une enzyme, la peroxydase se lie de façon covalente aux acides nucléiques de la sonde, grâce à l'action du glutaraldéhyde.

#### 3.1.9.2.2 Marquage de la sonde

- Diluer l'ADN à marquer à raison de 0,2  $\mu\text{g}$  dans 20  $\mu\text{l}$ . La quantité totale d'ADN nécessaire dépend de la taille du blot à marquer (généralement 20 ng/20  $\mu\text{l}$  de milieu d'hybridation).
- Porter à ébullition la double chaîne d'ADN pendant 5 mn.
- Refroidir immédiatement l'ADN sur de la glace pendant 5 mn. Centrifuger brièvement le tube de réaction pour que le liquide soit entraîné au fond du tube.
- Ajouter un volume équivalent de réactif de marquage à l'ADN dénaturé, mélanger soigneusement (0,2  $\mu\text{g}$  d'ADN dans 20  $\mu\text{l}$  nécessitent 20  $\mu\text{l}$  de réactif de marquage).
- Ajouter la solution de glutaraldéhyde ; utiliser un volume équivalent à celui du réactif de marquage. Mélanger soigneusement, mais très brièvement (1 seconde) au vortex.
- Centrifuger le tube de réaction (5 secondes), et l'incuber 10 mn à 37°C. Si l'utilisation n'est pas immédiate, on peut conserver la sonde 10 à 15 mn dans la glace.
- Prendre le tampon d'hybridation et ajouter le NaCl à 0,5 M à une concentration finale convenable pour une hybridation efficace de la sonde (0,25 ml/cm<sup>2</sup> de membrane).

#### 3.1.9.2.3 Préhybridation

- Ajouter 5 % de réactif de blocage au tampon d'hybridation. Incuber à 65°C pendant 1 heure, préhybrider pendant 15 mn à 42°C avec agitation.

#### 3.1.9.2.4 Hybridation

- Ajouter la sonde d'ADN marquée dans le tampon de préhybridation, en évitant de la placer directement sur la membrane, et agiter doucement. L'incubation dure une nuit à 42°C.

#### 3.1.9.2.5 Lavage des membranes

- Enlever les membranes du milieu d'hybridation, les placer dans un récipient propre et les laver avec un excès du premier tampon de lavage (urée 5 M, SDS 0,4 %, 0,5 x SSC). Utiliser au moins 2 ml de tampon par cm<sup>2</sup> de membrane.
- Incuber avec agitation pendant 20 mn à 42°C.

- Remplacer le tampon de lavage par un volume équivalent de tampon : urée 5 M, SDS 0,4 %, 0,5 SSC), incuber 20 mn à 42°C sous agitation.
- Eliminer le tampon de lavage. Placer les membranes dans un recipient propre et ajouter en excès le second tampon de lavage (SSC x 2), incuber avec agitation pendant 5 mn à la température ambiante. Répéter ce lavage une deuxième fois.

#### 3.1.9.2.6 La détection du signal

La peroxydase transforme le peroxyde d'oxygène en ions superoxydes. Ces derniers oxydent le luminol contenu dans le réactif de détection produisant une émission de lumière bleue, détectable sur un film auto-radiographique (83).

- Recouvrir les membranes avec le réactif de détection (0,125 ml/cm<sup>2</sup>) et laisser en contact pendant 1 mn.
- Eliminer le tampon de détection, envelopper les membranes dans la saran Wrap (DOW chemical company) et chasser ensuite l'air des pochettes.
- Placer les membranes côté ADN sur le dessus, dans la cassette auto-radiographique. Travailler le plus rapidement possible ; réduire le plus possible le délai entre l'incubation des membranes dans la solution de détection et l'exposition avec le film (étape suivante).
- Eteindre la lumière et placer le film auto-radiographique Hyperfilm-ECL (Amersham, RPN 2103) au dessus des membranes, Fermer la cassette et exposer pendant une minute.
- Oter le film, placer immédiatement un autre film neuf et refermer la cassette. Développer le film après la durée d'exposition appropriée.

#### 3.1.9.3 Hybridatin ADN/ARN

Nous avons utilisé l'ARN (16 S-23 S ribosomal RNA from E. coli MERE 600 à 4 µg/µl.

- Mettre l'ARN pendant 30 mn à 37°C.
- Dans un micro-tube, diluer l'ARN (2 µl d'ARN dans 4 µl d'eau).
- Prendre 2 µ de la dilution précédente et faire les mêmes étapes que la technique de marquage par luminescence.

## 3.2 RESULTATS

### 3.2.1 La biotypie

#### 3.2.1.1 Biotypie de klebsiella

Il n'est peut être pas sans intérêt de décrire une épidémie à Klebsiella pneumoniae : non pas parce qu'elle ait atteint beaucoup de malades, mais parce qu'elle illustre la propagation d'une bactérie dont le pouvoir pathogène est connu par plusieurs auteurs.

En septembre 1989, une épidémie à K. pneumoniae est survenue dans un service de neuro-chirurgie à l'hôpital Sainte-Marguerite de Marseille. Plusieurs prélèvements ont été effectués chez les malades hospitalisés et dans l'environnement hospitalier.

Pour pouvoir individualiser les souches isolées, nous avons fait une identification biochimique précise, nous avons étudiés la sensibilité aux antibiotiques et nous avons déterminé les biotypes. Toutes les souches ont révélées une multi-résistance vis à vis des agents anti-microbiens.

Le résultat de la biotypie selon la technique de Richard, montre que toutes les souches appartiennent au biotype a mucate positive. Pour compléter le diagnostic, nous avons comparé les profils protéiques (électrophorèse en gel de polyacrylamide), ils étaient tous identiques. Après restriction de l'ADN chromosomique par EcoRI, les profils obtenus étaient semblables.

K. pneumoniae, est retrouvée normalement dans l'appareil respiratoire de l'homme et dans sa flore fécale, sa dissémination dans l'environnement du malade est due principalement à l'usage immodéré d'antibiotique à large spectre qui entraîne la sélection des souches multi-résistantes. En milieu hospitalier, les malades aux systèmes de défense déficients qui sont les plus exposés à ces infections.

La souche d'un malade a été disséminée dans l'environnement hospitalier et a pu par la suite contaminé les autres malades.

D'une manière générale, le typage des souches de Klebsiella ne pose aucun problème pratique, il permet de suivre le trajet des souches à l'intérieur de l'hôpital. Face à une augmentation croissante des isolements de Klebsiella (souvent multi-résistantes aux antibiotiques), il est intéressant de les identifier avec le plus de précision possible pour mieux connaître l'épidémiologie de ces micro-organismes. Une autre étude épidémique a été réalisée lors d'une autre épidémie à Klebsiella (voir après).

Tableau (VI)  
 Biotypie de souches de Klebsiella.  
 Hopital de la Timone- Marseille

Malades	Prélèvement	Date	Espèce	Biotype
DES	asp. bronchique	07.09.87	<u>K. pneumoniae</u>	b
BON	urines	24.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
BON	asp. bronchique	03.09.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
BON	urines	31.08.87	<u>K. penumoniae</u>	a ur-
BON	asp. bronchique	17.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
OZE	asp. bronchique	24.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
REV	urines	03.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
GUI	urines	31.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
GUI	expectoration	27.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
CON	expectoration	17.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
CON	expectoration	24.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
CON	expectoration	10.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	d
ROS	asp. bronchique	02.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
DEG	urines	07.09.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
MAZ	expectoration	03.09.87	<u>K. pneumoniae</u>	a ur-
MAZ	cathéter	21.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	d
RON	hémoculture	01.09.87	<u>K. pneumoniae</u>	Dd mal-
MIC	expectoration	03.09.87	<u>K. pneumoniae</u>	Dd mal-
PER	asp. bronchique	28.08.87	<u>K. pneumoniae</u>	d
TAC	hémoculture	01.09.87	<u>K. oxytoca</u>	Dc

ur- : uréase négative  
 mal-: malonate négative

On ne note jamais de flambée épidémique à Klebsiella seuls les foyers réduits, pouvant toucher quelques dizaines de malades et persister plusieurs mois, sont observés. Ces foyers sont relativement fréquents en milieu hospitalier où les mains du personnel jouent le rôle de vecteur de bactéries de malade à malade (manuportage). Sont également insciminés le matériel à usage médical ou chirurgical, les objets de l'environnement des malades mais aussi les aliments qui peuvent constituer une source possible de colonisation du tube digestif (en particulier le lait chez les nouveaux-nés).

Lorsqu'une Klebsiella pneumoniae ou K. oxytoca est isolée chez un même malade dans plusieurs prélèvements pathologiques (urines, expectoration, pus, sang...) échelonnés dans le temps, dans 75 % des cas il s'agit de la même souche. Les autres malades peuvent être colonisés ou infectés par deux ou exceptionnellement trois biotypes différents.

A titre d'exemple nous avons typé 20 souches de Klebsiella isolées (pour la plupart de service de réanimation) dans un laps de temps d'environ un mois chez différents malades. De cette étude nous pouvons faire plusieurs observations : 8 malades sur 11 malades de réanimation hébergent le même biotype à uréase négative ; cette souche serait à l'origine d'une mini-épidémie. Chez un même malade (BON ...) on a isolé le même biotype dans les urines et l'aspiration bronchique, avec persistance dans le temps. Chez un autre malade (MAZ...) des biotypes différents ont été isolés des expectorations et des urines. Pour (GUI...), même biotype dans les expectorations et les urines. On note cependant une différence d'aspect des colonies : la souche isolée des urines étant particulièrement muqueuse (voir tableau VI).

Nous avons également typé des souches provenant d'un service néonatalgie. Un nouveau-né présentant une dermatose bulleuse à Klebsiella pneumoniae était présumé à l'origine d'une mini-épidémie ayant touchée quatre autres nouveaux-nés.

Tableau (VII)  
Biotypage de Klebsiella pneumoniae service de néo-natalgie

Affection	Date de prélèvement	Biotype
Dermatose bulleuse congénitale	11.09.87	a
Atrésie de l'oesophage (prélèvement au niveau de gastrostomie)	18.09.87	a ur-
Diarrhée (coproculture)	23.09.87	a ur-
Diarrhée (coproculture)	23.09.87	a ur-
Diarrhée (coproculture)	23.09.87	a ur-

### 3.2.1.2 Biotypie d'Acinetobacter baumanii

Pendant l'été 1987, une épidémie due à Acinetobacter est survenue dans un service de réanimation polyvalente de Marseille. Plusieurs prélèvements ont été effectués. Les résultats de biotypie sont les suivantes :

Tableau (VIII)  
Répartition des souches selon les biotypes

Biotypes	1	2	5	6	7	8	9	10	12	16
Prélèvements										
(44) expectorations	15	10	1	10	1	3	1	0	2	1
(9) cathéters		5		4						
(6) urines	4	1						1		
(4) divers	1			2					1	
(12) environnement	1	5		2			4			

( ) nombre de souches.

Les biotypes 1 et 2 paraissent les plus fréquents suivis des biotypes 6 et 9.

86,7 % des souches sont réparties dans les biotypes 1-2-6-9. Ce résultat est comparable à celui de Bouvet et Grimont (19). Leur étude a porté sur 247 souches 86 % d'entre elles appartenant aux mêmes biotypes.

Tous les biotypes sont présents au niveau des expectorations sauf le biotypes 10 rencontrés dans l'urine d'un malade n'ayant eu qu'un seul prélèvement.

En ce qui concerne l'environnement, le biotype 9 a été retrouvé au niveau de quatre prélèvements (paillasse de l'évier et de la laverie, extérieur d'un flacon de savon, main du personnel). Le biotype 6 a été présent tout le long de la période d'étude chez les malades et a diffusé dans l'environnement le dernier mois. Quant au biotype 2, retrouvé dans l'environnement (sol, porte du placard de la laverie, tablette avec matériel médical) a été contaminé peu après les premiers isollements chez les malades. Dans tous les cas, il y a essaimage de bactéries du même biotype et il est nécessaire de renforcer les mesures d'hygiène hospitalière au lit du malade.

### 3.2.1.2.1 Associations de biotypes

Des biotypes différents ont été observés chez un même malade porteur d'Acinetobacter.

Quatre malades différents ont hébergé à la fois des biotypes 1 et 6. Les autres associations n'ont été présentes qu'à un seul exemplaire.

1 + 8  
1 + 5 + 8  
1 + 6 + 12  
1 + 2 + 9 + 16  
2 + 6  
2 + 12

Certains malades ont hébergé au niveau de leurs bronches, plusieurs associations de biotypes (1+6, 1+5+8, 1+9+16). l'association 2+6 n'a pas été retrouvée qu'au niveau des cathéters. Dans les associations des biotypes, 1+6, 1+5+8, 1+6+12, et 1+12, les souches d'Acinetobacter provenaient d'au moins deux origines : bronches, urines ou cathéters. Nous pouvons donc déduire qu'un même malade peut développer plusieurs infections dues à des biotypes différents. Pour les souches de l'environnement aucune association n'a été retrouvée.

### 3.2.1.2.2 Sensibilité aux antibiotiques

Nous avons étudié les antibiogrammes pour l'ensemble des biotypes 1, 2 et 6.

Le biotype 2 est le plus sensible aux antibiotiques. En effet les souches testées sont sensibles à l'imipenem, à la plupart des aminosides (tobramycine, dibékacine et amikacine) et des quinolones (péfloxacine, ofloxacine) ainsi qu'à la colistine et la rifampicine.

Par contre la plupart des souches résistent aux pénicillines du groupe A et au mecillinam, aux céphalosporines de première et deuxième génération, à la pristiniamicine et la fosfomycine.

Le biotype 1 est sensible à l'imipenem, à la tobramycine et la colistine mais résistant aux autres bêta-lactamines et aminosides, aux trois quinolones testées, aux macrolides, tétracycline et sulfamides.

Le biotype 6 n'est sensible qu'à l'imipenem et la colistine et résistant à la plupart des autres antibiotiques testés.

Nous présentons les résultats de la biotypie d'Enterobacter cloacae et de Serratia marcescens (voir tableaux ci-dessous).

Tableau (IX)  
Biotypie d'Enterobacter cloacae

Date de prélèvement	origine de prélèvement	Code API 20 E	Biotype
20.06.87	Eau du biberon	3304573	43136
29.06.87	Pailleasse	3304773	47516
29.06.88	siphon	3304573	66137
29.06.88	matériel	1305573	72112
29.06.88	urine	3305573	43116
25.06.88	plaie jambe	3304773	41536
25.06.88	nez	3305773	43116
24.06.88	bouche	3305733	73516
22.06.88	urine	3305733	77514
06.07.88	eau biberon	3305733	73116
07.07.88	siphon	3305733	63116
08.07.88	escarre	3305733	67416
23.07.88	urine	3105773	43156
01.08.88	nez	3305773	77516
03.08.88	nez	3305573	53136
10.08.88	eau	305473	55516
19.08.88	siphon	3305573	55136
02.09.88	eau	3305573	65516
09.09.88	siphon	3304773	40576



Tableau (X)  
Biotypie de Serratia marcescens

Date de prélèvement	Type de prélèvement	Code API 20 E	Biotype
02.09.88	Eau	5306561	A5
23.08.88	nasal	5307721	A5
05.01.89	siphon	5307561	A2a
08.01.89	tuyau	5317761	A8a
31.02.89	siphon	5306761	A8a
28.03.89	bronchique	5306761	A3b
13.03.89	bronchique	5306761	A3a
20.03.89	urine	4307763	A8b
13.03.89	urine	4307763	A8b
29.03.89	cathéter	4307763	A8b
28.03.89	bronchique	4307721	A8b
30.03.89	bronchique	4307721	A8b
29.03.89	urine	4307761	A3b
03.04.89	expectoration	4307721	A2b
05.04.89	bronchique	5307763	Aub

### 3.2.2 Sérotypie

#### 3.2.2.1 Sérotypie des staphylocoques dépourvus de coagulase

La majorité des 265 souches ont réagi avec les deux sérums : 52186-epidermidis (52,4 %), peu de souches (6,3 %) ont réagi seulement avec l'anti-sérum 52160 aussi préparé vis à vis des souches de S.epidermidis.

L'appartenance de toutes les souches au sérotype 52186-epidermidis, confirme qu'elles possèdent les mêmes caractéristiques antigéniques et montre qu'il existe une corrélation entre ces sérotypes et l'espèce epidermidis.

25 souches ont réagi avec des sérums absorbés, préparés visà vis d'autres espèces de Staphylocoque à coagulase négative que S. epidermidis :

- 13 avec l'anti-sérum cohinii (5 %)
- 12 avec l'anti-sérum haemolyticus ou hominis seulement

Ces résultats ne montrent aucune réaction croisée entre les anti-sérums obtenus des espèces précédentes. Environ 10 % des souches sont agglutinées par l'anti-sérum préparée vis à vis de S. aureus, ce qui montre l'existence de déterminants antigéniques communs entre S. aureus et S. epidermidis.

Par ailleurs 56 souches n'ont pas été typées ou ont été agglutinées par tous les sérums. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Pillet et Orta (116).

En résumé, une corrélation entre espèce et sérotype a été observée pour un nombre de 157 souches parmi les 209 typées (75 %) et les 25 % n'ont pas été typées avec les anti-sérums de l'espèce correspondante. Cela est peut être due à une mauvaise identification à l'espèce.

Cette technique peut être proposée comme méthode de classification puisqu'elle montre l'intérêt de la sérotypie dans le marquage et l'identification des staphylocoques à coagulase négative.

L'ensemble des souches de Staphylocoques ont été testé visà vis d'une gamme de 33 antibiotiques. L'ensemble des résultats nous a permis d'estimer le pourcentage des souches résistantes. Nous n'avons pas tenu compte des souches intermédiaires, celles-ci ont été rendues résistantes (voir tableau XI).

#### 3.2.2.2 Sérotypie de Pseudomonas aeruginosa

C'est une technique de routine dans le laboratoire de microbiologie. Elle est facile à mettre en oeuvre mais le problème des souches auto-agglutinables, poly-agglutinables et non agglutinables se manifeste toujours. Nous avons retenu pour notre étude les souches appartenant au groupe 0:12.

