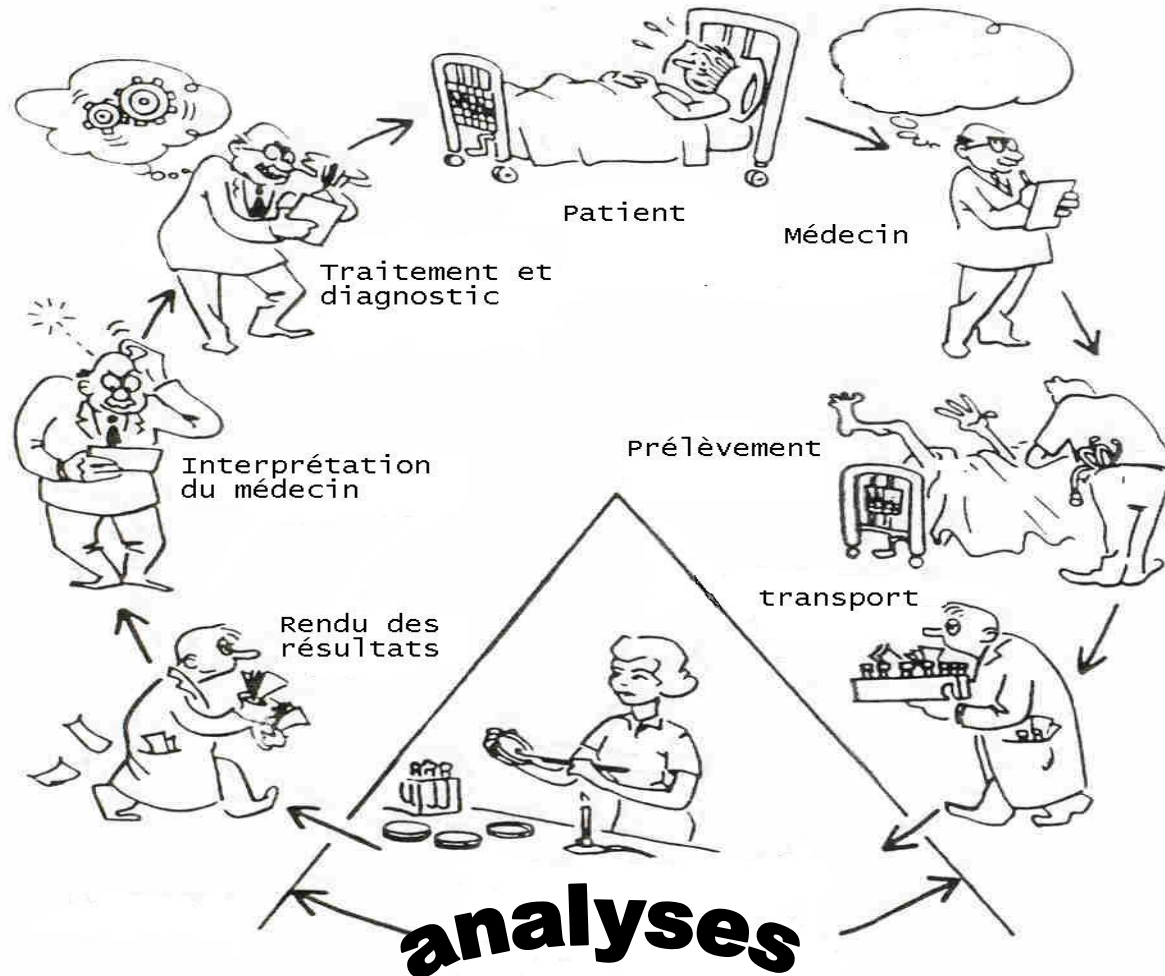


# Rappel : diagnostic conventionnel des infections bactériennes

# Diagnostic bactériologique : intégré dans l'ensemble de la prise en charge du patient



# Diagnostic conventionnel en bactériologie

## (1) les étapes de l'examen bactériologique

J0

examen microscopique



J1

culture



J2

identification/antibiogramme



# Diagnostic conventionnel en bactériologie

## (2) les étapes de l'examen bactériologique

---

### Diagnostic direct :

- démontrer la nature infectieuse bactérienne de la lésion
- trouver le ou les bactéries responsables
- déterminer leur sensibilité *in vitro* aux antibiotiques

