

# Diagnostic bactériologique

Pr. A. Benbouza  
Faculté de médecine  
Laboratoire Central de de Biologie  
Médicale-CLCC Batna



# I- Définition et intérêt

Le diagnostic bactériologique regroupe l'ensemble des étapes qui apportent la preuve **directe** ou **indirecte** d'une infection bactérienne suspectée cliniquement ; on distingue :

- ❖ **Le diagnostic direct** : qui permet d'isoler et d'identifier l'agent responsable à partir d'un produit pathologique.
- ❖ **Le diagnostic indirect** : qui permet de détecter les anticorps antibactériens spécifiques dans le sérum du malade. C'est la détection de marqueurs biologiques (réponse humorale ou cellulaire) témoins de la multiplication bactérienne dans l'organisme.

Les analyses sont effectuées en suivant les phases suivantes:

. **Phase pré-analytique** :

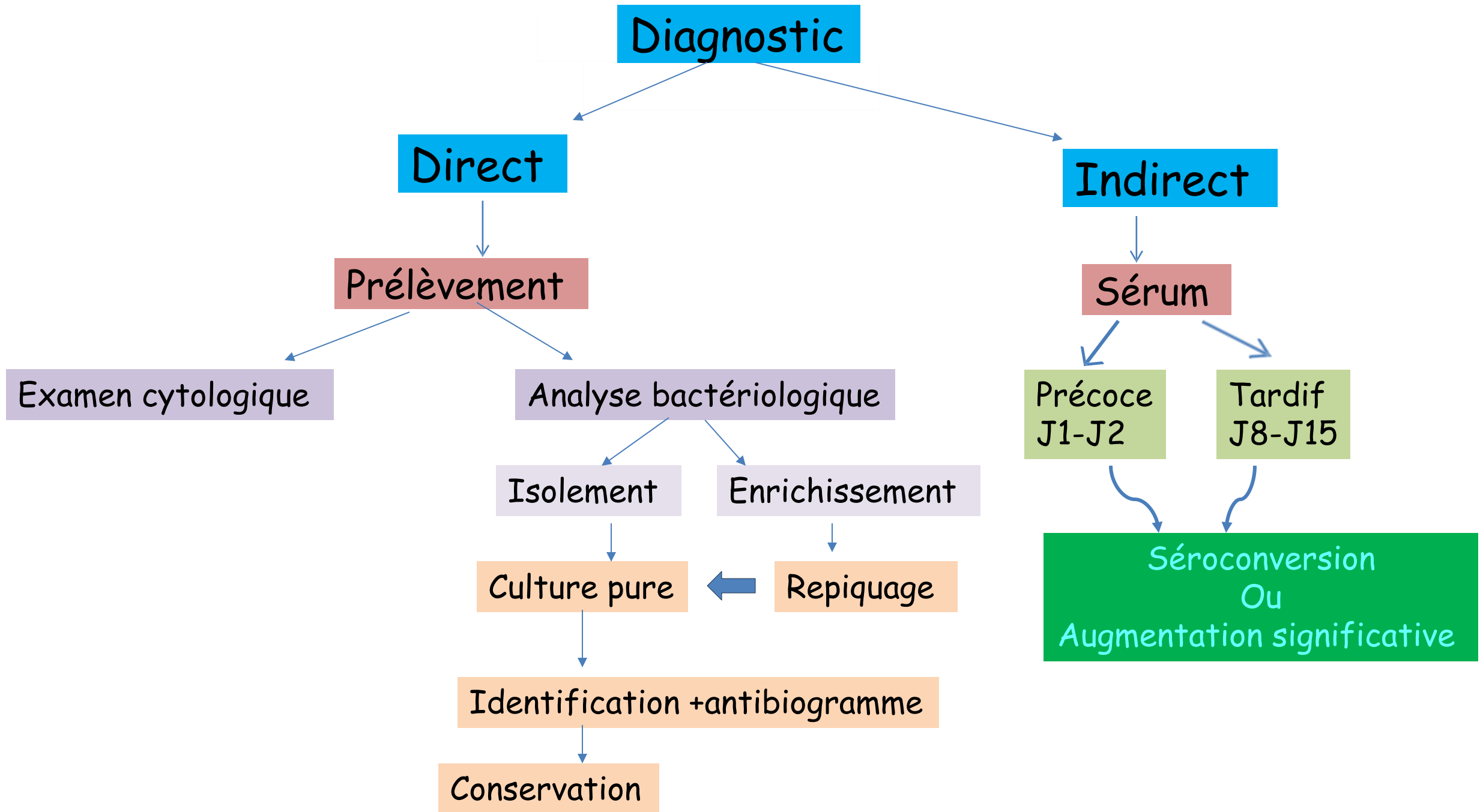
- Prescription et renseignements cliniques
- Prélèvement (transport, conservation)

Nb : bien étiqueter les prélèvements !

. **Phase analytique** (propre au laboratoire)

. **Phase post-analytique** :

- Expression
- Interprétation
- Et transmission des résultats



# Intérêt du diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique permet de:

- Confirmer une infection suspecter cliniquement exemple : examen cyto bactériologique du LCR pour le diagnostic des méningites bactérienne
- Identifier l'agent incriminé dans l'infection exemple : identifier le streptococcus pneumoniae comme agent d'une méningite
- Rectifier ou de prescrire un traitement antibiotique sur la base d'un antibiogramme.
- Dépister une infection cliniquement asymptomatique exemple : ECBU chez la femme enceinte, sérologie de la syphilis.

## II- Diagnostic direct

Il pose la preuve directe de l'infection en révélant la présence de la bactérie par culture, par le biais des Ag ou par le biais de son génome directement à partir du produit pathologique.

**1-Les principes généraux du prélèvement bactériologique :**

**QUALITE DU PRELEVEMENT TRES IMPORTANTE +++**

Le prélèvement doit répondre à des critères de qualité

*De la qualité du prélèvement et des conditions de son transport au laboratoire dépend la qualité et la fiabilité du résultat*

- *Quels prélèvements?*
- *Quand faire les prélèvements?*
- *Comment faire les prélèvements ?*
- *Comment les conserver avant leur transport?*
- *Comment les transporter au laboratoire?*

# Principes généraux du prélèvement:

## 1. Respect des conditions de stérilité

**Ne pas introduire des germes étrangers au prélèvement!!**

- ✓ Si prélèvement stérile: asepsie stricte ( Sang, LCR, LP, etc.)
- ✓ Si prélèvement polymicrobien: respect des caractères d'origine du prélèvement (expectoration, urines, pus d'abcès fistulisé etc.)
- ✓ Faire le prélèvement là où la multiplication des bactéries est la plus intense ( abcès, foyer infectieux)



## 2- Choix du moment:

- Avant tout traitement antibiotique si non sous fenêtre thérapeutique de 48H.
- Pics de température ou frissons

### Méthodes :

Utiliser du matériel stérile pour réaliser et collecter le prélèvement

- Prélèvements superficiels (seringue, curette, biopsie)

Rq : écouvillon à déconseiller (sauf pour téguments et muqueuses)

- Prélèvements profonds (jamais à l'écouvillon !)

### 3- Conservation et transport:

- dépendent de la nature du prélèvement
- Dépendent de la nature du germe suspecté

Transport : plus rapidement possible

< 30 min pour LCR, liquides de ponction, prélèvements per-opératoires.

Sinon utilisation de milieux de transport (ex. : Portagerm™)

**Pour la température et l'atmosphère de conservation:** on distingue :

- ❖ **Prélèvements à conserver à + 4°C :** il comporte une flore microbienne qui risque d'interférer avec l'agent causal, la multiplication de cette flore est ralentie à +4°C ce sont : les urines, les selles, les expectorations, le délai de conservation ne doit pas dépasser 2 heures

❖ **Prélèvements à conserver à 37°C** : ils ne comportent aucune flore associée, se sont le LCR, hémoculture, liquide de ponction, pus d'abcès non fistulisés, prothèses et pièces opératoires

❖ **Prélèvements qu'il faut mettre immédiatement en culture** : car ils ne tolèrent pas de conservation : prélèvement de gorge, d'oreille, gynécologiques et génitaux masculins.