Tableau (XI)  
 Pourcentage de résistance présenté par les staphylocoques

Antibiotique	Nombre de souches résistantes	Nombre de souches résistantes
Gentamicine	129	49 %
Tobramicine	158	60 %
Dibekacine	149	56 %
Amikacine	146	55 %
Netilmicine	92	34,5 %
Pefloxacine	67	25 %
Cefalotine	40	15 %
Cefamandole	124	47 %
Cefotiam	92	34,5 %
Cefotaxime	121	46 %
Cefiatrixone	136	51 %
Cefaperzone	188	71 %
Cefoxitine	124	47 %
Cefsulodine	161	61 %
Ceftazidine	171	64,5 %
Latamoxef	149	55 %
Augmentine	101	38 %
Ipipenem	106	40 %
Penicilline	252	95 %
Ampicilline	235	89 %
Pepiracilline	235	89 %
Clistine	238	90 %
Trimethoprime	112	42 %
Sulfamides	112	42 %
Vancomycine	0	0 %
Fosfomycine	106	40 %
Spiramycine	223	84 %
Erythromycine	225	85 %
Pristiniamycine	25	9,5 %
Doxyciline	129	49 %
Rifampicine	77	29 %
Oxacilline	124	47 %
Cefalotine (30°)	40	15 %

### 3.2.3 Lysotypie

#### 3.2.3.1 Résultats de titrage des phages

Tableau (XII)  
Spectre lytique de différents phages sur les souches propagatrices

N° de phage	Dilutions phagiques		
	10-2	10-4	10-6
155	lyse complète	semi-confluence	100 plages
459	lyse périphérique	semi-confluence	12 plages
71	lyse périphérique	semi-confluence	100 plages
275 A	lyse périphérique	semi-confluence	50 plages
275	lyse périphérique	semi-confluence	12 plages
B1	lyse périphérique	semi-confluence	15 plages
A6C	lyse périphérique	semi-confluence	19 plages
37	lyse complète	semi-confluence	30 plages
28	lyse périphérique	semi-confluence	13 plages
157 A	lyse périphérique	semi-confluence	19 plages
82	lyse complète	lyse complète	semi-confluence
471 A	lyse périphérique	lyse périphérique	100 plages
15	lyse périphériques	lyse périphérique	15 plages
A9C	lyse complète	semi-confluence	40 plages
456	lyse complète	lyse complète	semi-confluence
165	lyse complète	lyse complète	20 plages

Tableau (XIII)

Titres phagiques après enrichissement

Phages	Titre UFP/ml*	RTD**
155	5 X 10	10-4
459	6 X 10	10-4
71	5 X 10	10-4
275 A	25 X 10	10-4
B1	75 X 10	10-4
275	6 X 10	10-4
AGC	95 X 10	10-4
37	15 X 10	10-4
28	65 X 10	10-4
157 A	95 X 10	10-5
82	5 X 10	10-6
471 A	5 X 10	10-5
15	25 X 10	10-5
A9C	2 X 10	10-4
456	5 X 10	10-6
165	1 X 10	10-5

UFP \* : unité formant plaque  
 RTD \*\* : routine test dilution

Les phages R6, 28 A et 27 n'ont pas été testés, leur titre faible ne permettant pas leur utilisation.

Selon la technique du titrage précédemment décrite, nous rappelons ici que la détermination du titre de chacun des phages a été réalisée en utilisant la méthode de numération des plages sur gélose :

Le nombre de plages trouvé par millilitre à la dilution phagique 10 (-6) est multiplié par la dilution et exprimé ensuite en unité formant plages (UFP).

La dilution de routine est la dilution phagique la plus élevée qui donne une lyse semi-confluente. Elle est selon le tableau (XIII) et pour la majorité des phages à la dilution 10 (-4). Pour les

phages n'ayant pas donné cette image de lyse, nous avons pris une dilution intermédiaire entre une lyse confluyente et la dilution donnant des plages isolées, c'est le cas de 471A et 15.

Tableau (XIV)  
Résultats de la lysotypie des espèces testées

Espèce	Souches de l'environnement		Souches pathologiques	
	Nbre	% de souches lysotypables	Nbre	% de souches lysotypables
<u>S. epidermidis</u>	74	33,78	125	32,8
<u>S. haemolyticus</u>	29	0	11	27,3
<u>S. saprophyticus</u>	19	15,78	8	0

On remarque que les espèces de Staphylococcus haemolyticus provenant de l'environnement ne présentent aucune faculté de lyse bactérienne, elles sont indifférentes aux phages tandis que celles des produits pathologiques sont plus au moins typables.

Le cas contraire se présente en ce qui concerne les Staphylococcus saprophyticus. L'espèce epidermidis est caractérisée par un lysotypage plus que aisé les autres espèces.

### 3.2.3.2. Expression des résultats de la lysotypie

Plusieurs auteurs (16,163) pour prendre en compte de la spécificité de l'attaque phagique, de leur nombre et de leur intensité, avaient émis des règles permettant d'établir l'origine commune de deux souches et de leur parenté.

Nous avons procédé à une comparaison de chaque lysotype obtenu par rapport à d'autres lysotypes et nous avons exprimé nos résultats comme suit :

résultats identiques : les lysotypes ne diffèrent que par des réactions faibles notées (+) à la fin du lysotype. Exemple :

souche n°45 : 71

souche n°46 : 71 +

Nous avons ainsi obtenu 37,5 % des résultats identiques dont la majorité des souches sont attaquées par un seul phage avec ou sans réaction faible (voir tableau XX).

résultats équivalents : les lysotypes sont équivalents si une seule réaction forte les distingue sans tenir compte des réactions faibles (voir tableau XVIII). Exemple :

souche n°34 : 456 Agc

souche n°68 : 456

résultats différents : les lysotypes sont différents si deux réactions fortes les distinguent entre eux. Exemple :

souche n° 32 : 71

souche n°46 : 71 82 456 +

Un pourcentage de 29,16 % représente l'ensemble de nos résultats (voir tableau XIX).

Un bactériophage n'agit pas sur toutes les souches d'une même espèce bactérienne, certaines sont sensibles à l'action lytique, d'autres le sont moins et d'autres enfin sont réfractaires. Ainsi sur un nombre total de 265 souches isolées de trois sources différentes (produits pathologiques, environnement hospitalier et environnement non hospitalier) environ 30 % des souches sont lysotypables en utilisant des dilutions phagiques 1000 fois plus concentrées que la dilution de routine (1000 RTD). Par ailleurs quelques unes entre elles ont donné des résultats positifs à RTD et 100 RTD mais avec un pourcentage presque négligeable.

En comparant le pouvoir lytique de chacun des phages utilisés, nous remarquons que leur capacité de lyser les souches n'est pas la même. Le phage 456 semble avoir une activité plus forte que les autres (lyse de 50 % des souches) (voir figure 3).

La répartition des souches selon leur provenance, nous conduit à signaler que les souches d'origine pathologique sont lysées dans une proportion de 30,5 % sur un ensemble de 144 souches testées (voir tableau XV). Les souches isolées de l'environnement non hospitalier viennent en deuxième position (voir tableaux XVI, XVII). En analysant les résultats de positivité selon les espèces de staphylocoque étudiées, nous signalons que les S. epidermidis provenant des trois sources ont manifesté une sensibilité bactériophagique beaucoup plus importante que que les deux autres espèces (voir tableau XIV).

Tableau (XV)  
 Lysotypes des souches d'origine pathologique  
 (résultats à 1000 RTD)

N° des souches	LISTE DES PHAGES											LYSOTYPES					
	155	459	71	275A	275	B1	A6c	37	28	157A	82		471A	15	A9c	456	165
01	-	+++	-	±	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	+++	659 275 A6c 82 456 165 +
02	+++	-	+++	+++	-	+++	±	-	-	-	+++	+++	±	-	+++	-	155 71 275A B1 A6c 82 471A 456 +
04	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	±	-	±	+++	+++	459 71 275 B1 A6c 82 456 165 +
07	-	-	-	-	+++	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	275 82 165 +
09	-	+	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	±	-	-	+++	±	659 71 275 B1 82 456 +
16	-	±	+++	-	+++	+++	±	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	71 275 B1 A6c 456 +
21	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	+	+	+++	+++	-	+	-	-	155 459 28 157A 471A A9c
22	-	-	-	+	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	275A 275 A6c 456
27	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++	-	+++	+	-	±	459 B1 A6c 82 15 A9c +
28	±	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+	+++	+++	459 471A A9c 165 +
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	275 A9c 456
31	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+	-	+++	+++	155 459 71 275A 275 B1 A6c 28 82 471A 456 165
32	±	±	+	+	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	71 +
34	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	456 +
36	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71
45	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71
46	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	+++	-	-	±	+	-	71 82 456 +
47	-	±	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	-	82 456 +
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	456
52	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	37 28
56	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	275A 275 B1 A6c 37 28 82 15 A9c 456
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	459 275 B1 A6c 456



Suite du tableau (XV)

N° des souches	LISTE DES PHAGES													LYSOTYPES			
	155	459	71	275A	275	BI	A6C	37	28	157A	82	471A	15		A9C	456	165
59	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	275A 456
62	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	-	155 275 28 157A 471A A9C 456
64	-	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	459 275A A6C A9C
65	-	+++	+++	-	-	+++	±	-	-	±	-	±	-	±	+++	-	459 71 A6C 456 165
66	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	71
68	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	456
69	-	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	459 275A 275 BI A9C 456
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	82
76	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	157A
79	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	157A
93	-	+++	-	-	-	-	±	-	-	+++	-	-	-	-	-	±	459 157A
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	456
97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	+++	±	-	A9C
110	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	±	±	-	-	-	-	-	-	155 71 37 157A
112	-	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	-	±	+++	+++	-	+++	-	71 275A 275 37 471A 15 456
114	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	-	459 275 BI A6C 157A 82 15 A9C
124	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	-	±	-	275 37 157A 15
128	-	+++	-	+++	-	-	±	-	-	-	±	+++	-	+++	+++	-	459 275 471A A9C 456
129	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	-	459 275 BI A6C 157A 471A 19C 456
134	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	+++	-	-	275 A9C
143	-	-	+++	±	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	-	71 275 BI 37 15 456
146	-	-	±	+++	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	±	-	-	275A BI 37 471A

Légende: +++ : Lyse confluyente, ++ : Lyse semi-confluyente

++ : 50 phages, ± : 50 plages, - : résultat négatif.

Tableau (XVI)  
Lysotypes des souches isolées de l'environnement non  
hospitalier

N° des souches	LISTE DES PHAGES													LYSOTYPES			
	155	459	71	275A	275	B1	A6C	37	28	157A	82	471A	15		A9C	456	165
158	-	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	±	-	71 275 471A 15 +
167	-	++	-	-	-	-	±	-	-	-	+++	±	-	-	+++	-	459 82 456 +
164	±	-	+++	-	-	-	-	-	±	+++	-	-	-	-	+++	-	71 157A 456 +
165	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	459 275 A9C 456
173	-	-	±	-	-	±	-	-	±	-	±	-	-	++	-	-	A9C +
175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	456
178	-	±	±	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	B1 A6C 456 +
179	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71
183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	±	-	-	-	-	82 +
185	-	+++	-	-	±	-	±	-	-	-	±	-	++	-	+	++	459 15 165 +
186	-	+++	+++	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	±	+++	-	459 71 B1 A6C 471A 456 +
190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	82
192	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1
196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	82
198	-	+++	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	++	+++	-	459 71 A6C 471A A9C 456 +
200	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	+++	-	B1 A6C 456 +
214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	82
253	+	++++	-	±	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	71 275 B1 A6C A9C +
265	-	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	±	-	71 275 B1 A6C A9C +
266	-	±	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	±	+++	-	B1 a6C 456 +

Tableau (XVII)  
Lysotypes des souches isolées de l'environnement  
hospitalier

N° des souches	LISTE DES PHAGES											LYSOTYPES				
	459	71	275A	275	B1	A6C	37	28	157A	82	471A		15	A9C	456	165
12	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BI
14	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	BI 471A
23	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	++	+++	±	+++	+++	+++	71 275A 275 B1 82 471A A9C 456+
39	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++	275A 82 A9C 456
102	-	+++	+	+++	-	+++	-	-	-	±	±	-	-	+++	+	171 275 A6C 456 +
130	-	+++	+++	+++	-	+++	-	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	459 71 275 A6C 157A 82 15 A9C
139	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	+++	+++	+++	A9C 456 +

Tableau (XVII)

Résultats équivalents de l'ensemble des souches lysotypables

N° des souches	LYSOTYPES	ORIGINE DES SOUC
12	BI	EH [1]
14	BI 471A	EH
16	71 275 BI A6c 456 +	Path [2]
58	459 275 BI A6c 456	Path
16	71 275 BI A6c 456 +	Path
102	71 275 A6c 456 +	EH
22	275A 275 A6c 456	Path
102	71 275 16c 456 +	EH
34	456 +	Path
47	82 456	Path
34	456 +	Path
59	275A 456	Path
46	71 82 456 +	Path
47	82 456 +	Path
46	71 82 456 +	Path
161	459 82 456 +	ENH [3]
47	82 456 +	Path
59	275A 456	Path
59	275A 456	Path
139	A9c 456 +	ENH
76	157A	Path
93	459 157A +	Path
97	A9c +	Path
139	275 A9c +	ENH
186	459 71 BI A6c 471A 456 +	ENH
198	459 71 A6c 471A A9c 456 +	ENH

[1] Environnement hospitalier

[2] Pathologique

[3] Environnement non hospitalier

Tableau (XIX)  
 Résultats différents de l'ensemble des souches lysotypables

N° des souches	LYSOTYPES	ORIGINE DES SOUCHES
01	459 275 A6d 82 456 165 +	Path
04	459 71 275 B1 A6d 456 165 +	Path
07	275 82 165 +	Path
74	82 +	Path
16	71 275 B1 A6d 456 +	Path
178	B1 A6d 456 +	ENH
22	275A 275 A9d 456	Path
59	275A 456	Path
27	459 B1 A6d 82 15 19d +	Path
114	459 275 B1 A6d 157A 82 15 A9d +	Path
29	275 A9d 456	Path
34	456	Path
29	275 A9d 456	Path
97	A9d	Path
29	275 A9d 456	Path
165	459 275 82 A9d 456	ENH
32	71	Path
46	71 82 456 +	Path
32	71	Path
164	71 157A 456 +	Path
34	456 +	Path
46	71 82 456 +	Path
34	456 +	Path
161	459 82 456 +	ENH
34	456 +	Path
164	71 A6d 456 +	ENH
46	71 82 456 +	Path
74	82 +	Path
46	71 82 456 +	Path
178	B1 A6d 456 +	ENH
47	82 456 +	Path
41	275A 82 A9d 456	EH
58	459 275 B1 A6d 456	Path
178	B1 A6d 456 +	ENH
124	275 37 157A 15 +	Path
158	71 275 471A 15 +	ENH
161	459 82 456 +	ENH
165	459 275 471A A9d 456	ENH
167	459 82 456 +	ENH
74	82 +	Path
178	B1 A6d 456 +	ENH
192	B1	ENH

Tableau (XX)  
 Résultats identiques de l'ensemble des souches lysotypables

Lysotype	N° des souches possédant les mêmes lysotypes	Nbre de ces souches
/71/+	32-36-39-45-66-179	6
/456/+	34-51-68-95-175	5
/82/	74-183-190-196-214	5
/157A/	76-79	2
/A9C/+	97-173	2
/B1/A6c/456/	178-200-266	3
/B1/	12-192	2
/71/275/B1/A6c A9C/	253-265	2

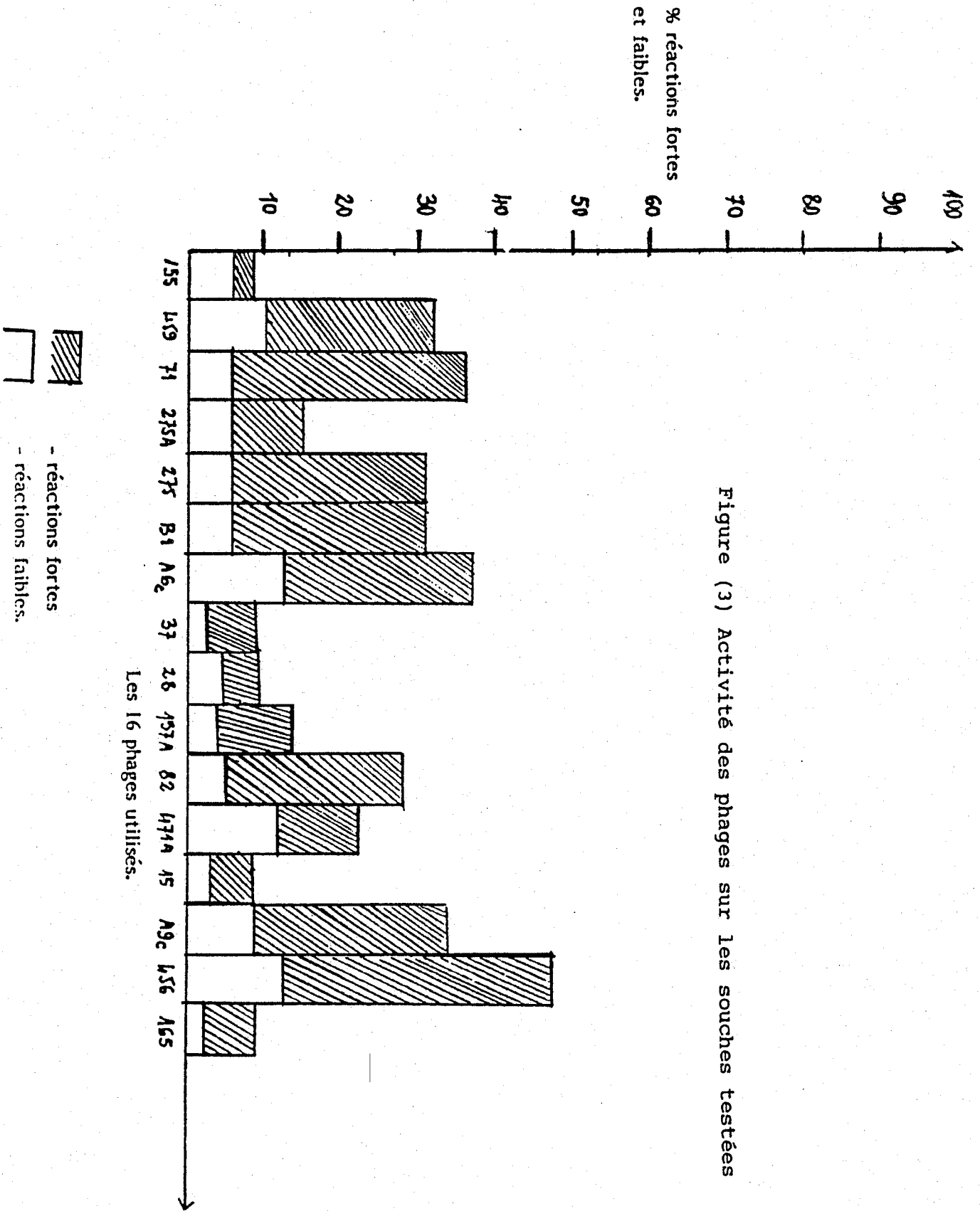


Figure (3) Activité des phages sur les souches testées

### 3.2.4 Profils protéiques

Nous avons tout d'abord étudié la reproductibilité de la technique sur une même souche d'un jour à l'autre, elle paraît excellente, les profils protéiques étant reproductibles.