### Biologie moléculaire

### Diagnostic indirect :

Sérologie pour certaines infections (ex : germes non cultivable)



# Prélèvements

**J0**

examen microscopique

**J1**

culture

**J2**

identification/antibiogramme





# Délai de transport et conservation des échantillons

---

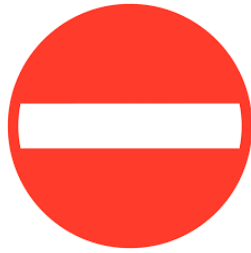
- ▶ règle générale : les bactéries ne résistent pas à la dessiccation et au froid. ex : biopsie, temps max = 15 à 20 mn, autres prélèvements = 2h
- ▶ utiliser des milieux de transport : ex : tube boraté pour les ECBU (évite la prolifération bactérienne une fois l'ECBU prélevé)
- ▶ dans certains cas, milieux de type hémoculture (Bactec, BioMerieux)
- ▶ conservation à 4°C déconseillée pour :  
*S. pneumoniae*, *Haemophilus spp*, *N. meningitidis*.

Idéal = ensemencement immédiat

Pour des **analyses de biologie moléculaire ultérieures** le maintien de **l'intégrité de l'ADN** et **l'absence de contamination** par les flores est essentiel !

ex. pneumocoque se lyse ...

# Prélèvements (idem pour biologie moléculaire)



**Prélèvement superficiel  
= mauvais rendement**

✓ **écouvillons**

✓ **fistule**

⇒ interférence avec les flores  
endogènes / peu de matériel prélevé

✓ **redons** ⇒ ne sont d'aucune  
utilité pour poser un diagnostic  
d'infection







- **prélèvements liquides** : urine, ponctions, lavages broncho-alvéolaires, hémocultures ...
- **prélèvements solides**: biopsie tissulaire, valves, vaisseaux,
- **fragments d'os....**
- dans pot stérile sec (après désinfection soigneuse)
- **avant toute antibiothérapie +++**

⇒ **prélever là où est l'infection**

⇒ **envoyés avec feuille de renseignements complète !**

# Un exemple de feuille de demande confuse

ANCE QUE  HÔPITAUX DE PARIS		Imp "AP/HP" K 88 Bis	Résultats à remettre au SCE du Dr. Houdard
BLISSEMENT: GH pst			
VICE: ap urgences			
EXAMEN DE LABORATOIRE			
4: -		Indice	(16)
om: 	B		
nen demandé: Bactéri			- Recherche Mycobactéri
			- Culture G+ G-
5/12/2014			
Signature du Service demandeur: 			