Ces prélèvements seront de préférence effectués au niveau du laboratoire même

# Exemples de prélèvements

## Les urines :

- ✓ prélever les urines avant toute antibiothérapie
- ✓ prélever les urines ayant séjourné au moins 4 heures dans la vessie (les urines matinales de préférence)
- ✓ le prélèvement est précédé d'un lavage soigneux des organes génitaux externes, d'avant en arrière à l'eau et au savon suivi d'un rinçage à l'eau.
- ✓ le malade élimine le 1er jet puis prélève 20 ml du milieu du jet directement dans un flacon stérile en verre ou en plastique fourni par le laboratoire.
- ✓ les urines doivent être transportés au labo en moins d'une heure, ils peuvent être conservés à +4°C pendant une durée ne dépassant pas les 2 heures.



# Préparation patient et recueil de l'urine

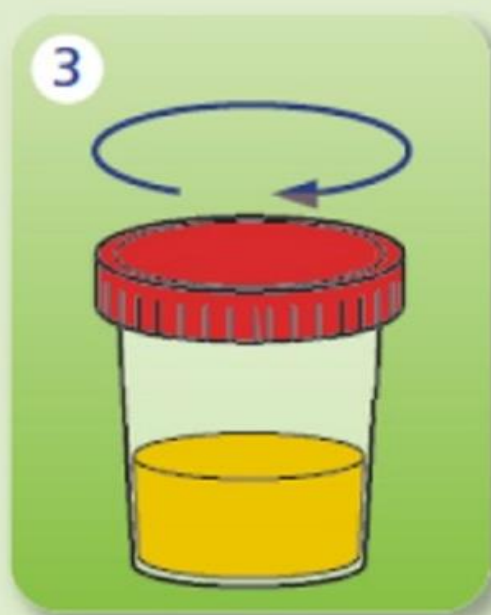
Hygiène et qualité dès le prélèvement



Se laver les mains puis  
procéder à une **toilette** intime  
minutieuse



**Uriner** le premier jet dans le WC  
puis **recueillir l'urine** dans le pot.



**Refermer** le pot.

## L'hémoculture:

- ✓ Prélèvement de sang avant toute antibiothérapie ou au cours d'une fenêtre thérapeutique au moment des pics précédés par des frissons
- ✓ Désinfection du site en évitant de palper la veine + port de gants stériles
- ✓ Utiliser un dispositif pour hémoculture (prélèvement de sang en circuit fermé) ou à défaut une seringue de 20ml
- ✓ Prélever un volume important de sang/flacon:
  - 7-10ml chez l'adulte;
  - 2-5 ml chez l'enfant;
  - 1-2ml chez le nouveau-né.

### 3- La fiche de renseignement

- Elle est primordiale+++
- Elle accompagne obligatoirement tout prélèvement destiné à une analyse microbiologique.
- Informations fournies :
  - Nom
  - Prénom
  - L'âge
  - Si le malade est hospitalisé: le nom du service, la date du prélèvement et la nature du prélèvement.
  - Notion d'antibiothérapie
  - Le diagnostic clinique ou à défaut un résumé clinique

# Enregistrement au laboratoire

Sur le registre du laboratoire:

- ✓ Numéro
- ✓ date de réception au laboratoire
- ✓ Nom, prénom, âge et sexe
- ✓ Adresse ou service hospitalier, nom du médecin
- ✓ Nature du prélèvement



Ce qu'on doit rechercher dans une analyse de prélèvement!!

## Bactéries pathogènes spécifiques

- Cause toujours le même type de maladie
- La maladie apparaît comme primitive
- La maladie ne peut se produire en l'absence de cette bactérie
- Cette bactérie est pathogène pour le sujet sain
- Le traitement antibiotique défini entraîne la guérison
- L'éradication de la bactérie entraîne l'éradication de la maladie

# Exemples de maladies à bactéries pathogènes spécifiques

- La Tuberculose
- La Lèpre
- La Diphtérie
- La Typhoïde
- La méningite cérébro-spinale
- La coqueluche etc....

# Bactéries pathogènes opportunistes

Les infections à bactéries pathogènes opportunistes sont multi factorielles : facteurs propres au terrain et facteurs liés à la pathogénicité de la bactérie

Le diagnostic de ce type d'infection repose sur des:

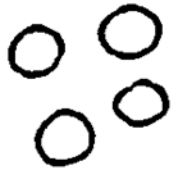
- Critères cliniques
- Critères biologiques ( bactério-immunologiques)
- Critères pathogéniques

## Les bactéries pathogènes opportunistes:

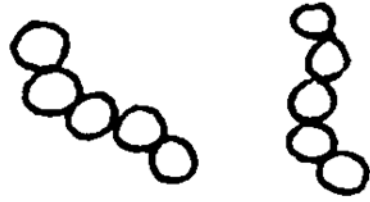
- Banales bactéries commensales de la peau et des muqueuses ou bactéries de l'environnement
- N'infectent pas le sujet à défenses antibactériennes efficaces
- Infectent les sujets à défenses immunitaires générales ou locales diminuées
- Ne déterminent pas d'infections spécifiques
- Donnent des infections pyogènes de sensibilité limitée aux antibiotiques

## 4- Les examens microscopiques

- Examen macroscopique: Aspect du prélèvement : clair, légèrement trouble, trouble, purulent, hématique, xanthochromique
- L'examen cytologique : il permet d'apprécier la réaction inflammatoire et de la chiffrer par mm<sup>3</sup> (ex : examen du LCR : 500/mm<sup>3</sup>) ; on utilise la cellule Nageotte ou la Malassez.
- L'état frais (× 40) : c'est l'examen d'une goutte de prélèvement entre lame et lamelle, on détecte les bactéries à l'état vivant, leur morphologie et si elles sont mobiles ou non.



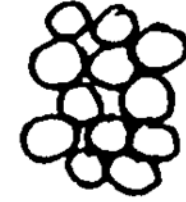
COCCI



COCCI EN CHAINE  
(streptocoque)



DIPLOCOQUES  
(pneumocoque)



COCCI EN AMAS  
(staphylocoque)