Il nous a apparu qu'au sein d'une même espèce, il y a suffisamment de bandes protéiques caractéristiques pour pouvoir utiliser cette technique comme outil d'identification au niveau de l'espèce ; de plus, un certain nombre de bandes protéiques mineurs sont variables au sein d'une même espèce suggérant que cette technique peut être utilisée comme moyen de marquage infra-spécifique de certaines espèces. C'est le cas de Pseudomonas aeruginosa sérotype O:12.

Dans d'autres cas, l'analyse de différentes bandes n'a pas abouti aux résultats escomptés, en effet la comparaison des profils obtenus montre très rarement de nettes différences et souvent semblables. C'est le cas de l'étude faite sur les souches de Klebsiella.

Nous avons été confrontés à certaines difficultés :

- En partant de 10 ml de culture, la concentration finale en protéines était très faible. L'utilisation de 50 ml de culture a résout le problème.
- La polymérisation du gel était longue et parfois on obtient un gel mou ou cassant ceci est due aux concentrations inadéquates en Acrylamide ou à des températures de polymérisation trop dépassées
- La température élevée de la pièce (à partir de 21°C) peut parfois inhiber la polymérisation du gel.

### 3.2.5 Profils plasmidiques

La technique de "mini-prep" utilisée dans l'extraction des plasmides, semble être facile à mettre en oeuvre et donne de bon résultats cependant son application sur 80 souches d'Acinetobacter n'a donné aucun résultat. Aucune souche ne possède un plasmide. Ceci est due soit à la présence de certains facteurs endogènes pouvant masquer ces plasmides (nucléases endogènes). Soit à l'existence de souches dépourvues de plasmides.

L'étude écologique de la population bactérienne des hôpitaux a mis en évidence au cours des quatre premières mois de 1989, une émergence de Pseudomonas aeruginosa de séro-groupe O1. Souches rarement isolées auparavant, leur sensibilité aux antibiotiques a été testé par la méthode de diffusion en gélose ; et toutes les souches se sont révélées résistantes vis à vis de tous les bêta-lactamines et tous les aminosides avec une CMI très élevée. Toutes les souches possèdent un ou plusieurs plasmides. 15 ADN plasmidiques ont été extraits par lyse alcaline, électrophorèse en gel d'agarose, élution au phénol chloroforme et utilisés pour transformer E. coli HB 101, les transformants ont été sélectionnés sur gélose de Mueller-Hinton additionné à l'imipenem (20 mg/ml) d'amikacine (10 mg/ml), de ciprofloxacine



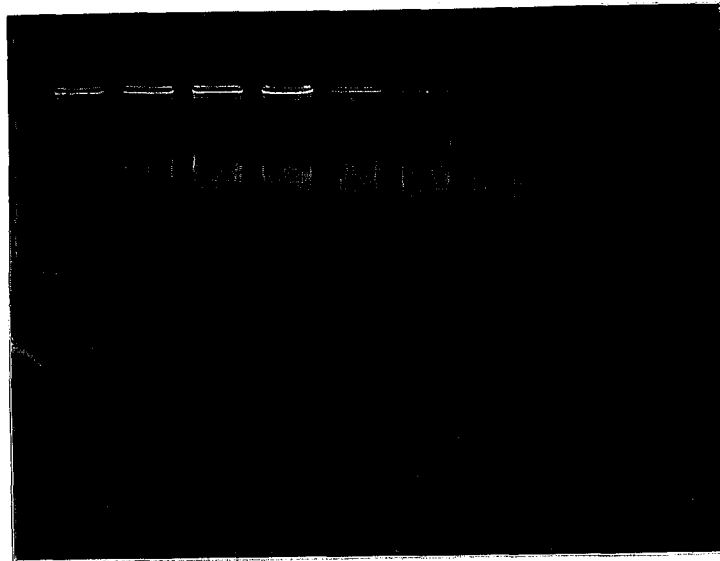


Figure (4) ADN chromosomique après dialyse

Migration en gel d'agarose à 0,7 % coloré au bromure d'éthidium et visualisé sous rayon UV

1 2 3 4 5 6  
| | | | | |

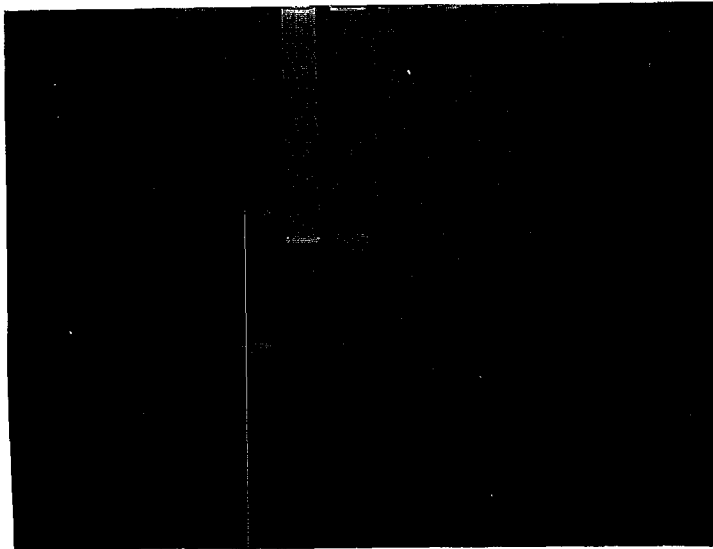


Figure (5) Vérification des clones après extraction des plasmides par mini-prep et migration en gel d'agarose à 1 %

Légende :

1. pBR 322 non coupé
2. pBR 322 coupé par EcoRI et BamHI
3. bande
4. les autres clones

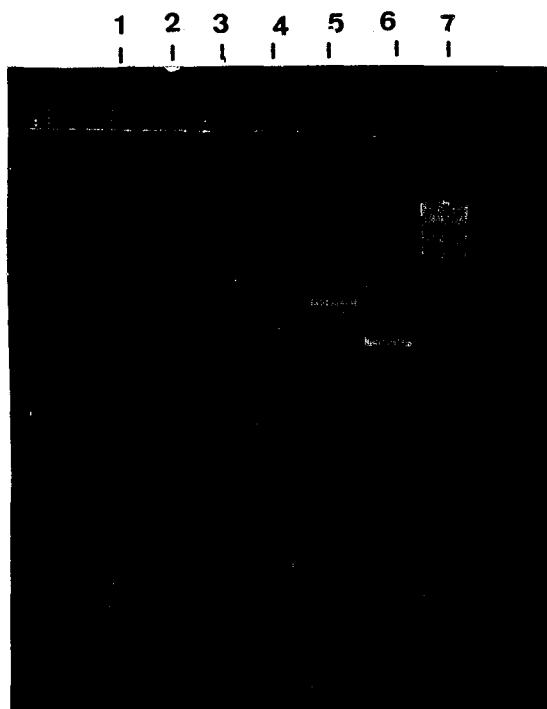


Figure (6) Vérification des clones après extraction des plasmides par mini-prep et migration en gel d'agarose à 1 %

Légende :

- 1,2,4 les clones
- 3 sonde
- 5 pUC 19 coupé par EcoRI
- 6 pUC 19 non coupé
- 7 le marqueur de poids moléculaire

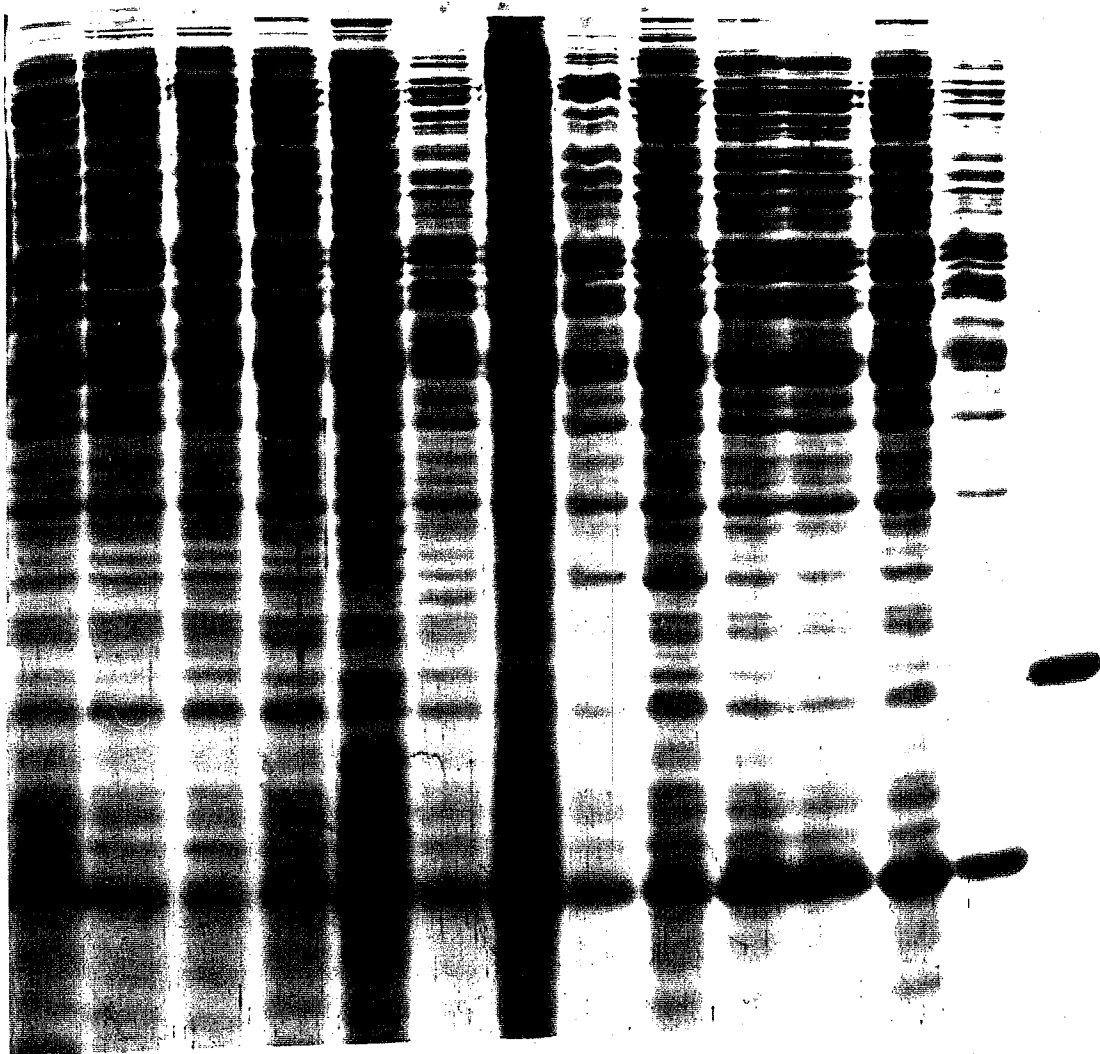


Figure (7) Profils protéiques des souches de Klebsiella pneumoniae en gel de polyacrylamide en présence de SDS et après coloration par le bleu de comassie

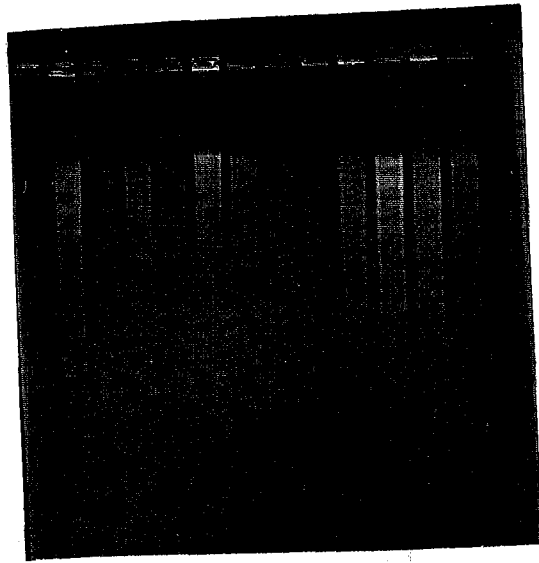


Figure (8) Profils de restriction des ADN chromosomiques  
des souches de Klebsiella pneumoniae coupés par  
ECORI

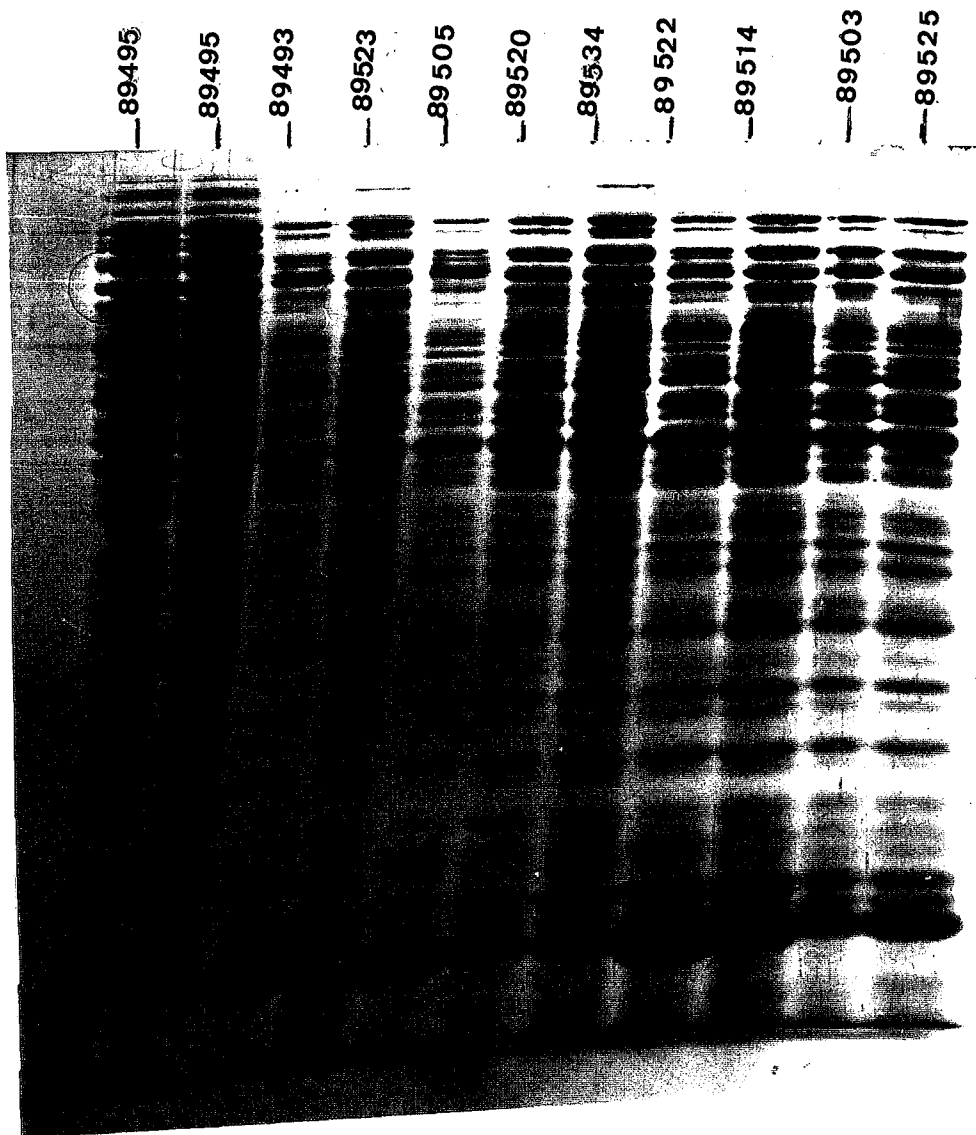


Figure (9) Profils protéiques des souches de Pseudomonas aeruginosa groupe 0:12 en gel de polyacrylamide

Légende

1 et 2	89495
3	89493
4	89523
5	89505
6	89520
7	89534
8	89522
9	89514
10	89503
11	89525

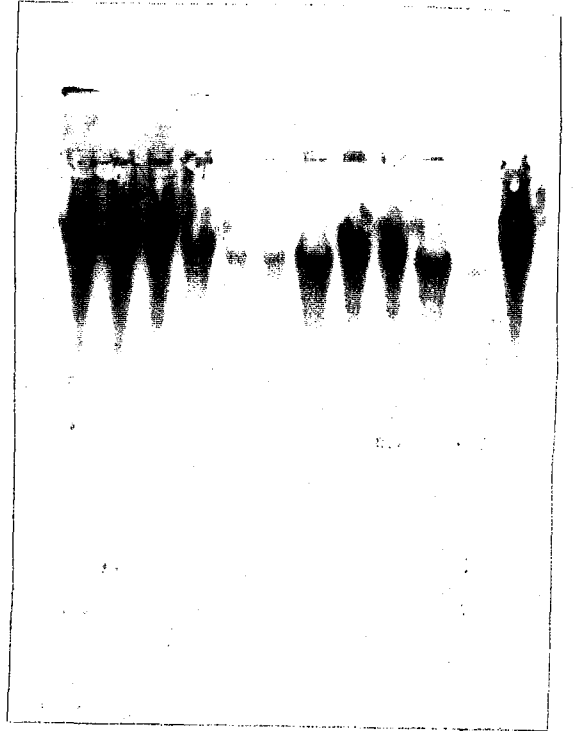
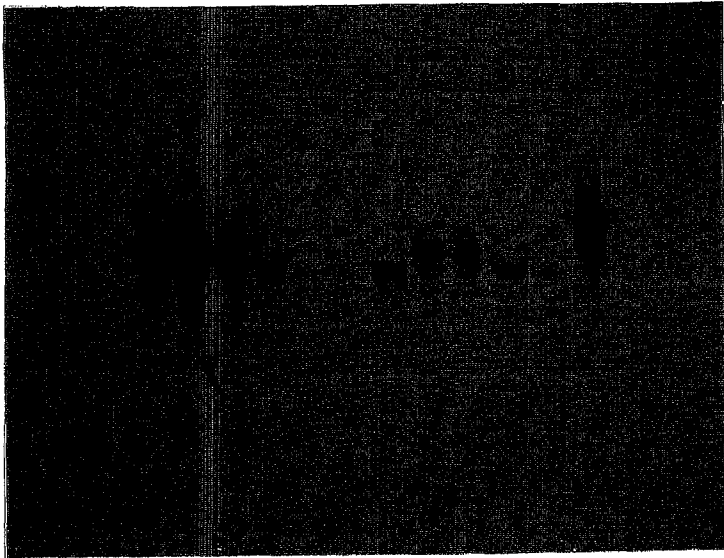


Figure (10) et (11) Hybridation ADN-ADN d'une sonde de Serratia préparée par clonage au hasard (marquage par luninescence) et après transfert de Southern

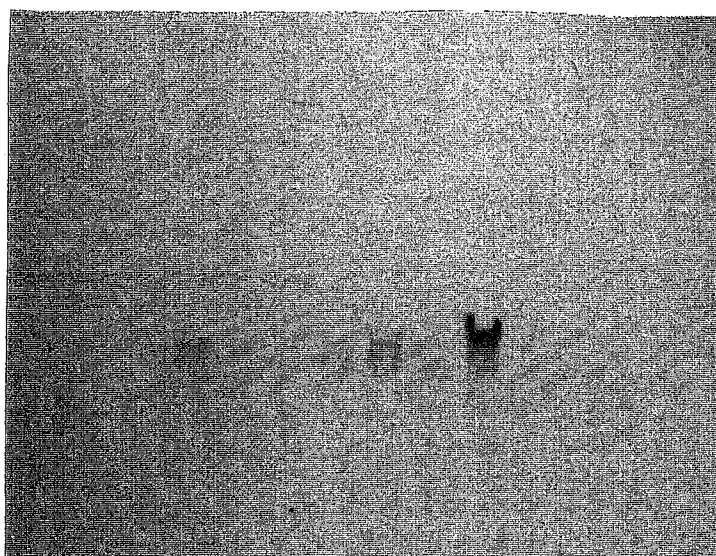


Figure (12) Hybridation ADN-ARN après transfert de Southern  
(ADN de Serratia et sonde ARN 16 S + 23 S  
marquée par la technique de luminescence



(10 mg/ml), aucun transformant n'a pu être mis en évidence ce qui évoque une résistance d'origine chromosomique comme décrit dans la littérature. D'une manière générale, l'extraction des plasmides et l'estimation de leur taille en gel d'agarose ne permet que de présumer de leur identité.