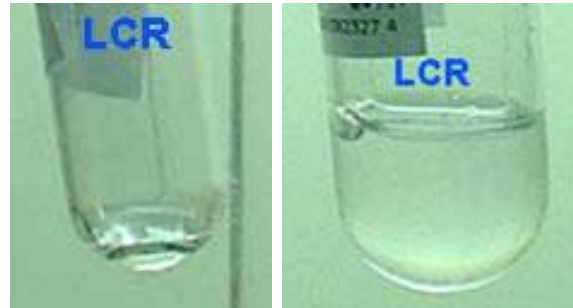


# JO au laboratoire : aspect macroscopique

Urine



Liquide céphalo-rachidien



Liquide articulaire

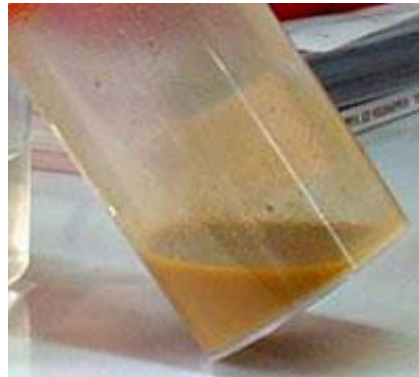


TROUBLE

Liquide pleural



HEMATIQUE



PURULENT

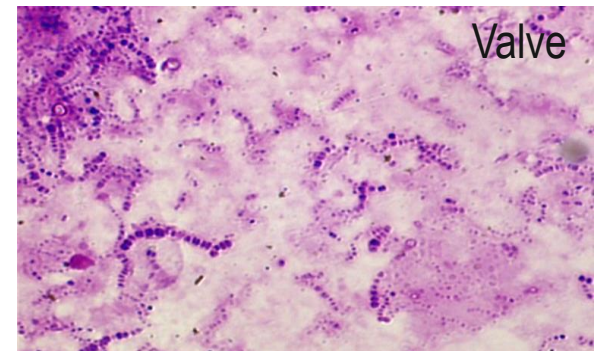
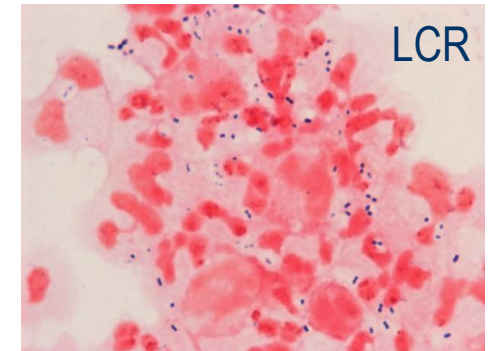
# J0 au laboratoire : microscopie

Quelles informations donnent la microscopie ?

- **la présence de bactéries** : cocci ou bacilles, à GRAM positif ou à GRAM négatif. La vision d'une flore polymicrobienne, ou au contraire d'une seule catégorie de bactérie (ex. que des bacilles à GRAM négatif) est à prendre en considération pour l'interprétation du résultat des cultures et le choix d'une antibiothérapie probabiliste

**Seuil = ?**

- **la présence de polynucléaires neutrophiles**  $\pm$  altérés est en faveur d'une **infection** bactérienne



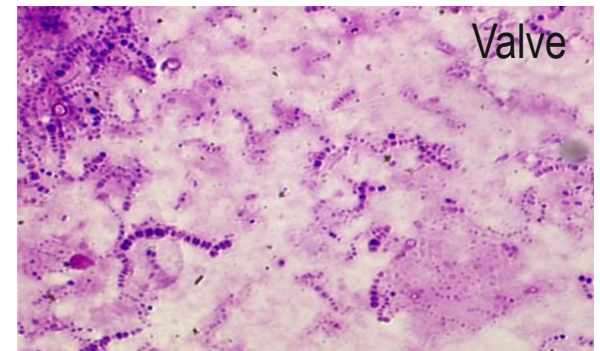
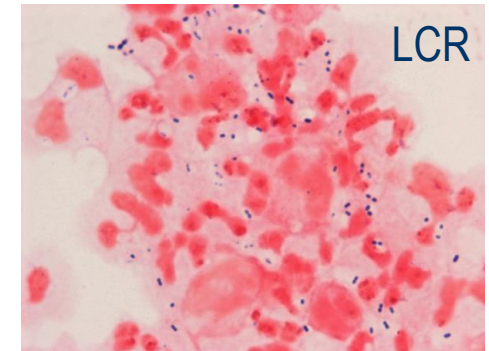
# J0 au laboratoire : microscopie

Quelles informations donnent la microscopie ?

- **la présence de bactéries** : cocci ou bacilles, à GRAM positif ou à GRAM négatif. La vision d'une flore polymicrobienne, ou au contraire d'une seule catégorie de bactérie (ex. que des bacilles à GRAM négatif) est à prendre en considération pour l'interprétation du résultat des cultures et le choix d'une antibiothérapie probabiliste

**Seuil =  $10^{3-4}$  bactéries/ml**

- **la présence de polynucléaires neutrophiles**  $\pm$  altérés est en faveur d'une **infection** bactérienne



# Impact médical = premières conclusions

Renseignements fournis par l'**examen macroscopique et microscopique** :

- liquide clair/trouble ...
- polynucléaires neutrophiles ?
- bactéries ?
  - monomicrobien / polymicrobien ?
  - mobiles ?
  - Gram+, Gram- ?