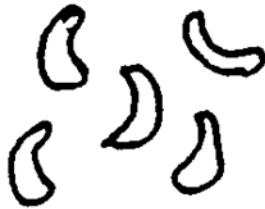
COCCOBACILLE



BACILLE



BACILLE FUSIFORME



VIBRIONS



SPIRILLE



BORRELIA



TREPONEME

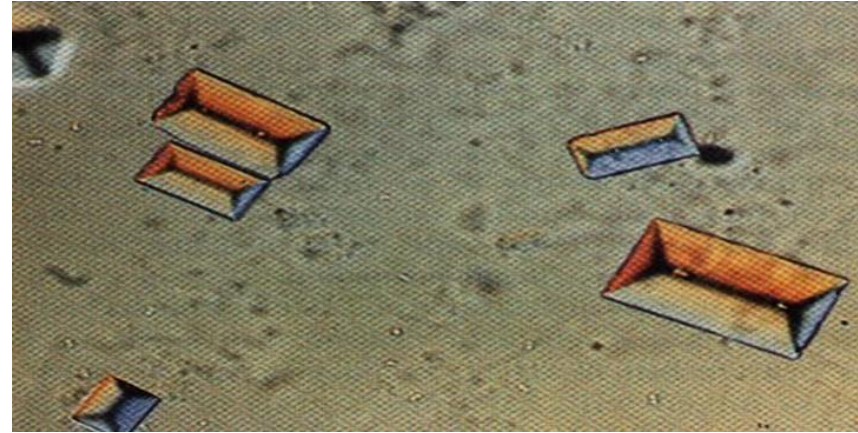


LEPTOSPIRE

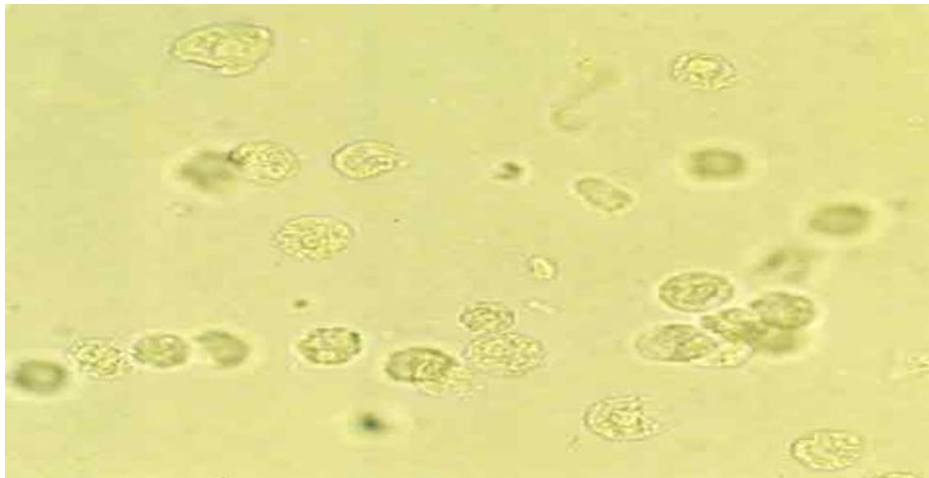
Cylindre leucocytaire



Cristaux d'oxalate de calcium



Leucocytes



Levures



**Les examens après coloration** : on distingue :

**Coloration simple** : ex coloration au bleu de méthylène

**Coloration de Gram** : (caractères morpho -tinctoriaux  
différencie entre les Gram+ et les Gram-.

**Coloration de Ziehl-Neelsen** : recherche des bacilles acido-  
alcoolo résistants (BAAR)

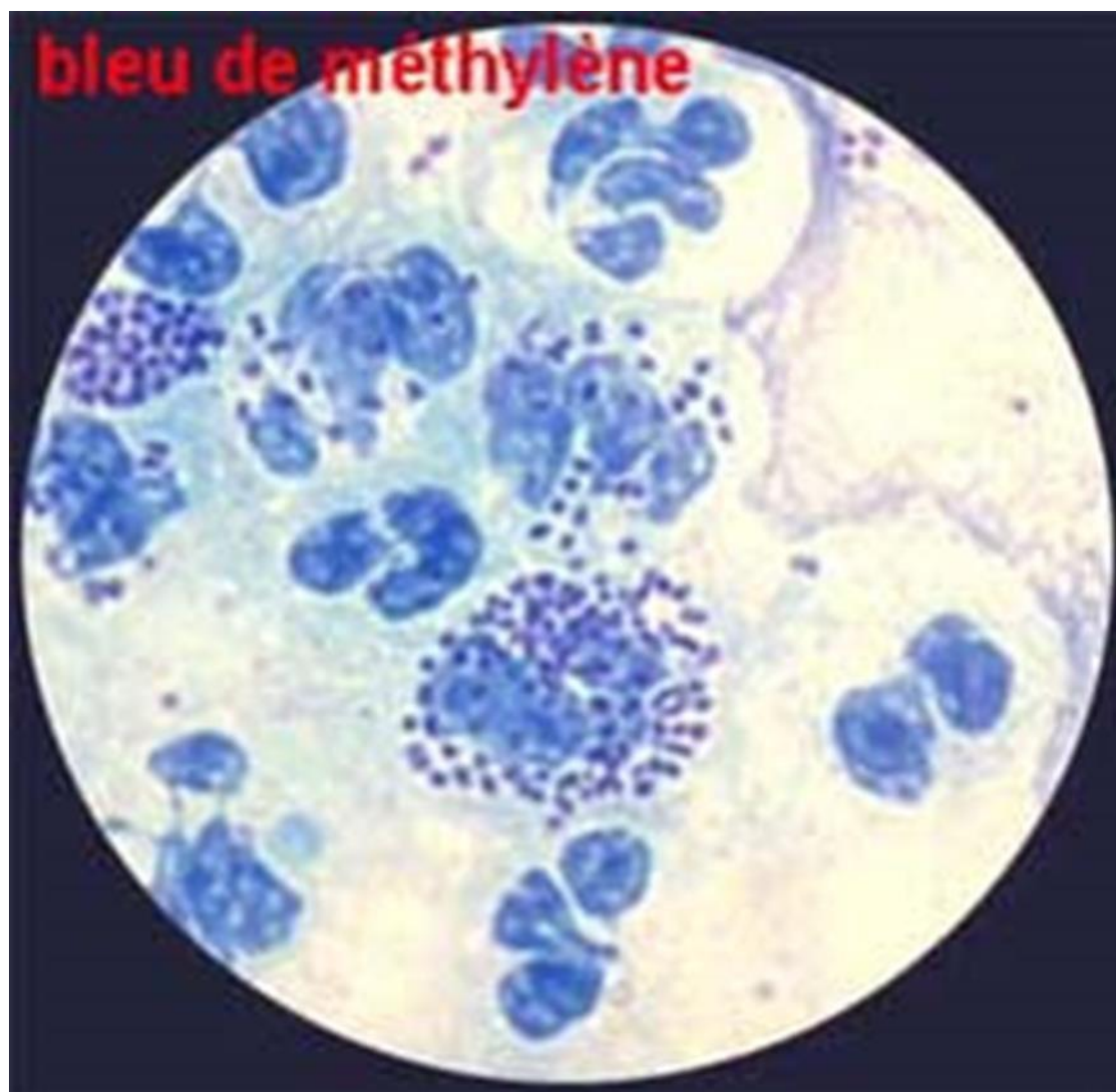
**Immuno- fluorescence directe aux anticorps monoclonaux** :  
permet de révéler la présence de certaines bactéries de  
culture difficile comme Legionella, Mycoplasme, Chlamydia ..