Par ailleurs les profils de restriction plasmidiques obtenus par digestion enzymatique sont, eux très caractéristiques. C'est ainsi qu'on a pu montrer l'existence de plasmides cryptiques de taille identique mais de nature différente chez P. aeruginosa (163) cependant il existe des souches dépourvues de plasmides.

La restriction du chromosome n'est intéressante que dans de rares cas ou l'on peut mettre en évidence des profils de restriction strictement identiques. Le phénomène de restriction peut dans certains cas être inhibé ceci est due à l'absence de sites spécifiques aux enzymes utilisés ou aux méthylases.

Ces dernières sont des enzymes qui reconnaissent les mêmes sites que les enzymes de restriction. L'ADN est méthylé au carbone 5 de quelques adénines ou au niveau de l'azote 6 de quelques cytosines.

### 3.2.6. sondes et hybridation

Les fragments d'ADN ont été clonés au hasard dans les vecteurs pUC 19 et pBR 322, et utilisés comme sonde pour visualiser des profils de restriction de l'ADN des autres souches préalablement clivés et transférés sur membrane. Cette technique a été appliquée sur les souches de Klebsiella. Après hybridation lavage et détection, aucun résultat n'a été observé en utilisant les deux techniques de marquage précédemment décrites. Ceci étant peut être due à un manque de sensibilité entre la sonde et les ADN, à un échec du transfert de l'ADN cible sur la membrane ou encore à un échec de l'hybridation et de la détection.

La même technique a été utilisée pour l'identification des Serratia. Les sondes choisies sont spécifiques et montrent une grande sensibilité par ailleurs les profils d'hybridation obtenus ne sont pas identiques pour toutes les souches.

Le signal est faible et un pré-flachage du film augmenterait la sensibilité et linéariserait sa réponse. La vérification de la température d'hybridation est impérative à ce niveau là. Elle ne doit pas exécutée à 42°C. Le bruit de fond est élevé.

### 3.2.7 Identification de Campylobacter jejuni par une sonde biotylinée

Bollet, C., Bouchemal, H. and Ph. De Micco. Identification de Campylobacter jejuni par une sonde biotylinée. Laboratoire de microbiologie et d'hygiène hospitalière, Hôpital Salvator, 249 bd sainte Marguerite 13009 Marseille

Les gastroentérites aiguës dues aux bactéries du genre Campylobacter sont parmi les causes les plus fréquentes de diarrhées dans le monde (13). Le diagnostic de l'espèce est indispensable à la connaissance de la pathogénicité des différentes espèces.

Les difficultés du diagnostic, ont conduit plusieurs auteurs à proposer l'emploi de sondes nucléiques d'identification.

Les auteurs ont évalué une sonde à ADN biotinylée destinée à l'identification de C. jejuni en culture (ENZO Biochem). Les hybrides sont détectés par la streptavidine liée à la peroxyde de raifort.

Seize souches de C. jejuni, dont la souche type, 24 souches d'autres espèces de Campylobacter, et 59 souches appartenant à d'autres genres bactériens ont été étudiées .

La sonde est d'une grande sensibilité (100 %), et d'une grande spécificité (100 % dans le genre Campylobacter et Helicobacter. Toutes les souches de C. jejuni étudiées fournissent un signal fort. Trois réactions faiblement positives ont été obtenues avec des souches n'appartenant pas au genre Campylobacter

## INTRODUCTION

Les gastroentérites aiguës dues aux bactéries du genre Campylobacter sont parmi les causes les plus fréquentes de diarrhées dans le monde [13]. Il n'est pas facile de les différencier cliniquement des infections intestinales causées par d'autres bactéries entéro-invasives capable de survivre dans les cellules intestinales sans les détruire (Salmonella, Yersinia). Certaines shigelloses sont également cliniquement voisines (faible réaction inflammatoire, diarrhées sans émission de sang, de leucocytes, ou fragments de muqueuse desquamée).

Cette différenciation incombe au biologiste, qui doit pouvoir réaliser l'identification du genre et de l'espèce en cause :

- Le traitement nécessite l'identification préalable du genre bactérien : si une entérite à Salmonella nécessite la réalisation préalable de l'antibiogramme, le traitement d'une shigellose est habituellement l'ampicilline (qui est inactive sur Yersinia), alors que celui d'une entérite à Campylobacter est classiquement l'érythromycine ou les tétracyclines. Ce diagnostic de genre nécessite l'ensemencement sur milieu sélectif (le plus utilisé est celui de Skirrow [19] en microaérophilie, puis l'étude morphologique des bactéries possédant une oxydase et une catalase : les bactéries du genre Campylobacter ont l'aspect de petits bacilles fins, à Gram négatif, en forme de "S" ou de longue spire, très mobiles (en "tire-bouchon"). Cette morphologie caractéristique manque parfois, en particulier dans les cultures âgées de plus de 48h.

- Le diagnostic d'espèce est indispensable à la connaissance de la pathogénicité des différentes espèces. Il est un préalable indispensable au marquage épidémiologique. Il repose sur quelques tests biochimiques et culturels, dont on sait maintenant qu'ils peuvent être mis en échec : souches de C. jejuni n'hydrolysant pas l'hippurate de sodium [6,17], C. jejuni et C. coli résistants à l'acide nalidixique [1,6].

Ces difficultés ont conduit plusieurs auteurs à proposer l'emploi de sondes nucléiques d'identification, d'autant que le genre Campylobacter est bien distinct des genres voisins [3]. De plus, les différentes espèces ne présentent entre elles qu'un faible pourcentage d'homologie de l'ADN [3,5,6].

Dés 1981, Owen et Leaper [10] ont proposé d'utiliser le chromosome bactérien entier comme sonde d'hybridation ADN/ADN. Par la suite, Harvey et Greenwood [5], puis Hébert et coll. [6] étudièrent la position taxonomique des souches atypiques ou d'espèces nouvelles grâce à des sondes d'ADN génomique total. En 1989, Chevrier et coll. proposèrent une série de sondes génomiques marquées à l'acétyl-amino-fluorène, permettant de

s'affranchir des contraintes liées à la radioactivité [3]. L'inconvénient de ces sondes est leur hétérogénéité : la taille des fragments de chromosome varie en fonction des conditions d'extraction de l'ADN. L'extraction et la purification de l'ADN de Campylobacter sont en outre fastidieuses [3] et ne peuvent être proposées pour un usage courant.

Pour faciliter la mise en oeuvre de l'identification ADN/ADN, il fallait recourir au clonage, qui fut réalisé en 1988 par Korolik et coll. [8], utilisant comme vecteur le plasmide pBR322. La sonde obtenue permettait de différencier C. jejuni des autres espèces de Campylobacter, à l'exception de C. coli. Par ailleurs cette sonde utilisait un marquage au 32P et ne pouvait donc être utilisée en routine [2].

Nous avons étudié une sonde obtenue par clonage chez Escherichia coli, marquée par le système biotine-avidine.

## MATERIELS ET METHODES

### Souches testées

#### Souches de référence

10 souches-types de Campylobacter et Helicobacter ont été utilisées comme référence. Aux espèces ou sous-espèces figurant dans la 9<sup>e</sup> édition du Bergey's Manual [15] nous avons ajouté les souches-types de C. fecalis et de C. laridis, de description plus récente [13] et la souche de type de Helicobacter pylori (Campylobacter pylori) [7]. L'origine des souches est précisée dans le tableau I.

#### Souches provenant de produits pathologiques

28 souches de Campylobacter et 2 souches d'Helicobacter ont été isolées de selles ou d'hémocultures ou de prélèvements gastriques sur milieu de Skirrow (Campyloset, bioMérieux, Marcy-l'Etoile) ou sur gélose Chocolat Polyvitex (bioMérieux) (Tableau II).

#### Souches témoins d'hybridation non spécifique

Nous avons utilisé 12 souches de référence (voir tableau I) et 47 souches provenant de produits pathologiques appartenant à des espèces bactériennes retrouvées fréquemment dans des selles normales ou pathologiques (Salmonella Typhimurium, S. Typhi, Shigella dysenteriae, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio parahaemolyticus, Bacteroides fragilis, Bacteroides thetaiotaomicron, Clostridium perfringens), ou présentant un pourcentage élevé d'homologie de l'ARN 16S avec Campylobacter : Wolinella curva, Bacteroides gracilis, Bacteroides ureolyticus [13].

### Méthode utilisée pour les cultures

Les cultures ont été obtenues sur gélose Chocolat Polyvitex (bioMérieux). La microaérophilie a été maintenue en utilisant des sachets générateurs (Oxoid, Basinstoke, England) en jarres anaérobies étanches.

### Méthode d'identification

Les souches provenant de produits pathologiques ont été identifiées grâce aux tests biochimiques et culturels décrits dans la littérature [19] : croissance à 25°C et à 42°C, production d'H<sub>2</sub>S sur milieu d'Hajna Kligler (bioMérieux), recherche d'une catalase, recherche d'une uréase, étude de la sensibilité à l'acide nalidixique (30ug) et à la céphalotine (30 ug) (Pasteur Diagnostic, Marnes-la Coquette), hydrolyse de l'hippurate et de l'ADN.

### Sonde utilisée

La sonde (Enzo Biochem, New York) a été obtenue de la manière suivante : une bibliothèque de fragments chromosomiques d'une souche de *C. jejuni* provenant d'une selle a été constituée par clonage au hasard après coupure par Sau3A en utilisant comme vecteur le phage lambda EMBL4, et comme hôte *E. coli* NM538. Le fragment le plus intéressant a été coupé par EcoRI et sub-cloné dans le plasmide pIBI-76 hébergé par *E. coli* JM109, fournissant 4 fragments de 3,8, 3,5, 2,3, et 1,05 kb. Le fragment de 2,3 kb a été choisi au vu d'hybridations avec les ADN génomiques extraits des souches-types de *C. jejuni* (ATCC 33560), *C. laridis* (ATCC 35221), *C. fetus* (ATCC 27374), *C. coli* (ATCC 33559), en utilisant comme témoins négatifs l'ADN de *E. coli* NM539 et de l'ADN extrait de thymus de veau.

Cette sonde a été marquée par incorporation de dUTP biotinylée. La révélation des hybrides formés utilise le complexe streptavidine-peroxydase de raifort. La fixation de la sonde se traduit par la précipitation d'un réactif chromogène, le 3-amino-9-éthylcarbazole.

### Extraction de l'ADN cible

#### Extraction standard

Les ADN provenant des souches-types de *Campylobacter* et des souches utilisées comme témoin d'hybridation non spécifiques ont été extraits de la manière suivante : une culture de 48h en boîte de Roux est reprise dans du tampon TE à pH 8,0 [4], centrifugée, puis remise en suspension dans du tampon TE. Les bactéries sont soumises à l'action du lysozyme à 37°C à une concentration de 2mg/ml (Boehringer-Mannheim, Meylan), puis du SDS à 0,5% (1h à 60°C, avec agitation). Les protéines sont extraites par le

mélange phénol/chloroforme |4|. Les acides nucléiques sont précipités par de l'éthanol conservé à -20°C. L'ARN est éliminé par traitement à la RNase (Boehringer-Mannheim) à une concentration de 50ug/ml. Après centrifugation, l'ADN est dissous à 65°C dans de l'eau distillée stérile.

#### Obtention de lysats rapides

Une colonie âgée de 48 heures obtenue par culture en micro-aérophilie est mise en suspension dans 50 ul de tampon TE en tube Eppendorf de 1,5 ml, puis lysée par le SDS (200 ul d'une solution contenant 1% de SDS dans du tampon TE, 30 minutes à 60°C). Après centrifugation (10000 g, 5 mn), le surnageant est repris et déposé sur la membrane.

#### Méthode d'hybridation

##### Dot-blot

20 ul d'ADN cible ou de lysat rapide sont déposés sur membrane Nylon Nytran (Cera Labo, Aubervilliers) au moyen d'un appareil à blotter Schleicher & Schuell (Cera-Labo), puis fixés de façon covalente par action de radiations UV à 302 nm (3 mn).

#### Préhybridation

La saturation des sites non spécifiques de la membrane est réalisée à 42°C pendant 2h, dans une solution à 50% de formamide désionisée, 5xDenhardt's, 0,1% SDS, 5xSSC, 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon.

#### Hybridation

L'hybridation dure une nuit à 42°C. On utilise le même mélange que pour la préhybridation, auquel on ajoute 0,2 ug/ml de sonde dénaturée 3 minutes à 100°C.

#### Lavages

On effectue en tout 5 lavages, avec agitation :

- 2 lavages de 15 minutes à température ordinaire en 2xSSC, 0,1% SDS;
- 2 lavages en conditions stringentes de 15 minutes à 60°C en 0,1xSSC, 0,1%SDS ;
- 1 lavage de 30 secondes à température ordinaire, en 2xSSC.

### Mise en évidence des hybrides

Le complexe streptavidine-peroxydase est ajouté à la dilution de 1/250 dans un tampon 1xPBS, 10% BSA, 5mM EDTA |4|. Après 30 minutes, on effectue deux lavages en 4xSSC, puis 2xSSC. Le chromogène (3-amino-9-éthylcarbazole) est ajouté à la concentration de 400ug/ml en tampon 0,1M acétate de sodium à pH 4,9, en présence de 0,025% de peroxyde d'hydrogène. Une coloration rouge brique apparaît en 30 minutes à 3 heures.

### RESULTATS

La figure 1 montre un exemple de dot-blot et le tableau III le résultat des hybridations. La totalité des ADN et des lysats rapides des souches de C. jejuni ont été reconnus par la sonde. Il n'y a pas de différence visible entre les signaux obtenus avec les DNA et ceux donnés par les lysats rapides. Aucune souche de C. coli n'a été reconnue par la sonde. Aucune autre espèce de Campylobacter n'a été reconnue, ni en utilisant les lysats rapides ni en utilisant les ADN purifiés. La sonde n'a pas reconnu les 3 souches de Helicobacter pylori. Quelques réactions faiblement positives ont été obtenues avec des ADN de souches appartenant aux espèces suivantes : E. coli (souche ATCC 11775), C. freundii (souche ATCC 8090), B. ureolyticus (souche ATCC 33387). Cette dernière espèce est très voisine de Campylobacter, comme l'ont montré Paster et Dewhirst par séquençage de l'ARN 16S |10|. La sensibilité est de 100% pour C. jejuni. La spécificité est de 96% pour les souches n'appartenant pas aux genres Campylobacter et Helicobacter. Elle est de 100% à l'intérieur des genres Campylobacter et Helicobacter.

### CONCLUSION

Cette sonde apparaît spécifique et sensible. Le manque de spécificité pour les souches appartenant à d'autres genres que Campylobacter et Helicobacter n'est pas gênant si le type respiratoire de la souche est vérifié avant hybridation. Le système de lyse rapide que nous proposons donne des résultats satisfaisants, comparable à ceux obtenus avec des ADN purifiés. L'ensemble des opérations prend environ 18h, ce qui permet d'envisager un usage courant de cette sonde.

**IDENTIFICATION OF CAMPYLOBACTER JEJUNI BY USING A BIOTINYLATED PROBE**

**SUMMARY :** We evaluated a DNA biotinylated probe for the rapid identification of Campylobacter jejuni in culture (ENZO BIOCHEM, New York). The hybridized biotinylated DNA probe is detected by its interaction with streptavidin linked to horseradish peroxidase. 16 strains of C. jejuni, including type strain, 24 strains of other Campylobacter and Helicobacter species, and 59 strains of other genera were studied. The probe was highly sensitive (100%) and specific (100% inside the genera Campylobacter and Helicobacter). All Campylobacter strains gave strong signals, and only three weak signals were observed with non-Campylobacter strains. Our results indicate that specific recombinant DNA probe should offer a reliable and rapid method for routine diagnosis of Campylobacter jejuni enteritis.

**KEY-WORDS :** Probe. - Hybridization. - Campylobacter - Campylobacter jejuni.

**IDENTIFICATION DE CAMPYLOBACTER JEJUNI PAR UNE SONDE BIOTINYLEE**

**RESUME :** Les auteurs ont évalué une sonde à ADN biotinylée destinée à l'identification de Campylobacter jejuni en culture (ENZO BIOCHEM). Les hybrides sont détectés par la streptavidine liée à la peroxydase de raifort. Seize souches de C. jejuni, dont la souche type, 24 souches d'autres espèces de Campylobacter, et 59 souches appartenant à d'autres genres bactériens ont été étudiées. La sonde est d'une grande sensibilité (100 %), et d'une grande spécificité (100% dans les genres Campylobacter et Helicobacter). Toutes les souches de C. jejuni étudiées fournissent un signal fort. Trois réactions faiblement positives ont été obtenues avec des souches n'appartenant pas au genre Campylobacter.