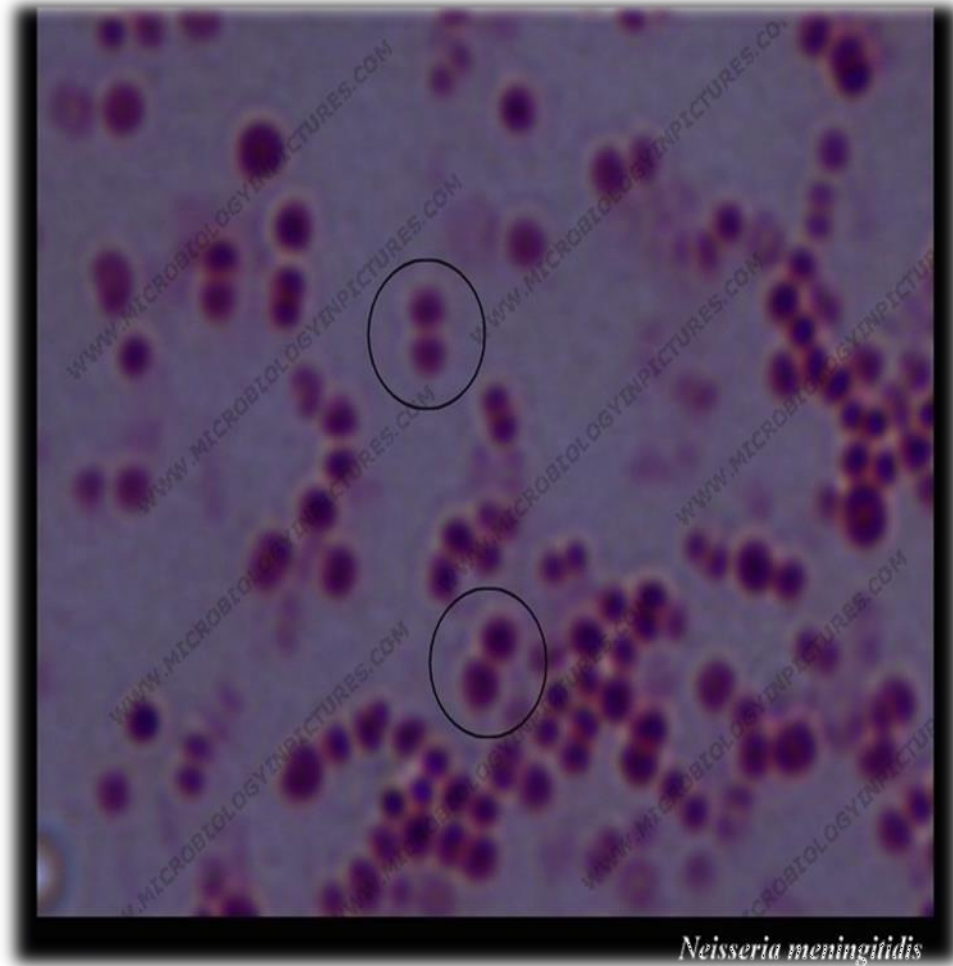
**MGG**: formule leucocytaire

**Imprégnation argentique**: tréponèmes

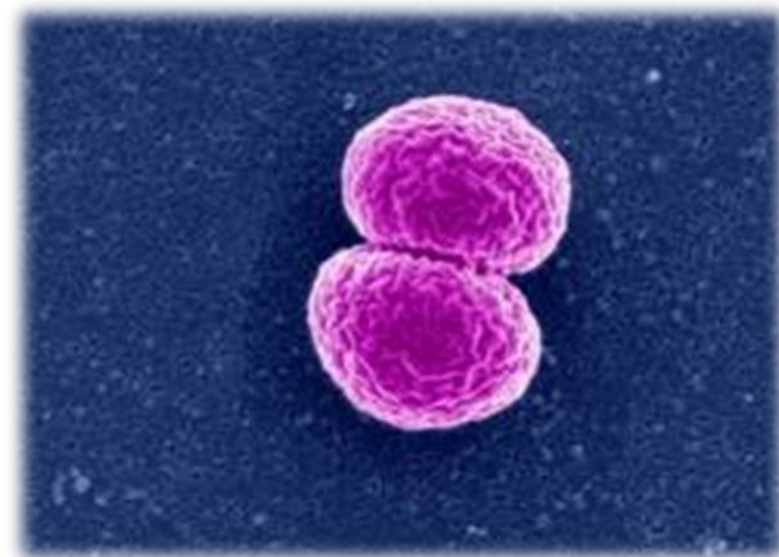
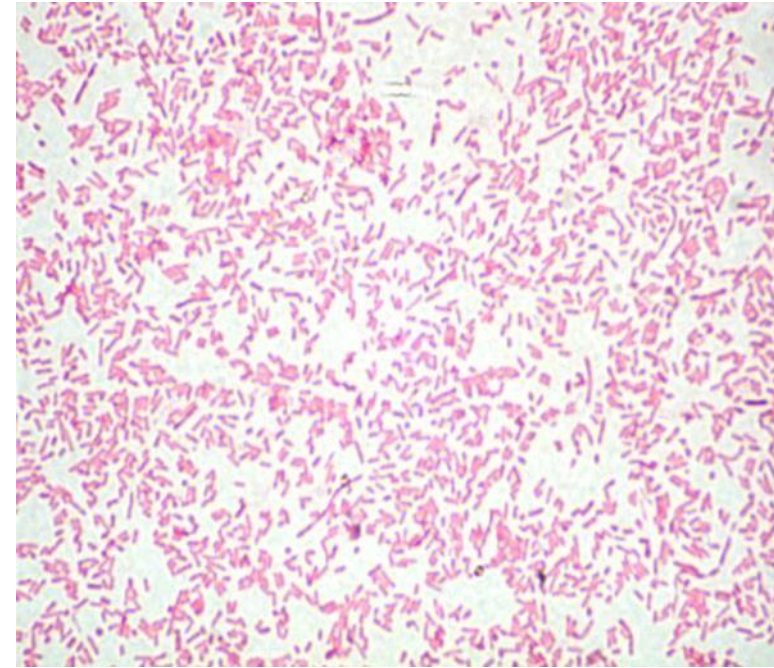


bleu de méthylène

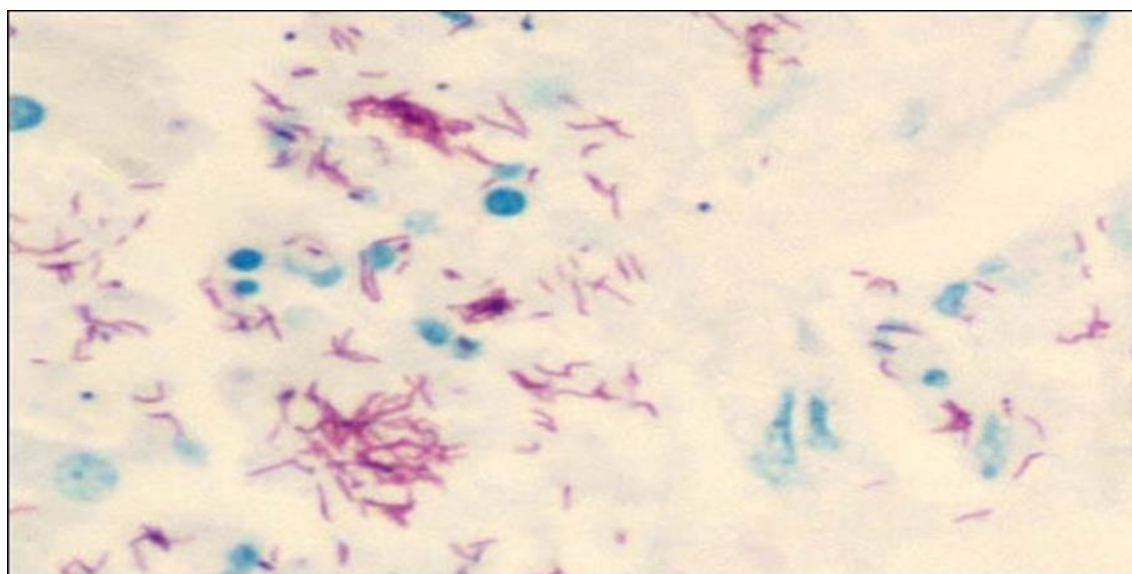
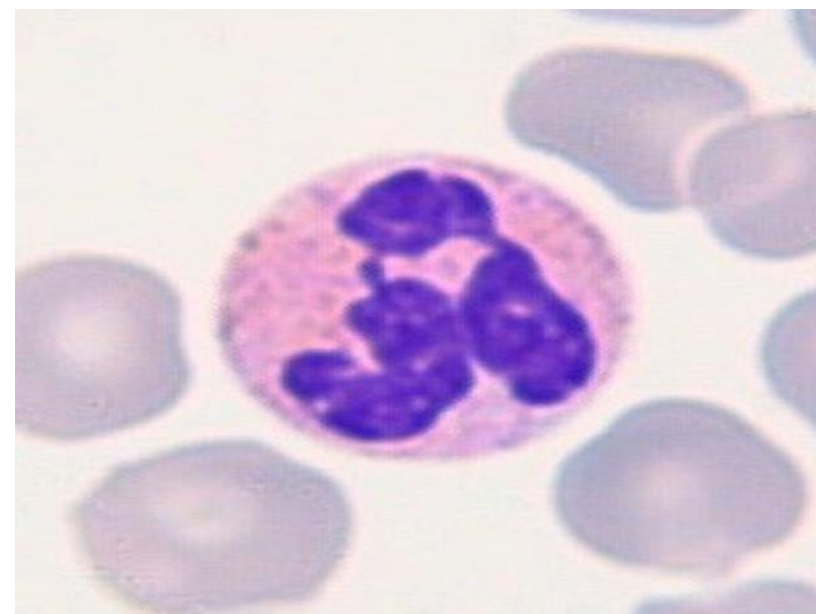
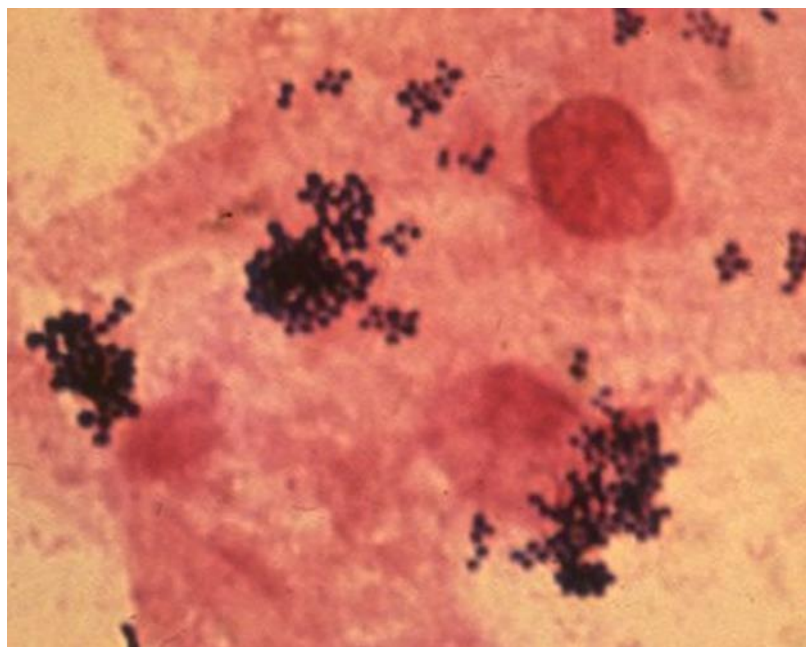




*Neisseria meningitidis*

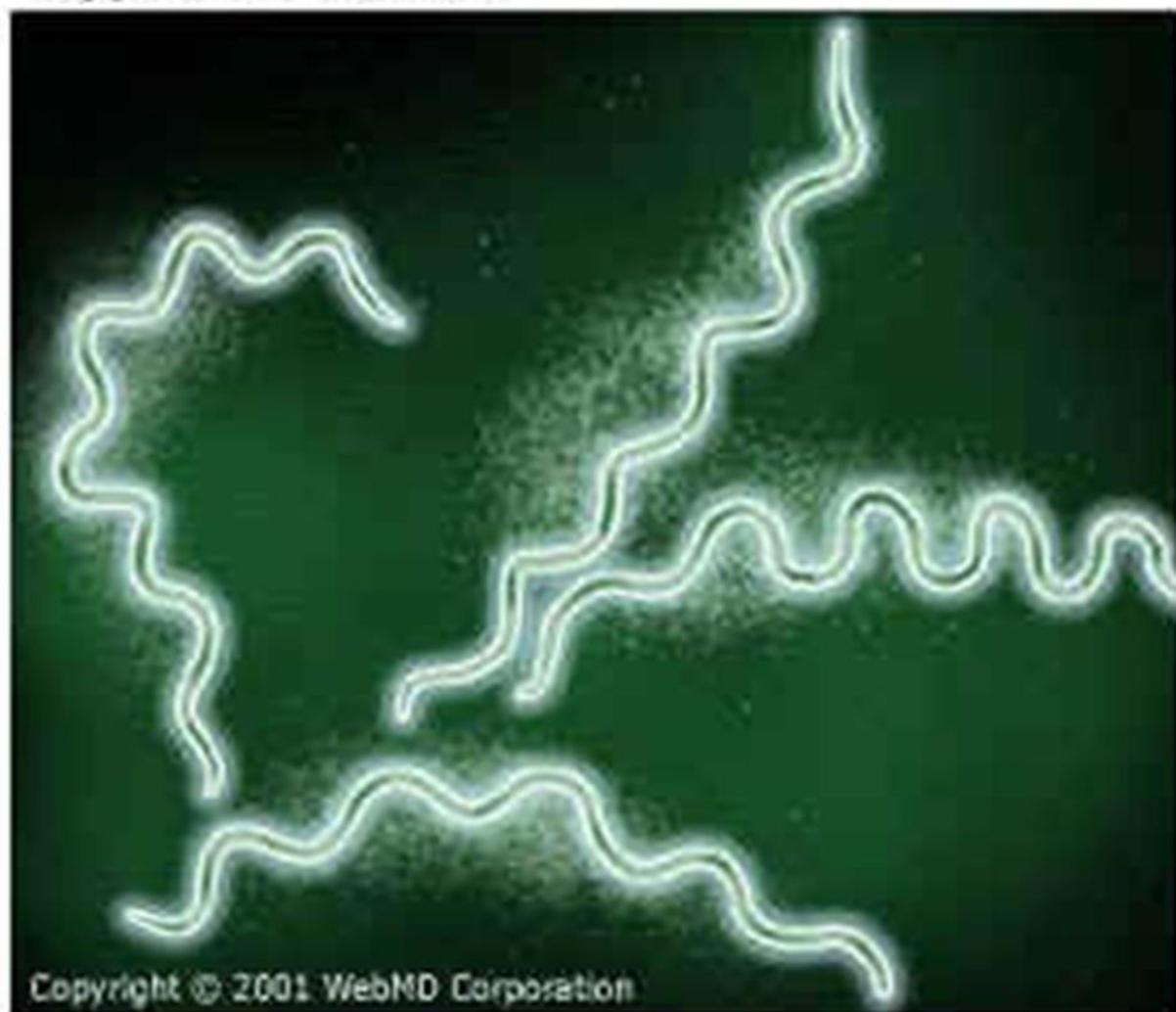








## Syphilis Bacteria



Copyright © 2001 WebMD Corporation

## Intérêt de l'examen direct

- Permet d'avoir des informations morpho-tinctoriales sur le germe, la richesse bactérienne, la présence de cellules polynucléaires ou lymphocytaires.
- Oriente les recherches ultérieures pour le choix des milieux à ensemer, les tests à lancer rapidement .
- Permet parfois de donner un diagnostic de forte présomption au clinicien qui peut commencer le bon traitement immédiatement.

## 5- la mise en culture



## Milieux d'isolement

**a)-milieux d'isolement** : se sont des milieux de culture utilisés pour isoler le ou les agents infectieux à partir du prélèvement :

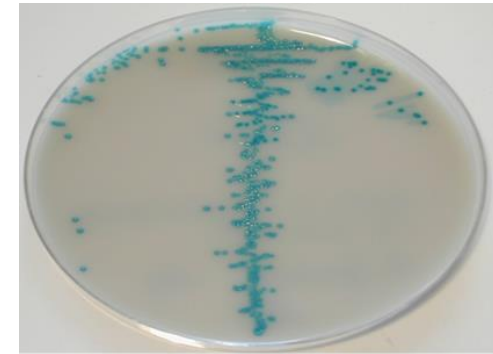
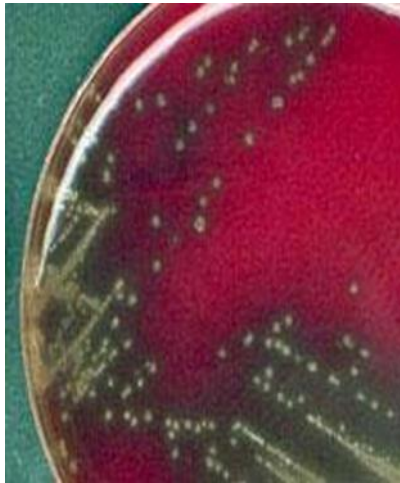
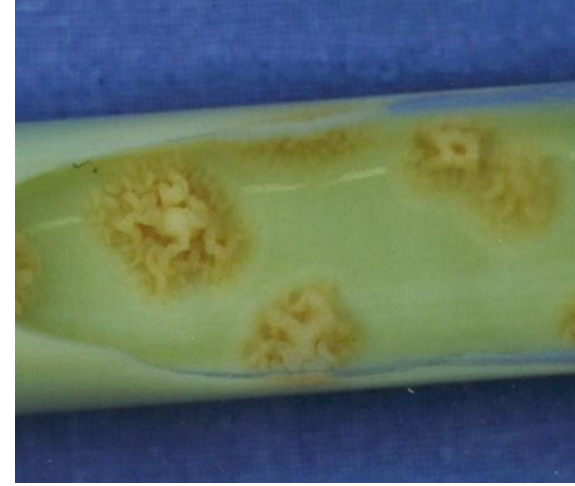
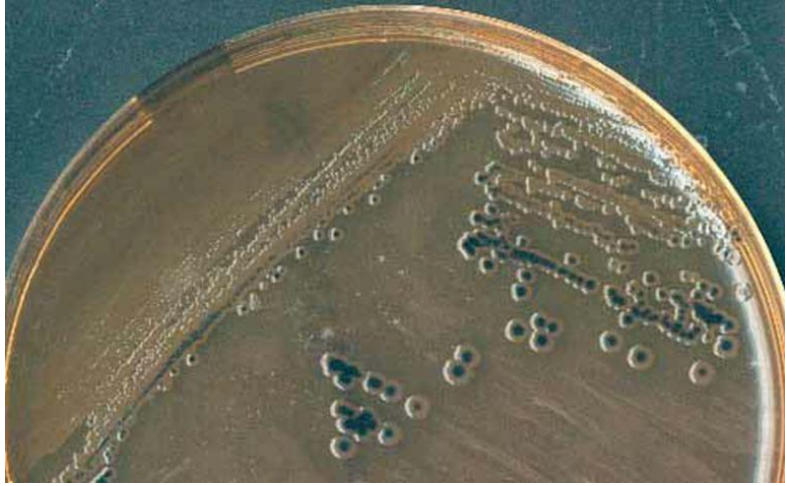
- ▣ \* des milieux ordinaires : gélose nutritive
- ▣ \* des milieux enrichis par du sang, du sérum ou autre ex : gélose au sang cuit.
- ▣ \* des milieux sélectifs d'isolement : ex milieu Chapman
- ▣ \* des milieux sélectifs d'enrichissements : ex eau peptonée alcaline.
- \* Milieux chromogènes pour l'identification présomptive