**MOTS-CLES :** Sonde. - Hybridation. - Campylobacter - Campylobacter jejuni.



TABLEAU I - Origine des souches de référence utilisées dans cette étude

Espèce	Origine
<u>Campylobacter fetus</u> subsp. <u>fetus</u>	CIP 5396 (ATCC 27374, type)
<u>C. fetus</u> subsp. <u>venerealis</u>	CIP 6829 (ATCC 19438, type)
<u>C. jejuni</u>	CIP 702 (ATCC 33560, type)
<u>C. coli</u>	CIP 7080 (ATCC 33559, type)
<u>C. sputorum</u> subsp. <u>bubulus</u>	CIP 53103 (ATCC 33562, type)
<u>C. sputorum</u> subsp. <u>mucosalis</u>	NCTC 11001 (LMG 6448, (type)
<u>C. concisus</u>	ATCC 33237 (type)
<u>C. fecalis</u>	CIP 8105 (ATCC 33709)
<u>C. laridis</u>	NCTC 11352, (ATCC 35221, type)
<u>Helicobacter pylori</u>	CIP 101260 (ATCC 43504, type)
<u>Salmonella</u> Typhimurium	CIP 5858 (ATCC 13311, type)
<u>Shigella dysenteriae</u>	CIP 5728 (ATCC 13313, type)
<u>Escherichia coli</u>	CIP 548 (ATCC 11775, type)
<u>Enterobacter cloacae</u>	CIP 6085 (ATCC 13047, type)
<u>Citrobacter freundii</u>	CIP 5732 (ATCC 8090, type)
<u>Serratia marcescens</u>	CIP 6755
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CIP 6352 (ATCC 10145, type)
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	CIP 7502 (ATCC 17802, type)
<u>Wolinella recta</u>	ATCC 33238, type
<u>Bacteroides gracilis</u>	ATCC 33236, type
<u>Bacteroides ureolyticus</u>	ATCC 33387, type
<u>Bacteroides fragilis</u>	CIP 7716 (ATCC 25285, type)

TABLEAU II - Souches provenant de produits pathologiques

	Nombre de souches
<u>Campylobacter fetus</u> subsp. <u>fetus</u>	7
<u>C. jejuni</u>	15
<u>C. coli</u>	5
<u>C. laridis</u>	1
soit 28 souches de <u>Campylobacter</u>	
<u>Helicobacter pylori</u>	2
<u>Escherichia coli</u>	14
<u>Citrobacter freundii</u>	5
<u>Serratia marcescens</u>	5
<u>Salmonella Typhi</u>	1
<u>Vibrio cholerae</u>	2
<u>Shigella dysenteriae</u>	2
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	12
<u>Bacteroides fragilis</u>	1
<u>Bacteroides thetaiotaomicron</u>	1
<u>Clostridium perfringens</u>	4
soit 47 souches n'appartenant pas aux genres <u>Campylobacter</u> et <u>Helicobacter</u>	

Fig. 1. - Exemple de dot-blot

La sonde a été déposée aux quatres coins de la membrane pour en faciliter la lecture et éliminer un éventuel effet de position.

- Colonne B : dilution successives au 1/10 de la sonde elle-même  
 Colonne C : C1 : Campylobacter jejuni ATCC 19438 (type)  
 C2 à C8 : C. jejuni de produits pathologiques  
 Colonne D : D1 à D8 : lysats rapides obtenus à partir des souches de la colonne C  
 Colonne E : E1 : C. coli ATCC 33559 (type)  
 E2 à E8 : C. coli de produits pathologiques  
 Colonne F : F1 à F8 : lysats rapides obtenus à partir des souches de la colonne E  
 Colonne G : G1 : C. fetus subsp. fetus ATCC 27374  
 G2 : C. fetus subsp. venerealis ATCC 19438  
 G3 : C. sputorum subsp. bubulus ATCC 33562  
 G4 : C. sputorum subsp. mucosalis LMG 6448  
 G5 : C. concisus ATCC 33237  
 G6 : C. fecalis ATCC 33709  
 G7 : C. laridis ATCC 35221  
 G8 : Helicobacter pylori ATCC 43504  
 Colonne H : H1 : Salmonella Typhimurium ATCC 13311  
 H2 : Shigella dysenteriae ATCC 13313  
 H3 : Escherichia coli ATCC 11775  
 H4 : Enterobacter cloacae ATCC 13047  
 H5 : Citrobacter freundii ATCC 8090  
 H6 : Serratia marcescens CIP 6755  
 H7 : Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145  
 H8 : Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802  
 Colonne I : libre  
 Colonne J : J1 : Wolinella recta ATCC 33238  
 J2 : Bacteroides gracilis ATCC 33236  
 J3 : Bacteroides fragilis  
 J4 : Bacteroides thetaiotaomicron  
 J5 : Bacteroides ureolyticus ATCC 33387  
 J6 : Bacteroides fragilis ATCC 25285

Colonne K : libre

Figure t3 - Exemple de dot-blot

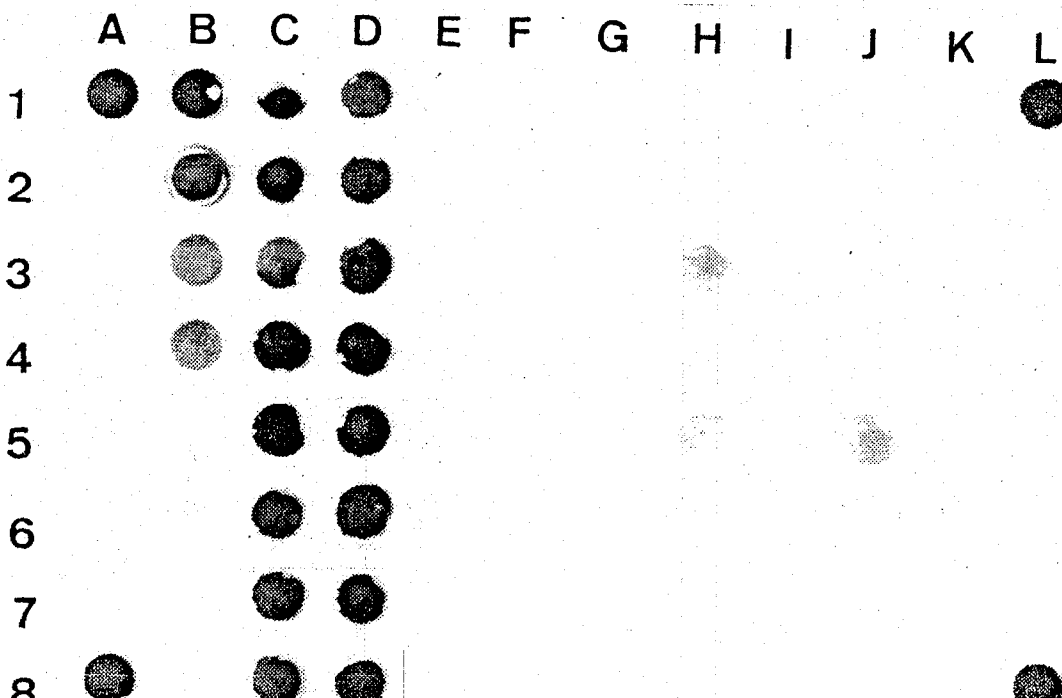


TABLEAU III - Résultats des hybridations

		nombre	ADN positifs	lysats positifs
<u>Campylobacter jejuni</u>	Référence	1	1	1
	Hospitalières	15	15	15
autres <u>Campylobacter</u>	Référence	9	0	0
	Hospitalières	15	0	0
autres bactéries	Référence	12	3*	3*
	Hospitalières	47	0	0

\* réaction très faible

Sensibilité : 16/16 : 100%  
 Spécificité : 80/83 : 96%

Fig. 1. - Example of dot-blot hybridization.

The probe was spotted in A1, A8, L1, L8 to insure the lecture of the filter.

Column B : successive 1:10 dilutions of the probe

Column C : C1 : Campylobacter jejuni ATCC 19438 (type strain)

C2 to C8 : C. jejuni from pathological samples

Column D : D1 to D8 : rapid lysis of the strains of column C

Column E : E1 : C. coli ATCC 33559 (type)

E2 to E8 : C. coli de produits

pathologiques

Column F : F1 to F8 :

rapid lysis of the strains of column E

Column G : G1 : C. fetus subsp. fetus ATCC 27374

G2 : C. fetus subsp. venerealis ATCC 19438

G3 : C. sputorum subsp. bubulus ATCC 33562

G4 : C. sputorum subsp. mucosalis LMG 6448

G5 : C. concisus ATCC 33237

G6 : C. fecalis ATCC 33709

G7 : C. laridis ATCC 35221

G8 : Helicobacter pylori ATCC 43504

Column H : H1 : Salmonella Typhimurium ATCC 13311

H2 : Shigella dysenteriae ATCC 13313

H3 : Escherichia coli ATCC 11775

H4 : Enterobacter cloacae ATCC 13047

H5 : Citrobacter freundii ATCC 8090

H6 : Serratia marcescens CIP 6755

H7 : Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145

H8 : Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802

Column I : free

Column J : J1 : Wolinella recta ATCC 33238

J2 : Bacteroides gracilis ATCC 33236

J3 : Bacteroides fragilis

J4 : Bacteroides thetaiotaomicron

J5 : Bacteroides ureolyticus ATCC 33387

J6 : Bacteroides fragilis ATCC 25285

Column K : free

## REFERENCES

- 1 ALTWEGG M., BURNENS A., ZOLLINGER-ITEN J., PENNER J.L. - Problems in identification of Campylobacter jejuni associated with acquisition of resistance to nalidixic acid. J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1807-1808.
- 2 BOLLET C., BOUCHEMAL H., BOUTEFNOUCHET N., de MICCO Ph. - Evaluation d'une sonde biotinylée pour la détection de Neisseria gonorrhoeae. Path. Biol., 1989, 37, 897-900.
- 3 CHEVRIER D., LARZUL D., MEGRAUD F., GUESDON J.L. - Identification and classification of Campylobacter strains by using nonradioactive DNA probes. J. Clin. Microbiol., 1989, 27, 321-326.
- 4 DAVIES L.G., DIBNER M.D., BATTEY J.F. - Basic methods in molecular biology., New York, Elsevier, 1986.
- 5 HARVEY S.M., GREENWOOD J.R. - Relationships among catalase-positive Campylobacter determined by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol., 1983, 33, 275-284.
- 6 HEBERT G.A., EDMONDS P., BRENNER D.J. - DNA relatedness among strains of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli with divergent serogroup and hippurate reactions. J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 138-140.
- 7 GOODWIN C.S., ARMSTRONG J.A., CHILVERS T., PETERS M., COLLINS M.D., SLY L., McCONNELL W., HARPER W.E.S. - Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Bacteriol., 1989, 39, 397-405.
- 8 KOROLIK, V., COLOE, P.J., KRISHNAPILLAI, V. - A specific DNA probe for the identification of Campylobacter jejuni. J. Gen. Microbiol., 1988, 134, 521-529.
- 9 LAI-KING, N., STILES, M.E., TAYLOR, D.E. - Classification of Campylobacter strains using DNA probes. Mol. Cell. Probes, 1987, 1, 233-243.

- 10 OWEN, R.J., LEAPER, S. - Base composition, size and nucleotide sequence similarities of genome deoxyribonucleic acids from species of the genus Campylobacter. FEMS Microbiol. Lett., 1981, 12, 395-400.
- 11 OWEN R.J., DAWSON C. - DNA base compositions and base sequence relatedness of atypical Campylobacter jejuni strains from clinical material. FEMS Microbiol. Lett., 1986, 35, 283-287.
- 12 PASTER B.J., DEWHIRST F.E. - Phylogeny of Campylobacters, Wolinellas, Bacteroides gracilis, and Bacteroides ureolyticus by 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing. Int. J. Syst. Bacteriol., 1988, 38, 56-62.
- 13 PENNER, J.L. - The genus Campylobacter : a decade of progress. Clin. Microbiol. Rev., 1988, 1, 157-172.
- 14 PICKEN, R.N., WANG, Z., YANG, H.L. - Molecular cloning of a species-specific DNA probe for Campylobacter jejuni. Mol. Cell. Probes, 1987, 1, 245-259.
- 15 SMIBERT R.M. - Campylobacter. In : KRIEG N.R., HOLT G.-Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1, pp. 111-118. Baltimore, Williams and Wilkins, 1984.
- 16 TENOVER F.C. - Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev., 1988, 1, 82-101.
- 17 TOTTEN P.A., PATTON C.M., TENOVER F.C., BARNETT T.J., STAMM W.E., STEIGERWALT A.G., LIN J.Y., HOLMES K.K., BRENNER D.J. - Prevalence and characterization of hippurate-negative Campylobacter jejuni in King County, Washington. J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1747-1752.
- 18 VERON M., CHATELAIN, R. - Taxonomic study of the genus Campylobacter Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, Campylobacter fetus (Smith and Taylor) Sebald and Véron. Int. J. Syst. Bacteriol., 1973, 23, 122-134.
- 19 VERON M. - Campylobacter. In : LE MINOR L., VERON M. - Bactériologie Médicale, pp. 474-484. Paris, Flammarion, 1982.

3.2.8. Evaluation d'une sonde biotinylée pour l'identification de Neisseria gonorrhoeae

Bollet, C., Grandguillot, M., Bouchemal, H., Boutefnouchet, N. and Ph. De Micco. 1989. Evaluation d'une sonde biotinylée pour l'identification de Neisseria gonorrhoeae. Path. Biol. N°8:897-900.

Neisseria gonorrhoeae (Trevisan 1887) a été reconnue comme étant l'agent de la blénnorragie, il y a plus qu'un siècle, mais sa culture et son identification dans les laboratoires de biologie médicale restent souvent problématiques.

Elle apparait donc comme une des espèces bactériennes désignées pour l'utilisation de sondes d'identification.

Notre étude a été réalisée sur 21 souches de la collection dont 5 souches de Neisseria gonorrhoeae incluant la souche type. 57 souches d'autres espèces du genre Neisseria, et 104 souches appartenant à d'autres genres bactériens ont été étudiées. La sonde s'est révélée très sensible (100 %) et spécifique (96%). Toutes les souches de N. gonorrhoeae donnent un signal net. Deux réactions croisées ont été observées avec N. lactamica, qui taxonomiquement proche de N. gonorrhoeae.

Cette sonde constitue une méthode rapide d'utilisation facile pour l'identification en routine de N. gonorrhoeae.



# ÉVALUATION D'UNE SONDE BIOTINYLÉE POUR L'IDENTIFICATION DE *Neisseria gonorrhoeae*

C. BOLLET, M. GRANDGUILLOT,  
H. BOUCHEMAL, N. BOUTEFNOUCHET,  
Ph. de MICCO

BOLLET C., GRANDGUILLOT M., BOUCHEMAL H.,  
BOUTEFNOUCHET N., MICCO Ph. (de). — Evaluation d'une  
sonde biotinylée pour l'identification de *Neisseria gonorrhoeae*.

*Path Biol*, 1989, 37, n° 8, 897-900.

**RÉSUMÉ :** Les auteurs ont évalué une sonde à ADN biotinylée destinée à l'identification de *Neisseria gonorrhoeae* en culture. Vingt-et-une souches de *N. gonorrhoeae* (dont la souche-type), 57 souches d'autres espèces du genre *Neisseria*, et 104 souches appartenant à d'autres genres bactériens ont été étudiées. La sonde s'est révélée très sensible (100 %) et spécifique (96 %). Toutes les souches de *N. gonorrhoeae* donnent un signal net. Deux réactions croisées ont été observées avec *N. lactamica*, qui est taxonomiquement proche de *N. gonorrhoeae*. Cette sonde constitue une méthode rapide d'utilisation facile pour l'identification en routine de *Neisseria gonorrhoeae*.

**MOTS-CLÉS :** Sonde. — Hybridation. — *Neisseria*. — *Neisseria gonorrhoeae*.

BOLLET C., GRANDGUILLOT M., BOUCHEMAL H.,  
BOUTEFNOUCHET N., MICCO Ph. (de). — Evaluation of a  
biotinylated probe for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. (In  
French).

*Path Biol*, 1989, 37, n° 8, 897-900.

**SUMMARY :** We evaluated a DNA biotinylated probe for the rapid identification of *Neisseria gonorrhoeae* in culture (Ortho Diagnostics System, Raritan, NJ). Twenty-one strains of *N. gonorrhoeae*, including type strain, 57 strains of other *Neisseria* species, and 104 strains of other genera were studied. The probe was highly sensitive (100 %) and specific (96 %). All *N. gonorrhoeae* strains gave strong signals, and only two cross-reaction were observed with *N. lactamica*, which has a close genetic relationship to *N. gonorrhoeae*. Our results indicate that specific recombinant DNA probe should offer a reliable and rapid method for routine diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*.

**KEY-WORDS :** Probe. — Hybridization. — *Neisseria*. — *Neisseria gonorrhoeae*.

## INTRODUCTION

*Neisseria gonorrhoeae* (Trevisan 1885) a été reconnu comme étant l'agent de la blennorragie il y a plus d'un siècle, mais sa culture et son identification dans les laboratoires de Biologie Médicale restent souvent problématiques : certaines souches sont sensibles aux antibiotiques contenus dans le milieu de Thayer et Martin (colistine, nystatine, vancomycine) [7, 11], certaines ne sont pas reconnues par les méthodes immunologiques spécifiques, telles le Phadebac test, ou donnent des résultats interprétables lors de l'étude des fermentations des sucres (souches ne fermentant pas le glucose) [2, 8].

*Neisseria gonorrhoeae* apparaît donc comme une des espèces bactériennes désignées pour l'utilisation de sondes d'identification [8].

Les sondes à ADN sont des fragments d'acide nucléique, marqués par un élément radioactif (sondes « chaudes ») ou par un composé réactif non radioactif (sondes « froides »). Dans certaines conditions, elles s'unissent par liaisons hydrogènes à de l'ADN ou de l'ARN présentant la séquence complémentaire de la leur (les molécules d'adénine s'associent à la thymine, la cytosine à la guanine).

Cette réaction par laquelle une molécule à double brin est formée par association de deux molécules simple brin de séquences complémentaires est appelée hybridation.

Laboratoire de Microbiologie et d'Hygiène Hospitalière, (P<sup>r</sup> Ph. de Micco), Hôpital Salvator, 249, bd Sainte-Marguerite, 13277 MARSEILLE Cedex 09 (France).

Manuscrit reçu à la Rédaction le 18 octobre 1988. Accepté modifié le 13 juillet 1989.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La première sonde pour *Neisseria gonorrhoeae* (Totten et coll., 1983) [9] était constituée du plasmide cryptique de 2,6 mégadaltons, d'origine endogène, porté par la majorité des souches de *N. gonorrhoeae* (à l'exception de l'auxotype PCU, exigeant en proline, citrulline et uracile). Le marquage isotopique par le phosphore 32 utilisait la technique de translation de coupure (« nick-translation »). La sensibilité de cette sonde était de 89 %, sa spécificité de 100 %. Elle était capable de détecter environ 100 unités formant colonies, soit environ 0,1 pg de DNA ; mais elle ne pouvait évidemment reconnaître les souches dépourvues de ce plasmide [8].

Le marquage isotopique n'est pas une solution réaliste pour une activité biologique de routine. Les contraintes liées à la législation concernant l'emploi des substances radioactives en limitent fortement l'utilisation. Par ailleurs, le 32P a une demi-vie de l'ordre de 14 jours, nécessitant des marquages fréquents. L'usage d'isotopes à durée de vie plus longue est de peu d'intérêt, car les phénomènes de radiolyse limitent la conservation des sondes à un mois au maximum.