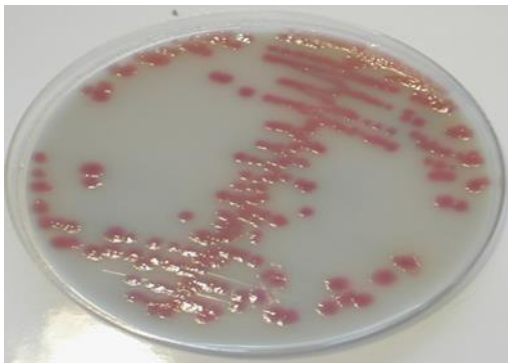
- Après ensemencement, ces milieux sont incubés à 37°C, le délai d'incubation dépend de la nature du germe recherché ex :
  - Neisseria gonorrhée : 48 heures
  - Entérobactéries, Staphylocoque : 24 heures
  - Brucella: 6 semaines
  - Mycobacterium tuberculosis: 72 j
- L'atmosphère dépend du germe recherché ex : Méningocoque, Gonocoque, Pneumocoque : incuber sous CO<sub>2</sub>.
- Anaérobies stricts : incuber en anaérobiose.

## b) Identification phénotypique

- Après incubation, les colonies bactériennes sont reconnues par leur caractère à la culture : aspect, pigment et odeur.
- les tests biochimiques qui permettent d'identifier la famille, le genre et l'espèce (test à l'oxydase, catalase, nitrate réductase...) l'identification peut prendre 24H à plusieurs jours.
- Tests explorant les conséquences du métabolisme
- Détection de produits de dégradation métaboliques ou d'enzymes impliquées dans la réaction ou de témoins de l'activité d'une enzyme



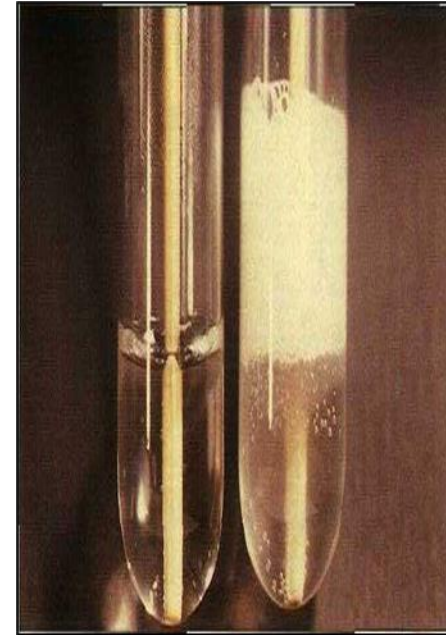
Enterocoques



## Tests rapides

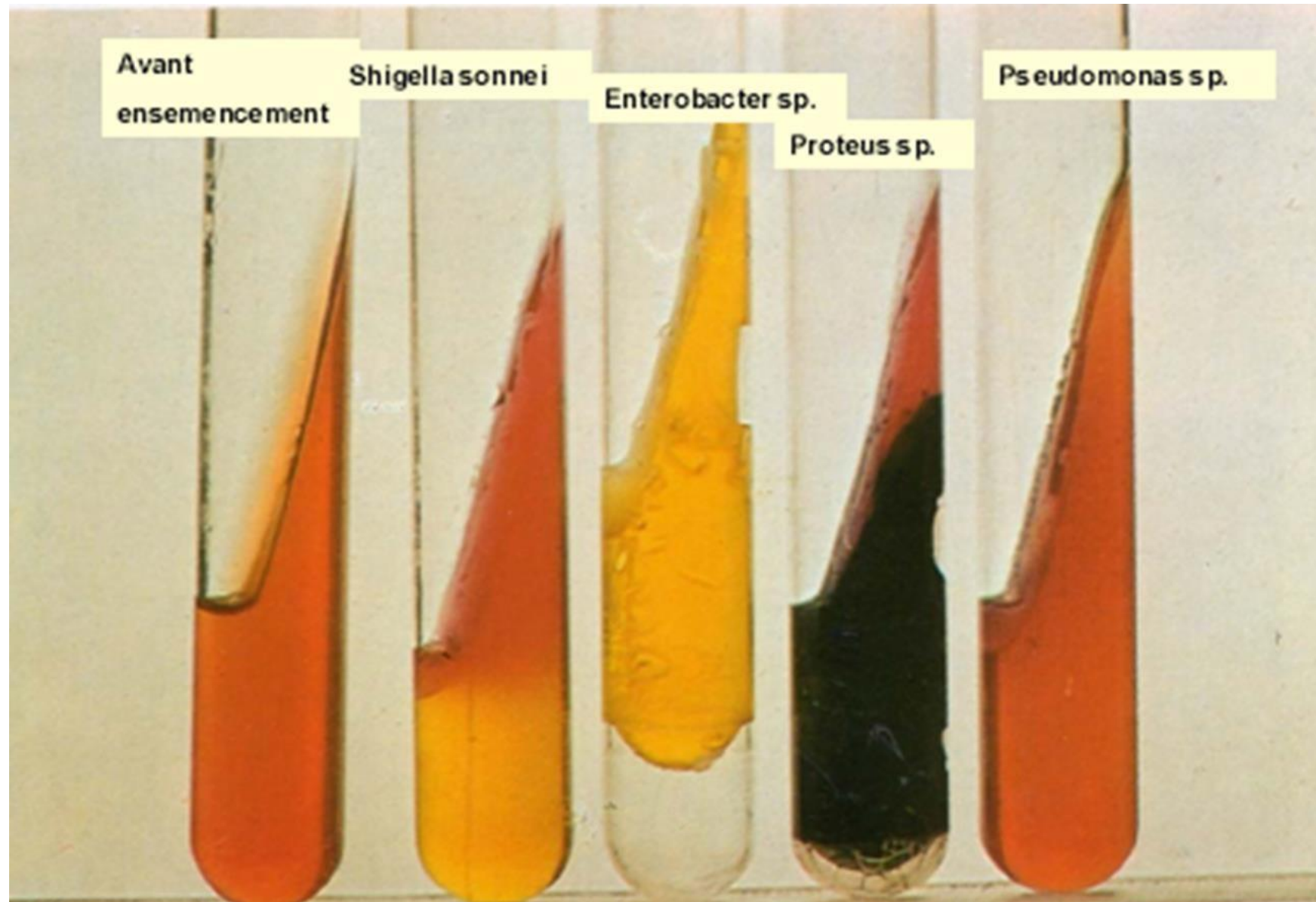


**Oxydase**



**Catalase**





## Galerie API20E

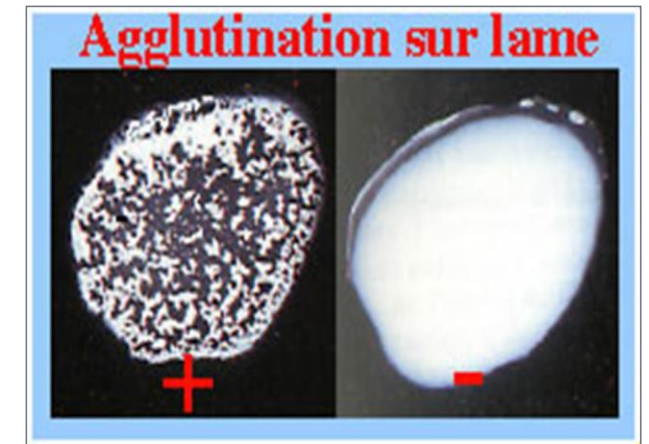


# Recherche des antigènes solubles

Infection décapitée par un TRT ATB préalable.

Technique: agglutination sur lame de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques: facile, rapide, la plus utilisée au laboratoire

Dans le cas d'un L.C.R. Chauffer l'échantillon 3 minutes à 100°C (incubateur sec ou bain-marie) ramener à température ambiante puis centrifuger 5 minutes à 3000 g



LE DIAGNOSTIC EST COMPLETE PAR  
LES TESTS DE SENSIBILITE



## 6 - L'antibiogramme

Méthode de diffusion sur milieu solide:

- permet de détecter le phénotype de résistance
- Milieu en fonction du germe : MH, MH au sang
- Il consiste à mettre en contact le germe avec des disques de papier buvards imprégnés d'un ATB donné, pour cela on étale une suspension microbienne du germe étudié sur la surface du milieu Muller -Hinton et on place les disques d'ATB sur la gélose espacée de 25mm.

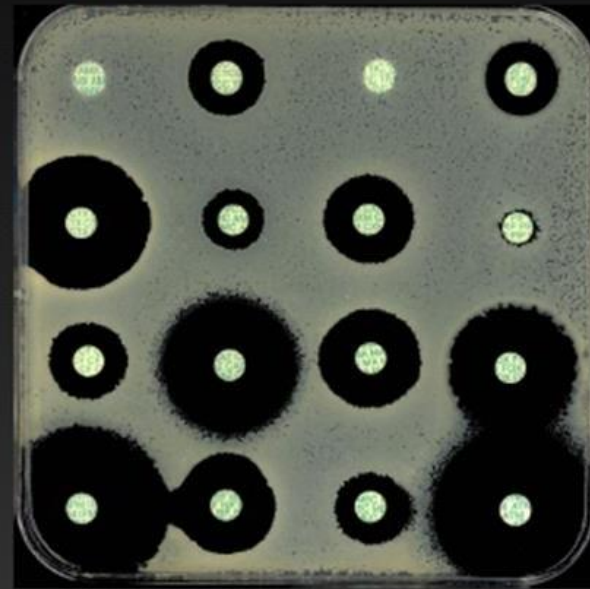
- Après 24H d'incubation à 37°C des zones d'inhibitions apparaissent autour de chaque disque, le diamètre de chaque zone est comparé à un diamètre critique ce qui permet de classer la bactérie dans la catégorie
- **R** (résistant)
- **I** (intermédiaire)
- **S** (sensible).

## La résistance acquise

*Escherichia coli*  
souche sensible



*Escherichia coli*  
souche résistante



# Diagnostic par les techniques de biologie moléculaire

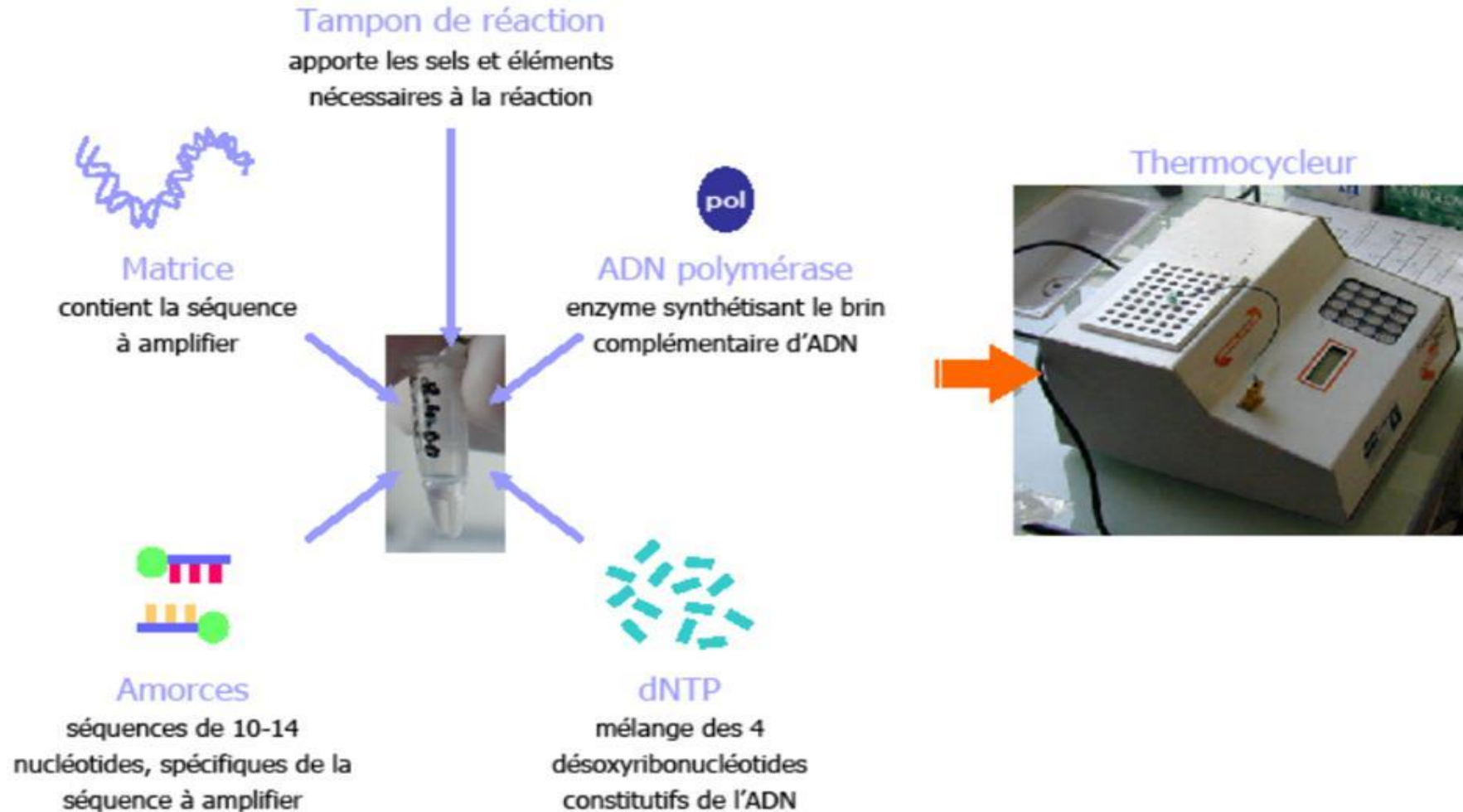
- Le diagnostic au laboratoire par biologie moléculaire est une technique qui permet de détecter la présence ou l'absence d'une infection. Elle est basée sur l'analyse des acides nucléiques d'un échantillon biologique, comme le sang, les urines ou les tissus.
- Mise en évidence des marqueurs moléculaires
- Identification d'un gène spécifique dans un mélange de fragments d'ADN bactérien par PCR

## L'amplification en chaîne par la polymérase (PCR pour Polymerase Chain Reaction)

- Amplification in vitro d'une séquence d'ADN à partir d'un échantillon peu abondant.
- Permet de :
  - ✓ Cibler un segment d'ADN particulier dans le génome
  - ✓ Recopier (amplifier) ce segment des millions de fois pour le rendre visible.

# Amplification par PCR

## Principe



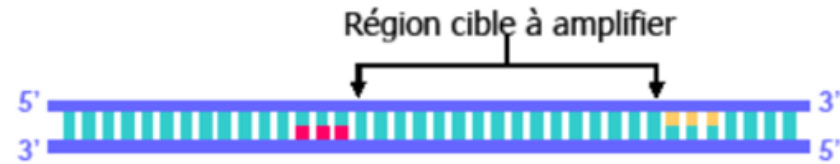
# *Etapes de la PCR*

Cycles successifs avec succession de **trois phases**

- **Dénaturation** par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92- 95° C) (30 secondes-1 minute).
- **L'hybridation** avec les deux amorces spécifiques entre 50-60° C. Cette température dite d'annealing (ou accrochage des amorces) est un paramètre important pour la réussite de la PCR et doit être calculée en fonction du  $T_m$  (Température de fusion ou Melting température) des deux amorces. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1 minute).
- **Extension** par l'ADN polymérase à partir des amorces à 70-72° C (1-2 minutes). La durée dépend de la taille du fragment à amplifier.