Pour éviter ces inconvénients, des systèmes de marquage non-radioactifs ont été développés. Le premier et le plus connu est le système biotine-avidine. Dans cette méthode, un nucléotide marqué, (désoxyuridine 5'-triphosphate ou désoxythymidine 5'-triphosphate biotinylées) est incorporé dans la sonde par « nick-translation ». Après hybridation, on ajoute un système de détection, généralement constitué d'une enzyme (péroxydase de raifort) liée à de l'avidine (ou à des anticorps anti-biotine) et le substrat de l'enzyme (3,3', 5,5' tétraméthylbenzidine ou TMB) [8].

Nous avons testé une sonde de ce type, destinée à l'identification de *Neisseria gonorrhoeae* en culture [1, 5].

Souches testées

- Nous avons évalué cette sonde en utilisant :
- 23 souches de *Neisseria* de collection (tableau I), dont 5 souches de *N. gonorrhoeae* incluant la souche-type ;
  - 48 souches de *Neisseria* provenant de prélèvements pathologiques (liquide céphalo-rachidien, liquides de ponction, urines, prélèvements vaginaux et urétraux), 11 souches de *N. gonorrhoeae*, 8 souches de *N. meningitidis*, ainsi que 29 souches de *Neisseria* saprophytes des cavités naturelles (*N. sicca*, *N. lactamica*, *N. mucosa*, *N. flava*, *N. perflava*) ;
  - des sub-cultures de souches non identifiées, provenant de prélèvements pathologiques reçus dans un laboratoire hospitalier et dans un laboratoire d'analyses de ville (34 prélèvements urétraux ou endo-cervicaux) ;
  - pour mettre en évidence d'éventuels faux-positifs, nous avons par ailleurs testé 104 souches de toute morphologie, à Gram négatif ou positif, susceptibles d'être retrouvées dans des prélèvements urétraux ou endo-cervicaux. Parmi ces souches se trouvent des représentants des genres *Acinobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Listeria*, *Providencia*, *Campylobacter*, *Gardnerella*, *Staphylococcus* cités par la documentation fournie par le fabricant comme pouvant être à l'origine de faux positifs.

Méthodes utilisées pour les cultures

Souches de référence

Les souches ont été ensemencées sur gélose Chocolat-Polyvitex (BioMérieux, Marcy-l'Étoile).

Isolats

Les produits pathologiques ont été ensemencés sur gélose VCF (vancomycine/colimycine/fungizone) (Institut Pasteur Production, Marnes-la-Coquette). Pour récupérer les souches éventuellement sensibles aux antibiotiques du milieu VCF, nous avons également ensemencé les prélèvements pathologiques sur gélose Chocolat-Polyvitex non sélectives (BioMérieux, Marcy-l'Étoile). Les colonies brunes à beiges en 48 heures ont été hybridées puis réisolées pour identification ultérieure (104 colonies, soit environ 3 colonies par prélèvement).

Méthode d'identification

Les souches provenant de produits pathologiques ont été identifiées grâce à la galerie *Neisseria* (Pasteur Diagnostic, Marnes-la-Coquette, référence 53770) et à la galerie NHI (Vitek Systems, Hazelwood, Minnesota, USA, référence 51-1308).

TABLEAU I. — Souches de collection de *Neisseria*.

Espèce	Numéro	Origine
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 19424 (type)	ATCC
<i>N. gonorrhoeae</i>	A 50	CIP
<i>N. gonorrhoeae</i>	A 51	CIP
<i>N. gonorrhoeae</i>	A 52	CIP
<i>N. gonorrhoeae</i>	67.18	CIP
<i>N. canis</i>	ATCC 14687 (type)	ATCC
<i>N. caviae</i> ( <i>Branhamella caviae</i> )	ATCC 14659 (type)	ATCC
<i>N. caviae</i>	52.185	CIP
<i>N. cinerea</i>	ATCC 14685 (type)	ATCC
<i>N. cuniculi</i> ( <i>B. cuniculi</i> )	73.17 (ATCC 14688, type)	CIP
<i>N. denitrificans</i>	72.16 (ATCC 14686, type)	CIP
<i>N. elongata</i> subsp <i>elongata</i>	72.27 (ATCC 25295, type)	CIP
<i>N. elongata</i> subsp <i>glycolytica</i>	82.85 (ATCC 25295, type)	CIP
<i>N. flava</i>	73.13 (ATCC 14221, type)	CIP
<i>N. flavescens</i>	73.15 (ATCC 13120, type)	CIP
<i>N. lactamica</i>	72.17 (ATCC 23970, type)	CIP
<i>N. lactamica</i>	73.27	CIP
<i>N. meningitidis</i>	73.10 (ATCC 13077, type)	CIP
<i>N. mucosa</i>	59.51 (ATCC 19696, type)	CIP
<i>N. ovis</i> ( <i>B. ovis</i> )	81.19 (ATCC 33078, type)	CIP
<i>N. perflava</i>	73.11 (ATCC 10555, type)	CIP
<i>N. sicca</i>	52.179 (ATCC 9913)	CIP
<i>N. subflava</i>	73.12 (ATCC 19243, type)	CIP

ATCC : American type culture collection. CIP : Collection de l'Institut Pasteur, Paris.

**Méthode d'hybridation**

Le coffret fourni par le fabricant (Ortho Diagnostics Systems, Raritan, New-Jersey, référence 565060) est prévu pour 60 tests. Il comprend les réactifs suivants :

- 20 languettes (« paddles ») supportant les pastilles (« dot ») où s'effectue l'hybridation ;
- 75 applicateurs à extrémité concave destinés à récupérer les colonies suspectes ;
- le réactif de lyse ;
- un neutralisant (0,6 M Tris/HCl) ;
- la sonde biotinylée ;
- le conjugué (complexe enzyme-avidine) ;
- le substrat de l'enzyme (TMB) ;
- le réactif permettant d'arrêter l'action de l'enzyme (azide de sodium) ;
- les différents tampons.

Les étapes de la réaction sont les suivantes :

- prélèvement d'une colonie isolée (cultures âgées d'au maximum 96 heures) sur milieu sélection ou non (Chocolat, Thayer-Martin,...) en utilisant les applicateurs fournis. La colonie récupérée est ensuite écrasée sur la pastille où s'effectuera l'hybridation ;
- lyse alcaline à 37°C pendant une minute. Le fabricant recommande l'utilisation de son dispositif chauffant (référence 565065). Il est également possible de manipuler dans une étuve de taille suffisante, ou mieux en chambre-étuve ;
- neutralisation pendant une minute à 37°C ;
- séchage au papier absorbant (« blot ») ;
- hybridation, pendant une minute à 37°C ;
- séchage au papier absorbant ;
- addition du conjugué, pendant une minute à 37°C ;
- lavage ;
- révélation par addition du substrat ;
- arrêt de la réaction enzymatique par action de l'azide de sodium pendant dix secondes ;
- séchage au papier absorbant ;
- lecture : un test positif se traduit par l'apparition d'une coloration bleue aux contours nets.

L'ensemble de ces étapes prend environ 10 minutes.

En tout, 279 tests ont été réalisés.

**RÉSULTATS**

Le tableau II donne les résultats concernant le genre *Neisseria*. La sensibilité est de 100 % pour *N. gonorrhoeae*. La spécificité est de 96 % pour l'ensemble des souches du genre *Neisseria*, due à deux résultats très faiblement positifs observés avec 2 souches identifiées à *N. lactamica* par la galerie *Neisseriae*. Ces fausses réactions positives s'expliquent si on note que l'étude de l'hybridation ADN:ADN et de la composition en acides gras ont fait apparaître des relations étroites entre *N. lactamica* et *N. gonorrhoeae* [4, 10].

La spécificité est de 100 % pour *N. meningitidis*. On sait pourtant que *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* sont taxonomiquement très proches : 80 % d'homologie pour Kingsbury et coll. [6], 93 % pour Hoke et Vedros [4]. Il apparaît que le fragment de chromosome cloné a été bien choisi.

Deux causes d'erreur existent :

- un inoculum trop important (colonie de plus de 2 mm de diamètre). Dans ces conditions, la lyse est incomplète, l'ADN est libéré en quantité trop faible ; l'hybridation est insuffisante pour permettre le développement de la coloration ;

TABLEAU II. — Résultats des souches.

Identification	Nombre de souches	ORTHOProbe	
		Positifs	Négatifs
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Collection	5	0
	Hospitalières	11	0
<i>Neisseria meningitidis</i>	Collection	1	1
	Hospitalières	8	8
Autres <i>Neisseriae</i>	Collection	17	15
	Hospitalières	29	29

Sensibilité : 16/16 = 100 %.

Spécificité : 53/55 = 96 % (autres *Neisseria*).

\* Réaction faiblement positive.

TABLEAU III. — Souches n'appartenant pas au genre *Neisseria*.

Espèces	Nombre de souches	Nombre de réactions positives
<i>Acinetobacter baumannii</i>	12	2
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	3	0
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	6	0
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	1	1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	1
<i>Comamonas testosteroni</i>	2	1
<i>Gardnerella vaginalis</i>	13	4
<i>Kingella kingae</i>	9	0
<i>Kingella denitrificans</i>	3	0
<i>Moraxella atlantae</i>	2	0
<i>Moraxella lacunata</i>	1	0
<i>Morganella morganii</i>	2	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0
<i>Proteus penneri</i>	3	0
<i>Proteus vulgaris</i>	7	1
<i>Providencia stuartii</i>	3	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	0
<i>Pseudomonas syringae</i>	3	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	1
<i>Staphylococcus xylosum</i>	2	0
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	5	1
<b>Total</b>	<b>104</b>	<b>16</b>

- des cultures âgées de plus de quatre jours donnent presque toujours de fausses réponses négatives.

Parmi les 34 prélèvements urétraux ou endo-cervicaux, 4 présentaient à l'examen direct des cocci à Gram négatif et contenaient *N. gonorrhoeae*.

*N. gonorrhoeae* fut également mise en évidence par la sonde dans un prélèvement de contrôle après traitement (spectinomycine, 2 g en IM). Les colonies, apparues en 48 heures, étaient de petite taille et n'évoquaient guère *N. gonorrhoeae*. Un réisolement permit à la souche de retrouver ces caractères phénotypiques affaiblis par le traitement.

Le tableau III montre les fausses réactions positives constatées avec diverses espèces bactériennes. Les plus nombreuses sont observées avec *Gardnerella vaginalis* (4 réactions positives pour 13 souches, soit plus de 30 % de faux positifs). *Pseudomonas aerugi-*

*nosa* (2 réactions positives pour 7 souches) et *Acinetobacter baumannii* (2 réactions positives pour 12 souches). D'autres réactions faussement positives ont été observées avec *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Xanthomonas maltophilia*. Dans ces cas, la coloration bleue développée est plus diffuse et moins vive que celle obtenue avec *N. gonorrhoeae*. Ces fausses réactions positives semblent dues à la présence dans ces bactéries de biotine endogène, car la coloration se développe en l'absence de la sonde.

*Comamonas testosteroni*, *Alcaligenes denitrificans*, *chromobacterium violaceum* ont également donné lieu à de fausses réactions positives. Il est intéressant de noter que ces trois espèces appartiennent, comme

*N. gonorrhoeae*, au même groupe d'homologie des séquences de l'ARN 16S de Woese [12] (« bêta-purple bacteria »).

Aucune fausse réaction positive n'a été observée avec les genres suivants : *Alteromonas*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Branhamella*.

## CONCLUSION

Cette sonde est spécifique (96%) et sensible (100%) pour l'identification de l'espèce *gonorrhoeae* en présence d'une bactérie du genre *Neisseria* obtenue en culture. Les problèmes d'interprétation sont très réduits si l'on élimine les cocci à Gram positif et les bacilles.

## RÉFÉRENCES

1. BUXTON D.K., HOFER L., KOCHESKY R., BOTSKO E., O'BRIEN T.F. — Evaluation of a DNA probe assay for the culture confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. ASM 1987, Abstracts. Atlanta: 1-6 mars 1987, 369, C-274.
2. DILLON J.R., CARBALLO M., PAUZE M. — Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: Neisseria-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, minitek, Gonocheck II, GonoGen, Phadebact Monoclonal GC OMNI Test, and Syva Micro Test. *J Clin Microbiol*, 1988, 93, 497.
3. HOKE C., VEDROS N.A. — Taxonomy of the *Neisseriaceae*. Fatty acid analysis, aminopeptidase activity, and pigment extraction. *Int J Syst Bacteriol*, 1982, 32, 51-55.
4. HOKE C., VEDROS N.A. — Taxonomy of the *Neisseriaceae*. Deoxyribonucleic acid base composition, interspecific transformation, and DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol*, 1982, 32, 57-66.
5. JEANLOUIS Y.A., RICE R.J. — New DNA probe test for *gonorrhoeae* said reliable and rapid. *Conference Journal, 27th Interscience, Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4-7 octobre, 1987, 8, 3.
6. KINGSBURY D.T., FANNING G.R., JOHNSON K.E., BRENNER D.J. — Thermal stability of interspecies *Neisseria* DNA duplexes. *J Gen Microbiol*, 1982, 55, 201-208.
7. KNAPP J.S., HOLMES K.K. — Disseminated gonococcal infection caused by *Neisseria gonorrhoeae* with unique nutritional requirements. *J Infect Dis*, 1975, 132, 204-208.
8. TENOVER F.C. — Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1988, 1, 82-101.
9. TOTTE P.A., HOLMES K.K., HANDSFIELD H.H., KNAPP J.S., PERINE P.L., FALKOW S. — DNA hybridization technique for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in men with urethritis. *J Infect Dis*, 1983, 148, 462-471.
10. VEDROS N. — *Neisseria*. In: KRIEG N.R., HOLT G. — *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 290-296. Baltimore, Williams and Wilkins, 1984.
11. WINDALL J.J., HALL M.M., WASHINGTON J.A., DOUGLASS T.J., WEED L.A. — Inhibitory effects of Vancomycin on *Neisseria gonorrhoeae* in Thayer-Martin medium. *J Infect Dis*, 1980, 142, 775.
12. WOESE C.R. — Bacterial evolution. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, 51, 221-271.



3.2.9 Epidemiologie moléculaire d'une infection causée par une bactérie du groupe EF-4

1 2 1  
CLAUDE BOLLET, JEAN JACQUES GROB, HOURIA BOUCHEMAL, JEAN JACQUES  
2 3 1  
BONERANDI, MARTINE KIREDJIAN and PHILIPPE DE MICCO

Laboratoire de Microbiologie and service de Dermatologie, Hôpital Salvator, F 13009 Marseille, and Unité d'Ecologie Microbienne, Institut Pasteur, F 7515 Paris, France.

Les bactéries du groupe EF-4 (Pasteurella-Like) sont retrouvés dans les sécrétions nasales de 30 à 82 % de chiens sains. Les souches pathologiques ont été isolées de morsures de chiens et de griffures de chats. Le tableau clinique de ces infections est habituellement limité à un abcès local.

Une bactérie de ce groupe a été mise en évidence chez un héroïnomanes âgé de 25 ans atteint de SIDA, au niveau d'une ulcération étendue du scotum de la zone périnéale. Pour identifier l'origine de l'infection, nous avons effectué de nombreux prélèvements cutanés et muqueux du chien et du patient, berger des pyrénées âgé de quatre ans. Une souche du groupe EF-4 a été isolée des sécrétions nasales et orales de ce chien. Ses propriétés biochimiques et ces caractéristiques de croissance sont identiques à celles de la souche isolée chez le patient.

L'electrophorèse des protéines membranaires en gel d'acrylamide en présence de SDS révèle des profils identiques, différents sensiblement des souches types P. multocida (NCTC 10322), P. haemolytica (NCTC 9380), P. aerogenes (ATCC 27883). La digestion des ADN chromosomiques totaux par HindIII et EcoRI montre plusieurs bandes communes. Les deux souches ne présentent pas de plasmide (extraction par lyse alcaline).

Comme notre patient n'a pas été mordu et qu'il n'a fait état d'aucune perversion sexuelle, nous pensons qu'il s'est infecté en se grattant après avoir léché par son chien.

Epidemiology of a group EF-4 bacterial isolated from patient with Aides

Severe ulceratios due to EF 4 bacterial occured in Aids patient. Characteristic microbiology and antibiotic susceptibility testing are reviewed. Trimethoprim sulfamethoxazole therapy eliminated the cutaneous infection. A similar strain were isolated from oral and isolated from oral and nasal fluid of the patient's dog.

The group of Eugonic fermenter bacterial (EF-4) was first described by tatum, Ewing and Weaver (10). Though this Pasteurella like group is as yet unclassified, its biochemical characteristics have been documented (1,2,9,10) EF-4 bacteria have been found with a frequency of 30 % (9) and of 82 % (1) in dog oral and nasal fluids. Pathogenics stains have been isolated from dogs and cat bite wounds in human (3,8).

The clinical picture of thes infections is limited to local abcess. In animals, the major disease caused by thes bacteria is a disseminated focal netrotizing pneumonia : they have been isolated from lungs in cat (5), from a tiger died of an acute pneumonia (7), from a dead mouse (4). We report the epidemiological analysis of severe skin infection due to EF-4 bacterial in a Aids patient.

A 27 year-old male former drug addict prented with multiple extensive painful ullcerations located on srotum inner thighs and perianal area. ELISA assays and western blotting were positiveto HIV. Laboratory data showed a decreased white blood cell count (1400/cm<sup>3</sup>), 310 neutrophils/mm<sup>3</sup>, 610 lymphocytes/mm<sup>3</sup>, and a CD4+ cell deficiency (90/mm<sup>3</sup>). Thrombocytopenia (99,00/mm<sup>3</sup>) was noted and a lupus-type circulating anticoagulant was detected. Blood culture negative. Bronchioalveolar lavage revealed pneumocytis carinii and Candida albicans. Antibodies to herpesvirus, cytomegalovirus, Toxoplasma gondii, G hepatitis virus were present.

Gram stainig of wound swabs taken from the lesion yielded short rod-shaped Gram-negative bacteria, with we identified as EF-4 group. Culture were obtained in tow days on chocolate agar slant (Biomérieux, France) and schaedler broth (Biomérieux at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere. Upon disk susceptibilty testing on Mueller-Hinton agar (Biomérieux) using standardized antibiotic disks (Institut Pasteur Production, France), the isolate was found to be susceptible to cephalosporins, imipenem, chloramphenicol, aminoglycosides, macrolides, tetracyclins, systemic quinolones, and trimethprime-sulfamethoxazole. The isolate was resistant to clindamycin and vancomycin.

The patient was treated for both Pneumocystis and EF-4 bacteria by sulfamethoxazole 1,6 g/d and the trimethoprim 320 mg/d. The cutaneous lesions immediately stopped spreading and the ulcers regressed rapidly. Complete healing was obtained within 3 weeks.

This nomotile organism was oxidase and catalase positive. Colonies were yellow pigmented. No growth was noted on Mac Conkey agar (Biomérieux, France). A distinctive aromatic popcorn-like odor was produced. Arginine was not dihydrolysed. Lysine and ornithine were not decarboxylated.

Urea was not hydrolysed in Christansen medium, and indole was not formed. Gelatin was not liquefied. Nitrate was reduced to nitrate. Without gas production. Tetrathionate was reduced. Acid was produced from D-glucose, D-mannose and ribose, but not from maltose, xylose, mannitol, lactose and sucrose. The isolate was resistant to O/129 agent. On the basis of the lack of arginine dihydrolase, gelatinase, and gas production from nitrate, the organism was classified as biogroup b.

80 % of the EF-4 strains studied by weaver et al. (11) were isolated from human wounds caused by dog or cat bites. In order to identify the origin of the infection, multiple swabs were taken from the patient's dog (a 4-year-old pyrenean sheep-dog). Cultures were performed on chocolate agar slant (Biomérieux, France) at 37° in 5 % CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere. Due to the lack of selective medium, we were obliged to check about 600 colonies, principally Gram-positive cocci.

A strain of EF-4 bacteria were isolated from nasal and oral fluid of this dog. The biochemical and antimicrobial susceptibility test results of this strain were identical to the patient's strain. One-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of cellular were performed with a Laemmli gel system (6) (Fig. 1). For comparison, protein patterns of the following 3 Pasteurella strains are also showed : the type strains of Pasteurilla multocida (NCTC 10322), Pasteurilla haemolytica (NCTC 9380), Pasteurilla aerogenes (ATCC 27883).

Strains isolated from patient and dog displayed similar electrophoregrams. SDS-PAGE profiles of Pasteurilla strains were quite different from those of EF-4. Though our patient had been bitten, and since no sexual perversion was avowed, we believe that the patient infected himself by scratching his hands had been licked by the dog.



## LITTERATURE CITED

1. Bailie, W.E., E.C. Stowe, and A.M.S. Schmitt. 1978. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bite. *J. Clin. Microbiol.* 7:223-231.
2. chatelain, R.H., H. Bercovier, P. Gaudin, and H.H. Mollaret. 1980. Isolement en France de souches appartenant au genre bactérien EF-4. *Med. Mal. Inf.* 10:530-533.
3. Golstein, E.J.C., D.M. Citron, Wield, U. Blacham, V.L. Sutter, T.A. Miller, and S.M. Finegold. 1978. Bacteriology of human and animal bite wounds. *J. Clin. Microbiol.* 8:667-672.
4. Holmes, B. and M.S. Ahmed. 1981. Group EF-4 : a Pasteurilla like organism, P. 161-174. In Killian, W. Frederickesen, and E.L. Biberstein (ed), Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus. Academic press, London.
5. Jang, S.S., J.C. Demartini, R.V. Hendrickson, and F.M. Enrighi. Focal necrotizing pneumonia in cats associated with a Gram negative eugonic fermenting bacterium. *Cornell Vet.* 63:446-454.
6. Laemmeli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
7. Lloyd, J., and J.G. Allen. 1980. The isolation of group EF-4 bacteria from a case of granulomatous pneumonia in a tiger cub. *Aust. Vet. J.* 56:399-400.
8. Peel, M.H. and B. Holmes. 1980. Isolation of group EF-4 bacterial in Australia. *Austs. N.Z.J. Med.* 10:435-537.
9. Saphir, D.A. and G.R. Carter. 1976. Gingival fglora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. *J. Clin. Microbiol.* 3:344-349.
10. Tatum, H.W., W.H. Ewing, and R.E. Weaver. 1974. Miscellaneous Gram negative bacteria, P. 270-274. In E. H. Lennette, E.H. Spaulding and J.P. Truant (ed), Manual of clinical Microbiology, 2nd ed. American society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Weaver, R.E., D.G. Hollis, and E. J. Bottone 1985. Gram negative fermentative bacteria and *Franciella tularensis*, P. 309-329. In E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler and H.J. Shadomy (ed), Manuel of clinical Microbiology, 4th ed. American society for Microbiology, Washington D.C.

### 3.3 DISCUSSION

Toutes les techniques de marquage appliquées, mettent en évidence une grande complexité chez les différentes bactéries étudiées. Les techniques traditionnelles sont toujours utilisées. La biotypie est dotée d'un pouvoir discriminant important, elle peut aisément être appliquée aux bactéries qui font l'objet de notre étude. La sérotypie utilisée pour les staphylocoques à coagulase négative a permis de typer 79 % de nos souches. Bien que 52 d'entre elles n'ont pu être typées et qui n'ont pas réagi vis à vis de leur type. Cela est peut être due à une trop grande spécificité des immun-sérums absorbés ou une mauvaise identification des espèces. La corrélation observée entre espèces et sérotypes de la majorité des souches, permet de proposer cette technique comme méthode de classification et montre l'intérêt de la sérotypie dans l'identification et le marquage de staphylocoques dépourvus de coagulase.

Conformément à ce qui a été décrit par différents auteurs, les souches de S. epidermidis sont beaucoup plus résistantes aux différents phages que S. aureus. Environ 31 % des souches ont été typées à 1000 RTD et un nombre presque négligeable à 100 RTD. Beveley a testé 3275 souches de Staphyloque à coagulase négative et 70 % d'entre elles étaient lysotypables (12). Cette méthode est reproductible, sensible, fiable et spécifique. Cependant le problème de la mise en oeuvre, le faible pourcentage de typabilité, la difficulté d'obtention des phages et la non existence de systèmes de lysotypie pour toutes les souches font de cette technique, un outil de marquage épidémique plus qu'endémique.

L'antibiotypie, seule n'est pas discriminante et doit toujours être associée à d'autres techniques de marquage.

Les techniques moléculaires sont beaucoup plus intéressantes pour l'identification et le diagnostic des espèces bactériennes. Elles sont applicables à toutes les souches. Cependant certains inconvénients doivent être signalés : la restriction de l'ADN chromosomique par les endonucléases, engendre plusieurs fragments parfois incomparables entre les espèces. Dans certains cas les profils de protéines cytoplasmiques sont représentés par une multitude de bandes difficile à interpréter ce qui impose l'utilisation de protéines membranaires présentant moins de bandes.

La présence de plasmides chez les micro-organismes rend possible l'utilisation de l'analyse plasmidique en première intention pour comparer rapidement entre les différentes souches. Son emploi pourrait fournir de précieux renseignements sur le mode de transmission de différentes bactéries.

La préparation d'une sonde spécifique par la méthode de clonage au hasard et l'hybridation moléculaire, est une technique très intéressante pour le diagnostic microbiologique. Elles sont par contre, longues minutieuses et demandent beaucoup d'attention et de surveillance.

#### 4 CONCLUSION

Les infections contractées dans les établissements de soins constituent actuellement une des causes principales de mortalité et de morbidité chez les malades hospitalisés. De plus elles sont directement ou indirectement génératrices de surcoûts importants en matière de soins et entraînent des risques nouveaux pour la santé de tous.

Il existe de nombreux facteurs de risque liés au terrain du malade et à son environnement, parmi les principaux :

- nombreux affections, interventions et traitements immunosuppresseurs couramment utilisés, affaiblissement des défenses immunitaires.
- les agressions de la barrière cutano-muqueuse consécutive à des explorations et traitement de plus en plus intensif.
- les modifications de la flore microbienne des malades hospitalisés dues à la pression de sélection des antibiotiques, favorisent la propagation des espèces bactériennes les plus résistantes (146).

Parmi les agents infectieux les bacilles à Gram négatif prédominent. Les différentes voies de transmission sont :

- la voie endogène à partir de la flore saprophyte du malade lui même à l'origine d'auto-infection
- la voie exogène par le personnel soignant, d'autres patients ou l'environnement contaminé, il s'agit donc d'infection croisée (7).

Au niveau d'un laboratoire de microbiologie, des méthodes d'isolement efficaces et une bonne technique d'identification des bactéries par moyen classiques biochimiques et antigéniques, restent la base indispensable de toute enquête épidémiologique. Ces techniques de base suffisent en général à déterminer l'existence d'un phénomène épidémiologique lorsque la bactérie est rarement isolée.

En revanche, pour les bactéries d'isolement habituel en milieu hospitalier, chaque laboratoire doit développer au maximum des techniques de biotypie c'est à dire la mise en évidence d'un profil biochimique particulier, associé assez souvent à un spectre de résistance aux agents anti-microbiens original est un moyen rapide et facilement disponible de soupçonner la parenté de deux souches impliquées dans une épidémie. La sérotypie est parfois d'un grand secours dans les infections à P. aeruginosa et aussi dans le cas de S. epidermidis, pour objectiver une épidémie hospitalière.

Dans l'avenir, les techniques de biologie moléculaire : analyse des ADN chromosomiques et extra-chromosomiques, analyse des protéines membranaires et cytoplasmiques des bactéries et l'utilisation des sondes nucléiques devraient se développer.

Si ces méthodes deviennent de plus en plus accessibles aux laboratoires de routine, elles permettent aussi de détecter

rapidement les souches épidémiques et de prendre les mesures adéquats. L'épidémiologie moléculaire enrichira alors notre compréhension des infections bactériennes nosocomiales. Nous disposons aujourd'hui d'outils épidémiologiques fiables qui vont nous permettre dans le cadre d'un suivi cinétique de l'écologie microbienne au cours de l'hospitalisation de pouvoir affirmer l'échange entre l'environnement et l'homme.

Le réservoir de ces germes est vaste (76). l'air véhicule des poussières, les squames cutanées, les gouttelettes de pflügge. L'eau peut être contaminée dans les humidificateurs ou les incubateurs. Les aliments peuvent être responsables de toxico-infections alimentaires. Les parties horizontales du mobilier sont d'éventuels réservoirs des micro-organismes par la simple sédimentation et les micro-organismes déposés par les personnes. Mais il ne faut pas oublier le réservoir humain (médical et paramédical) qui est le plus important.

La recherche des bactéries dans l'environnement peut être envisagée lorsque l'on veut découvrir un réservoir de bactéries pouvant expliquer une infection épidémique en cours ou chercher les voies de propagation de cette épidémie (93).

La prévention de ces infections est primordiale et justifie un certain nombre de mesures : isolement des sujets contagieux, stérilisation soigneuse du matériel, asepsie des champs opératoires et, bien entendu, lavage soigneux des mains avant et après chaque soin. L'air et l'eau doivent être contrôlés régulièrement. L'éducation de tous est capitale. D'autre part, il doit exister dans toute l'enceinte de l'hôpital un niveau moyen de prévention respecté avec discipline par tout le personnel, plus des mesures draconiennes dans certains secteurs à risque comportant une hygiène individuelle stricte et une hygiène collective (matériel, locaux ect...) sans faille.

L'application rigoureuse de telles mesures préventives ferait régresser de manière très significative le taux des infections nosocomiales.

## 5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Aber, R.C., and D.C. Mackel. 1981. Epidemiologic typing of nosocomial micro-organism. Symposium on nosocomial infection. *Am. J. Med.* 70:899-905.
- (2) Alridge, K.E., and C.W. Shalton. 1983. Comparison of the staph-ident system with conventional method for species identification of urine and blood isolates of coagulase negative Staphylococci. *J. Clin Microbiol.* 17:516-520.
- (3) Altwieg, M., and L.W. Mayer. 1989. Bacterial molecular epidemiology based a non radioactive probe complementary to ribosomal RNA. *Res. Microbiol.* 140:325-333.
- (4) Audurier, A., and G. Gallon. 1988. Les bactéries responsables des infections nosocomiales et leur typisation. *Rev. Française des laboratoires.* 170:33-36.
- (5) Avril, J.L. (cf Vilain). 1985. Les examens bactériologiques et la lutte contre l'infection post-opératoire. *Agressologie* 26:151-152.
- (6) Atlas des soins. 1983. Contrôle de l'infection. Edition Vigot.
- (7) Baron, D., Tasseau, F., and M.D. Touze. Les infections hospitalières prévalentes en unité de soins intensifs.
- (9) Bennett, J.V., and P.S. Brachman. 1979. Hospital infection. Littele, Brown and company. Boston.
- (10) Bergogne-Berezin, E., Joly guillo, M.L., and J.F. Vieu. 1987. Epidemiology of nosocomial infections due to Acinetobacter calcoaceticus. *J. Hosp. Infect.* 10:105-113.
- (11) Bergogne-Berezin, E. 1988. Les nouveaux germes des infections nosocomiales. *Rev. Française des laboratoires.* 170:41-45.
- (12) Beveley, A., Deam, R.E.O., and S. Williams. 1973. Phage typing of Staphylococci and micrococci. *J. Hyg. Camb.* 71:261-270.
- (13) Beytout, D. 1988. Eco-épidémiologie des infections nosocomiales. *Hygiène hospitalière. Edition C et R.* 17:25.
- (14) Beytout, D. *Epidémiologie des infections hospitalières. Bactériologie médicale. Leon le Minor, M Veron.* 181-191.
- (15) Birnboin, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* 17:1513-1523.
- (16) Blair, J.E., and R.E.O. Williams. 1961. Phage typing of staphylococci. *Bull. OMS.* 24:771-784.

- (17) Bollet, C., and Ph. De Micco. 1988. Les marqueurs épidémiologiques. Hygiène hospitalière. Lutte contre l'infection nosocomiale. Ed. C et R. 1 ère édition.
- (18) Bollet, C. 1990. Taxonomie et marqueurs de Serratia dans l'environnement. Application en hygiène hospitalière. thèse de science. Aix marseille I.
- (19) Bouvet, P.J.M., and P.A.D. Grimont. 1987. Identification and biotyping of clinical isolates of Acinetobacter. Ann. Inst. Past. 138:569-572.
- (20) Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-organism quantities of proteins, utilising the principal of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- (21) Bres, B., and Y. Brun. 1984. Lysotypie de Staphylococcus epidermidis. Ann. Microbiol. 135 B.
- (22) Brison, B., and C. Richard. 1972. Intérêt taxonomique de la recherche de bêta-xylosidase chez les Enterobacteriaceae. Ann. Inst. Past. 123:341-347.
- (23) Brosius, J., Ullrich, A., and A.A. Raker. 1981. Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the rrn ribosomal RNA operon of E. coli plasmid. 6:112-118.
- (24) Campella, A. 1981. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 35:55-83.
- (25) Chapeville, F. 1982. Biosynthèse des protéines. Traduction génétique. Al-Halnni.
- (26) Cohen, L.S., and F. R. Fekety. 1962. Studies of epidemiology of Staphylococci infection. The new england. J. Med. 226: 367-372.
- (27) Courtney, M.A., and R. Miller. 1980. R factor responsable for an outbreak of multiplay antibiotics restant Klebsiella pneumoniae. Anti-microbiol agents. 18:926-929.
- (28) Darbad, J.C., and A. Dauphin. 1985. Hygiène hospitalière. Edition médicale interne. Paris.
- (29) Das, B.C., and G.A.T. Ayliffe. 1984. Serotyping of Acinetobacter calcoacitus. J. Clin. Path. 37:1388-1391.
- (30) David, B.R., and J.M. Word Ward. 1957. Some relationships on the somatic antigènes of group of Serratia marcescens. Can. J. Microbiol. 3:591-597.
- (31) Davis, B.J. 1964. Disc elecrophoresis. Method and application to human serum proteins. Ann. New York. Acad. Sci. 121:426-427.
- (32) Denis, F.A., and D. Blanchard. 1975. Enquête sur les porteurs intestinaux de Serratia. Nouv. Pres. Med. 4:114-115.

- (33) Dijkshoorn, L., Michel, M.F., and J.E. Degener. 1987. Cell envelop, protein profiles of Acinetobacter strains isolates in hospital. J. Med. Microbiol. 23:313-319.
- (34) Dijkshoorn, L., Vanviaveu, W., and J.E. Degener. 1987. Typing of Acinetobacter strains isolates from hospital patients by cell envelope protein profiles. Epidemiol. Infect. 99:659-667.
- (35) Doeru, G.U., and J.E. Earis. 1983. Species identification and biotyping of Staphylococci by API staph ident system. J. Clin. Microbiol. 17:260-263.
- (36) Edmonds, P., and R. Raymond. 1972. Epidemiology of Pseudomonas in burns hospital. Evaluation of serological bacteriophage and pyocine typing methods. App. Microbiol. 24:213-218.
- (37) Edwards, P.R., and W.H. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess. Pub. Minneapolis. USA.
- (38) Edawrds, P. R., and W. Ewing 1972. The genus of Klebsiella in identification of Enterobacteriaceae. 3 rd. Edition. Burgess. Paris. Minneapolis.
- (39) Farmer, J.J. 1969. Epidemiological fingerprinting of Pseudomonas aeruginosa by production of sensitivity to pyocin and bacteriophage. App. Microbiol. 23:218-225.
- (40) Farmer, J.J. 1972. Epidemiological differentiation of Serratia marcescens typing by bacteriocin production. App. Microbiol. 23:218-225.
- (41) Farrar, W.E. 1983. Molecular analysis of plasmids in epidemiologic investigation. J. Infect. Dis. 148:1-6.
- (42) Feinberg, A.P., and B. Vogesterin. 1983. A technique for radiolablling endonuclease fragments to high specific activity. Ann. Biochem. 132:6-13.
- (43) Feinberg, A.P. 1984. A technique for radiolabelling endonuclease fragments to high specific activity. Ann. Biochem. 137:266-267.
- (44) Frank, C. 1988. Le rôle du laboratoire dans la lutte contre l'infection hospitalière. Rev. Française des laboratoires. N° 171. 47-53.
- (45) Gennel, C.G., and J. E. Bowson. Identification of coagulase negative Staphylococci with API system. J. Clin. Microbiol. 16:874-877.
- (46) Gerding, D.N., and A.E. Buxton. 1979. Nosocomial multiplay resistant Klebsiella pneumoniae. Epidemiology of out break of apparent index case origin. Antimicrobiol agents. Chemotherp. 15: 608-615.
- (47) Gillies, P.H., and D.R. Olson. 1986. Improved computer generated system for pyocin of Pseudomnas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 24:1017-1022.