## 1<sup>er</sup> cycle de PCR



- 1 **Dénaturation** (95°C – 1 mn) : séparation des 2 brins d'ADN



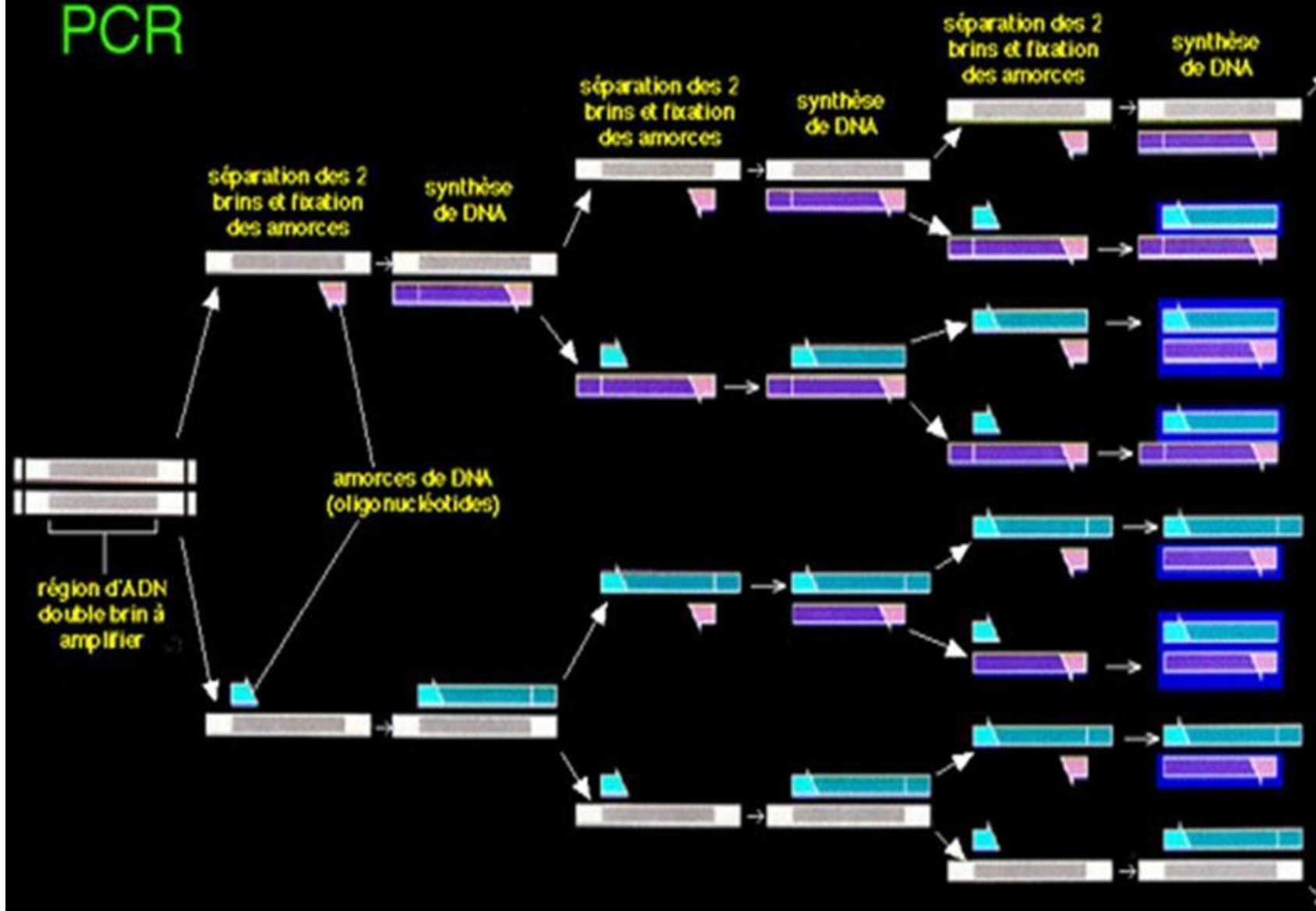
- 2 **Hybridation spécifique des amorces** (dépend des amorces env. 55°C)



- 3 **Elongation** (72°C – 1 mn) : synthèse d'un nouveau brin d'ADN par la polymérase



# PCR



✓ **Détection directe à partir de prélèvements par amplification génique (PCR) :**

- Amplification de l'ARN 16S sur valves cardiaques
- Détection des agents de méningites communautaires : (*N. meningitidis*, *L. monocytogène*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*) sur LCR
- Détection de *Chlamydia trachomatis* (sur urines et prélèvements génitaux)
- Détection de *M. tuberculosis* (sur prélèvements pulmonaires et autres)

✓ **Identification de bactéries à partir de colonies :**

- Amplification et séquençage de gènes cibles (ex. ARN 16S)

✓ **Détermination de la sensibilité aux ATB :** ex : Méricilline chez *S. aureus* (*S. aureus* résistant à la Méricilline - SARM)

# INTERPRETATION

- ◉ Lecture et interprétation des résultats:
- ✓ Interprétation facile: germes spécifiques
  - Tableau de typhoïde et isolement de *S. typhi*
  - Tuberculose et isolement de *M. tuberculosis*
  - Méningite cérébro-spinale et isolement de *N. meningitidis*
- ✓ Interprétation difficile: germes opportunistes Tenir compte:
- ◉ De la bactérie
- ◉ Du type de prélèvement ( mono ou poly microbien)
- ◉ Du malade et de l'histoire clinique
- ◉ Du contexte épidémiologique

# EXEMPLE 1:diagnostic d'une septicémie

## ● Prélèvements

- > Urgence
- > Sang complet ( 10 ml) stérilité absolue
- > Pics thermiques
- > Répéter
- > Avant toute antibiothérapie

## ● Examen bactériologique

- > Incubation
- > Examen microscopique et mise en culture
- > Identification
- > Antibiogramme

## EXEMPLE 2: diagnostic d'une méningite

### ● Prélèvements

- > Urgence
- > LCR ( 3 ml répartis dans trois tubes) stérilité absolue
- > Avant antibiothérapie

### ● Diagnostic bactériologique

- > Etude cytologique quantitative et qualitative (polynucléaires ou lymphocytes)
- > Etude biochimique ( glucose, chlorures, protéines)
- > Etude bactériologique ( microscopie directe, culture, identification biochimique et antigénique, antibiogramme)

## Exemple 3: diagnostic d'une tuberculose

### ⊙ Prélèvements

- › Expectoration: crachats, aspiration bronchique, tubage gastrique
- › Stérilité absolue non exigée
- › Conservation et transport

### ⊙ Diagnostic bactériologique

- › Examen microscopique après coloration spécifique ( BAAR)
- › Mise en culture après décontamination et centrifugation
- › Ensemencement sur milieu de culture spécifique
- › Incubation pendant 72 j si culture négative
- › Lecture des résultats et interprétation, rendu au clinicien
- › Antibiogramme si résistance de la bactérie aux anti tuberculeux



# III- Diagnostic indirect ou sérologique

## Objectifs:

Établir le diagnostic étiologique d'une infection par la recherche d'anticorps circulants synthétisés en réponse à la multiplication bactérienne:

- lorsque la mise en évidence de l'agent causal est techniquement difficile par les méthodes traditionnelles (ex. *T. pallidum*)
- lorsque la mise en évidence de l'agent causal est impossible (diagnostic rétrospectif d'une infection guérie)
- lorsque la mise en évidence de l'agent causal nécessite des prélèvements trop invasifs (ex. l'encéphalite listérienne)

Il consiste en la détection, chez le patient d'anticorps spécifiques de l'agent bactérien incriminé dans l'infection et ce à titre significativement élevé ; en effet il y a une séroconversion ou une augmentation significative du titre des AC entre un sérum précocé et un sérum tardif.

Ces techniques utilisent le principe de la réaction AG- AC immunologique ; la technique utilisée peut être :

- Agglutination ou hémagglutination (HA)
- Immunofluorescence indirecte (IFI)
- Technique immuno-enzymatique type Elisa
- Techniques d'Immuno-Blots (IB) ou Western-Blots (WB)

## IV- Conclusion

Quelques points à retenir:

- 1- Qualité du prélèvement
- 2 -Qualité de l'analyse bactériologique
- 3 Rigueur dans l'interprétation et la validation des résultats
- 4 Rapidité de l'envoi des résultats

Coopération entre clinicien et bactériologiste