- (48) Gillies, R.P., and J.R.W. Govan. 1966. Typing Pseudomonas aeruginosa by pyocin production. J. Path. Bacteriol. 91: 339-349.
- (49) Gillespie, D., and A. Spiegelmans. 1965. A quantitative assay for DNA hybridization with DNA RNA immunobilisation a membran. J. Mol. Biol. 12:829- 842.
- (50) Glover, M. 1984. Gene cloning, the mechanisms of DNA manipulation. Chapman and Hall. London.
- (51) Goldstein, F.W., Paradopoulou, B., and J.F. Acar. 1986. The changing patterns of trimethoprim resistance in Paris. Rev. Infect. Dis. 8:725-737.
- (52) Goulet, P.H., and B.J. Picard. 1988. Characterisation of Yersinia enterocolitica, Y. intermedia, Y. aldovae, Y. frederikseni. Electrophoretic polymorphism acid phosphatase, esterases and, glutamate and malate dehydrogenases. J. Gen. Microbiol. 134:317-325.
- (53) Goulet, P.H., and B. Picard. 1985. A to ddimensional electrophoretic profil for bacterial esterases. Electrophoresis. 132-135.
- (54) Grimont, F., and P.A.D. Grimont. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Past. 138B:165-175.
- (55) Grimont, P.A.D. 1972. Le genre Serratia. Taxonomie et approche écologique. Thèse sciences, Bordeaux. N° 542.
- (56) Grimont, P.A.D., Grimont, F., and N. Desplaces. 1985. DNA probe specific for Legionella pneumophila. J. Clin. Microbiol. 21:431-437.
- (57) Grimont, P.A.D., and F. Grimont. 1978. Biotyping of Serratia marcescens its use in epidemiological studies. J. Clin. Microbiol. 8:73-83.
- (58) Grunstein, M., Hagnes, D. 1975. Proc. Acad. USA. 72:3961-3965.
- (59) Gulian, C., Bourzeix, S. Gevaudon, M.J., Bollet, C., and Ph. De Micco. 1988. Les contaminations hospitalières à Serratia marcescens. Bilan d'une année de surveillance. Microbiol. Med. Mal. Infect.
- (60) Habs, I. 1957. Untersuehungen dis O-antigene von Pseudomonas aeruginosa. Ar. Zeitschr. Hyg. 144:218-228.
- (61) Haley, R.W. Morgan, W.M., Culver, D.H., and J.W. White. 1985. Hospital infection control, recent progress and opportunisties under prospective patment. Am. J. Infect. Control. 13:97-108.
- (62) Hilary, J., and H.J. Adreus. 1986. Acinetobacter bacteriocin typing. J. Hosp. Infect. 7:169-175.



- (63) Huynh, T.U., Youg, R.A., and R.W. Davis. 1985. In DNA cloning techniques (A practical approach) Glover, D. (ed IRL press oxford) 1:49-78.
- (64) Hygria, T., Larsen, S.H., and T. Sahlberg. 1984. Analysis and detection of clamydial DNA. J. Gen. Microbiol. 130:3159-3164.
- (65) Izard, D., and C. Ferragust. 1981. Klebsiella terregina a new species from soil and water. J. Bact. 31:116-127.
- (66) Jackman, P.J.H. 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole cell protein patterns. Acad. Pres. London.
- (67) Jackman, P.J.H. 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole protein patterns. Society. Upp. Microbiol. Ref 97.
- (68) Jamet, D. 1972. Lysotypie de Staphylococcus aureus. Technique et intérêt épidémiologique dans les infections à Staphylocoque. Thèse de pharmacie. Tours.
- (69) Jean-Maire Freve Charle gerday. 1981. Les méthodes de purification et analyses des protéines. 72-78.
- (70) John, J.F., and A. Twitty. 1986. Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial gram positive and negative bacilli. Rev. Infect. Dis. 8:693-707.
- (71) Kado, C.I., and S.T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 154:1365-1373.
- (72) Kaplan, J.C., and M. Depech. 1989. Biologie moléculaire et médecine. Edition Flammarion. Paris.
- (73) Kersters, K. 1985. Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophores. J. Gen. Microbiol. Ref 117.
- (74) Kersters, K., and J. Deley. 1975. Identification and grouping of of bacteria by numerical analysis of electrophortic protein patterns. J. Gen. Microbiol. 18:197-201.
- (75) Kimber, H. 1981. Bacterial plasmid. 2 ème édition. P 114.
- (76) Knittle, M.A., Eitzman, D.V., and H. Baer. 1975. Role of hand contamination of personnel in the epidemiology of Gram negative nosocomial infections. J. Pediatr. 86:433-437.
- (77) Kloos, W.E., and J.E. Woffshal. 1982. Identification of Staphylococci species with API staph ident system. J. Clin. Mcrobiol. 15:509-516.
- (78) Kotsowlis, A. 1978. A comparative stady of S. epidermidis isolated from clinical carries materiel and healthy carries. Zbl. Bakt. Hyg. 241:101-107.

- (79) Kourilsky, P.A., and S. Vramlas. 1970. Brevet français N°78. 10975/2422956.
- (80) Kunitza, A.D., and A.A. Salgers. 1985. Use of aspecies specific DNA probe for enumerating Bacteroides vulgutus in human feces. App. Env. Microbiol. 50:958-964.
- (81) Lacks, S.A. 1977. Binding and entry of DNA in bacterial transformation. Microbiol. Interactions. London. 179-232.
- (82) Laemmli, V.K. 1970. Lavage and structural proteins during the assembly of head of bacteriophage. T4 nature . London. 227:680-685.
- (83) Lasky, R.A. 1984. In radioisotope detection by fluography and intensity fying screens. Amersham. Rev. N°23.
- (84) Leary, J.J., and D.J. Brigati. 1983. A rapid and sensitive coloremtric method for visualizing labelled DNA probes. Proc. Nat. Acad. Sci. 80:4045-4049.
- (85) Lebacq, P. 1986. Les différentes sondes non radioactives. et leur application au diagnostic. 3 ème colloque. Elsevier. Paris.
- (86) Lecler, H., Izard, D., and M.O. Husson. Microbiologie générale. 2 ème édition. Doin. Paris.
- (87) Le Minor, S., and F. Pigache. 1977. Etude antigénique des souches de Serratia marcescens isolées en France. Ann. Inst. Past. 128B:207-214.
- (88) Le Minor, S., and F. Pigache. 1978. Etude antigénique des souches de Serratia isolées en France. Caractérisation des antigènes O et individualisation de cinq nouveaux facteurs. Ann. Microbiol. 129B:407-423.
- (89) Les infections nosocomiales. La lettre de l'infectiologie n°1. Janvier 1986.
- (90) Liv, P.V. 1958. Sucomite on phage typing of stop. Am. J. Clin. Path. 29:176-186.
- (91) Lowry, O. 1951. J. Biochem. 193:265.
- (92) Mcgingley, K.J., and J.N. Labows. 1985. Pathogenic JK group Corynebacterum and their similarity to human cutaneous lipophilic diphteroids. J. Infect. Dis. 152:801-806.
- (93) Maki, D.G., Alvarado, C.J., and C.J. Hassemer. 1982. Relation of the inanimute hospital environment to endemic nosocomial infection. New. Eng. J. Med. 307:1562-1566.
- (94) Maniatis, T., and E.F. Fritsch. 1982. Molecular cloning. A laboratory manuel. Cold spring. Harbor laboratory. 545 P.
- (95) Markowitz, S.M., and S.M. Smith. 1983. Retrospective analysis of plasmid patterns in a study of burn unit out breaks of infection due to Enterobacter cloacae. J. Infect. Dis. 148:18-23.

- (96) Marmur, J., and R. Roymond. 1963. Denaturation and renaturation of DNA. *Prog. Nucleic. Acids. Res.* 1:213.
- (97) Marmur, J.S., and S. Falkow. 1963. A new approaches to bacterial taxonomy. *Ann. Rev. Microbiol.* 18:329-372.
- (98) Masse, M.J.O, Menlieu P., Le Guernia, A., and, P. Kourmilsky. 1985. *Ann. Inst. Past.* 136D:231-243.
- (99) Monget, D., and J.M. Boeufgras. 1983. A new systems for the identification of clinical isolates of non enteric gram negative rods API NE. First europ. Congres of clin microbiol.
- (100) Morison, A.J. 1986. Associated mortality and clinical characteristics of nosocomial university hospital. 24:52-55.
- (101) Moseley, S.L., and S. Falkow. 1980. Nucleic sequence homology between heat labile enterotoxin gene of E. coli and Vibrio cholerae DNA. *J. Bacteriol.* 144:444-446.
- (102) Moseley, S.L., and I. Huq. 1981. Detection of enterotoxigenic E. coli by colony hybridation. *J. Infect. Dis.* 142:892-898.
- (103) Moseley, S.L., and I. Huq. 1980. Detection of enterotoxigenic E. coli by DNA colony hybridization. *J. Infect. Dis.* 152:560-565.
- (104) Neugen-Trike., and H. Milch. 1981. Klebsiella and Enterobacter strains derived from hospital infections. Correlation between species phage type and an antibiotic sensitivity. *Act. Microbiol. Sci.* 28:67-81.
- (105) Orskov, I. 1955. Serological investigation in the Klebsiella group. A new capsule types. *Acta. Path. Microbiol.* 36:449-453.
- (106) Orstein, L. 1964. Disc electrophoresis. *Ann. New York. Acad. Sci.* 121:321-349.
- (107) Parisi, J.T. 1985. Coagulase negative staphylococci and the epidemiological typing of S. epidermidis. *J. Clin. Microbiol.* 49:126-139.
- (108) Parisi, J.T., and B.C. Lampson. 1986. Comparaison of epidemiologic markers of Staphylococcus epidermidis. *J. Clin. Microbiol.* 24:56-60.
- (109) Parisi, J.T., and W. Hecht. 1980. Plasmid profils in epidemiologic studies of infections by Staphylococcus epidermidis. *J. Infect. Dis.* 141:637-643.
- (110) Parisi, J.T. 1985. Coagulase negative staphylococci and epidemiological typing. *Microbiol. Rev.* 230:606-669.
- (111) Perrin, M. 1970. Comparaison du lysotype du sérotype et de l'antibiotype des Staphylococcus aureus. Thèse de pharmacie. Lyon.

- (112) Picard-Pasquier. 1989. Electrophoresis. 10:186-189.
- (113) Piffaretti, J.C. 1982. Problèmes épidémiologique des bactéries résistantes aux antibiotiques. Le concept des transposons. *Thérap. Umsch.* 39:700-707.
- (114) Piffaretti, J.C. 1988. Utilité des plasmides bactériens en épidémiologie hospitalière. *Rev. Française des laboratoires.* N°170. 47-51.
- (115) Pillet, J., and J.L. Bordur. 1979. Bactériologie médicale et vétérinaire. 2 ème édition Doin.
- (116) Pillet, J., and B. Orta. 1967. Sérotypie des staphylocoques. Intêret d'une réduction du nombre des souches utilisées. *Ann. Inst. Past.* 113:364-374.
- (117) Raimondi, A., and F. Moosdeen. 1985. Antibiotic resistance patterns of Flavobacterium meningosepticum. *J. Clin. Microbiol.* 5:461-463.
- (118) Reaney, D. 1976. Extra-chromosomal elements as possible agents of adaptation and developpement. *Bacteriol. Rev.* 40:552-590.
- (119) Rennie, R.P., and C.E. Nord. 1978. Comparaison of bacteriophage typing, serotyping and biotyping as aids in epidemiologic surveillance of Klebsiella infections. *J. Clin. Microbiol.* 8:638-642.
- (120) Richard, C. 1982. Bactériologie et épidemiologie des espèces du genre Klebsiella. *Bull. Inst. Past.* 80:127-145.
- (121) Richard, C. 1973. Etude antigénique et biochimique de 500 souches de Klebsiella. *Ann. Biol. Clin.* 131:295-303.
- (122) Richard, C. 1975. Intérêt des cultures sur les milieux contenant des sucres fermentecibles pour la mise en évidence de l'uréase de Klebsiella. *Ann. Microbiol.* 126B:201-208.
- (123) Richard, C. 1977. La tétrationate réductase chez les bacilles à Gram négatif. *Bull. Inst. Past.* 75:369-386.
- (124) Richard, C. 1981. Une méthode simple de marquage la biotypie. Application Enterobacter cloacae et E. coli. *Bull. Association. des anciens élèves. Inst. Past.* N°87: 14-21.
- (125) Riebel, W., and N. Frantz. 1986. Corynebacterium JK : a cause of nosocomial device. Related infection. *Rev. Infect. Dis.* 8:42-49.
- (126) Roberts, R.J. 1983. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences DNA. 11-135.
- (127) Robins-Brown, R.M., and B. Rowe. 1983. A hospital out break of multi-resistance Salmonella typhimurium belonging to phage type. *J. Infect. Dis.* 147:210-216.

- (128) Ronald, J., Zbranansky. 1968. App. Microbiol. 17:292- 293.
- (129) Rubin, F.A., and D. J. Kopeckod. 1985. Developpement of a DNA probe to detect Salmonella typhi. J. Clin. Microbiol. 22:600-605.
- (130) Sadorski, P.L., Peterson, B.G., and D.N. Gerding. 1979. Physical characterisation of the R plasmids obtained from an outbreak of nosocomial Klebsiella pneumoniae infections. Anti-microbiol agent. 15:616-624.
- (131) Salyers, A.A. 1983. Use of random by cloned DNA fragments for identification of Bacteroides thetaiotaomicum. J. Bacteriol. 154:287-293.
- (132) Schaberg, B., Olson D.R., And P.B. Smith. 1986. Improved, copmputer generated system for pyocin typing of P. aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 24:1017-1022.
- (133) Seal, D.U., and A.A Swiggow. 1981. Characterisation of epidemic strains of Klebsiella and its variants by computer analysis. J. Med. Microbiol. 14:295-305.
- (134) Sethabutr, O., and P. Echeverria. 1985. A non radioactive probe to identify Shigella and enteroinvasive E. coli in stools of children with diarrhae. Lancet II. 1095-1097.
- (135) Shaberg, D.R., and M. Zervos. 1986. Plasmid analysis in study of the epidemiological of nosocomial gram positive cocci. Rev. Infect. Dis. 8:705-712.
- (136) Shaberg, D.R., and L.S. Tompkins. 1981. Use of agarose gel electrophoresis of plasmid DNA to fingerprint gram negative bacilli. J. Clin. Microbiol. 13:1105-1108.
- (137) Slopek, S. 1978. Phage typing of Klebsiella in " Methods in microbiology ". Acad. Pres. London. New York.
- (138) Smith, G.E., and N. Nathans. 1973. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. J. Molec. Biol. 81:419-423.
- (139) Smith, H.O., and P.B. Danner. 1981. Genetic transformation. Ann. Rev. Biochem. 50:41-68.
- (140) Smith, H.O., and N.B. Summers. 1980. Ann. Bacteriol. 109-123.
- (141) Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Molec. Biol. 98:503-517.
- (142) Stull, T.L., and J.J. Lipumo. A broad sepctrun probe of molecular epidemiology of bacteria ribosomal RNA. J. Infect. Dis. 157:280-286.
- (143) Stutsky, B., Buffo, J., and D.R. Soll. 1985. High frequency switching of colony morphology in Candida albicans. Sci. 230:666-669.

- (144) Swell, C.M. and J.F. Claridge. 1982. Clinical signification of coagulase negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 16:236-239.
- (145) Swings, J., and K. Kerbers. 1976. Numerical analysis of electrophoretic patterns of Zymomonas strains. J. Gen. Microbiol. 93:260-271.
- (146) Tanner, F., Zumofen, M., Haxhe, J.J., and G. Ducel. 1983. Actualité de l'hygiène hospitalière éléments d'hygiène hospitalière et techniques d'isolement hospitalier. Paris. Maloine.
- (147) Taylor, A.J., and M. Costas. 1987. Numerical analysis of electrophoretic proteins patterns of Bacteroides ureolyticus in clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 25: 660- 666.
- (148) Tchen, P., Fuchs, R.P., and E. Sage. 1984. Chemically modified acids as immuno-detectable probes in hybridization experiments. Proc. Nat. Acad. Sci. 81:3466-3470.
- (149) Thal, E., and B. Wordbeg. 1968. Utilisation des bactériophages pour le diagnostic de Bacillus anthracis. Ber. Munch linalzt. Ztwsch. 81-11.
- (150) Tompkins, L.S., Troup, N., and A. Roussel. 1986. Cloned random chromosomal sequences as probes Salmonella species. J. Infect. Dis. 184:154-162.
- (151) Torlotin, J.C. Hospitalisation et risque infectieux. Hygiène hospitalière pratique. Dauphin A.
- (152) Townerky chopirode, B.A. 1977. Biotyping of Acinetobacter calcoaticus using the API NE system. J. Hosp. Infect. 10: 145-151.
- (153) Traub, W.H. 1971. Continued surveillance of Serratia marcescens infections by bacteriocin typing. App. Microbiol. 22:1058-1063.
- (154) Traub, W.H., and I. Kleber. 1974. Continued epidemiological surveillance of Serratia marcescens infections by bacteriocin typing. Zbl. Bkt. Infect. Ori. 229:372-382.
- (155) Tselenis Kotsowleis, A. 1978. A comparative study of S. epidermidis isolated from clinical materiel and healthy carriers. Zbl. Bakt. Hyg. 241A:101-107.
- (156) Varaldo, P.E., Satta, G. and, G. Grazi. 1978. Grouping of Staphylococci of the basis of their bacteriolytic activity patterns. A new approach of taxonomy. J. Syst. Bacteriol. 28:141-147.

- (157) Venema, G. 1979. Bacterial transformation. Adv. Microbiol. Phys. 19:245-331.
- (158) Vierra, J., and J. Messing. 1982. The Puc plasmids and M113mp derived for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene. 19:59-282.
- (159) Vieu, J.F., and J. Allos. 1984. Existe in a epidemiologia geografica de los serogropos O de Pseudomonas aeruginosa. Bull. Soc. Path. 77:288-294.
- (160) Vieu, J.F., and B. Klein. 1976. Acinetobacter calcoaceticus phage typing scheme. Ann. Past.
- (161) Vieu, J.F. 1987. Efficacité et limites du contrôles des infections bactériennes nosocomiales. Med. Mal. Infect. 3:113-116.
- (162) Wahia, S., Madhavant, T., Williamson, T., and Kaiser, A. 1986. Usefulness of protein patterns, serotyping and plasmid profils in the epidemiological fingerpring of P. aeruginosa. First international meeting on bacterial epidemiological markers. Bruxelles.
- (163) Wahl, R., and J. Fouace. 1954. Apropos d'identification des staphylocoques pathogènes par les phages. Ann. Inst. Past. 87:159-168.
- (164) Walter, H. Traub Ella A., and Raymond, A. 1971. Epidemiological of S. marcescens. surveillance by bacteriotyping. App. Microbiol. 22:1058-1063.
- (165) Weber, K., and N. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by SDS gel electrophoresis. J. Bacteriol. 224:4404-4412.
- (166) Wenzel, R.P. 1986. The evalving art and science of hospital epidemiology. J. Infect. Dis. 153:462-470.
- (167) Williams R.E.O., and J.E. Bousset. 1953. Bacteriophage typing of Staphylococci. Lancet 510.

**REPROGRAPHIE CRILLON**  
**1-Rue Crillon-1**  
**13005 MARSEILLE**  
**Tél : (91) 48.65.12**