⇒ choix **thérapeutique empirique** (= antibiothérapie probabiliste)



💣\* **Cas particulier des hémocultures** = flacons → directement incubés dans des automates ⇒ **pas d'examen microscopique !!!**

# Place des outils moléculaires dès J0 ?

---

J0

examen microscopique



A votre avis ?

réfléchissez y

...

réponse après la  
pause !



# Mise en culture

**J0**

examen microscopique

**J1**

culture

**J2**

identification/antibiogramme





# Toutes les cultures ne sont pas faites au même endroit au sein du laboratoire de laboratoire (ex. L3 pour les mycobactéries)

---



Pression  
négative



Accès sécurisé  
via un sas



Masque FFP2 en permanence



Manipulation sous  
**Poste de  
Sécurité  
Microbiologique**

# J0 au laboratoire : mise en culture

---

- faite sur milieux enrichis, solides et liquides, sélectifs et non sélectifs en aérobiose et en anaérobiose en fonction :
  - . de la quantité du prélèvement
  - . des informations cliniques
  - . du résultat de l'examen microscopique
- requiert :
  - . 18 à 24h pour les bactéries usuelles
  - . 1 à 5 jours pour les anaérobies et certaines autres bactéries plus rares
  - . 1 semaine à 3 mois pour les mycobactéries
- permet une appréciation quantitative ou semi-quantitative des bactéries présentes dans le prélèvement (1 colonie = 1 bactérie), et le rapport entre les espèces dans le cas d'un prélèvement polymicrobien



- permet l'identification des bactéries isolées (requiert encore 18 à 24h en général)

**Seuil = ?**

# J0 au laboratoire : mise en culture

---

- faite sur milieux enrichis, solides et liquides, sélectifs et non sélectifs en aérobiose et en anaérobiose en fonction :
  - . de la quantité du prélèvement
  - . des informations cliniques
  - . du résultat de l'examen microscopique
- requiert :
  - . 18 à 24h pour les bactéries usuelles
  - . 1 à 5 jours pour les anaérobies et certaines autres bactéries plus rares
  - . 1 semaine à 3 mois pour les mycobactéries
- permet une appréciation quantitative ou semi-quantitative des bactéries présentes dans le prélèvement (1 colonie = 1 bactérie), et le rapport entre les espèces dans le cas d'un prélèvement polymicrobien
- permet l'identification des bactéries isolées (requiert encore 18 à 24h en général)



**Seuil = 1-10 bactéries/ml**

# J1 au laboratoire : lecture des milieux de culture

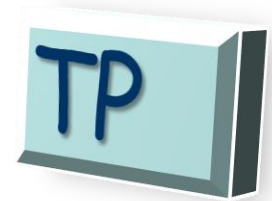


# Comment identifier ?

## Identification phénotypique:

- **méthodes rapides:**

- ▶ milieux sélectifs et chromogènes
- ▶ pneumocoque et optochine
- ▶ Tests biochimiques simples et rapides :
  - ▶ Cocci à Gram positif : catalase
  - ▶ Streptocoque  $\beta$ -hémolytique et groupage
  - ▶ Staphylocoque: slide, coagulase
  - ▶ Bacilles Gram négatif : oxydase



- **méthode requérant 24h de culture supplémentaire :**

- galeries API (Streptocoques, entérobactéries, aérobie stricts, anaérobies)
- automates : Vitek® (Bio-Mérieux), Phoenix® (Becton-Dickinson), Walk-Away® (Siemens)

⇒ nom exact de la bactérie en 24h (parfois moins)

- **méthode rapide récente = spectrométrie de masse (Maldi-TOF)**

⇒ révolution technologique

⇒ nom exact de la bactérie en quelques minutes à un faible coût

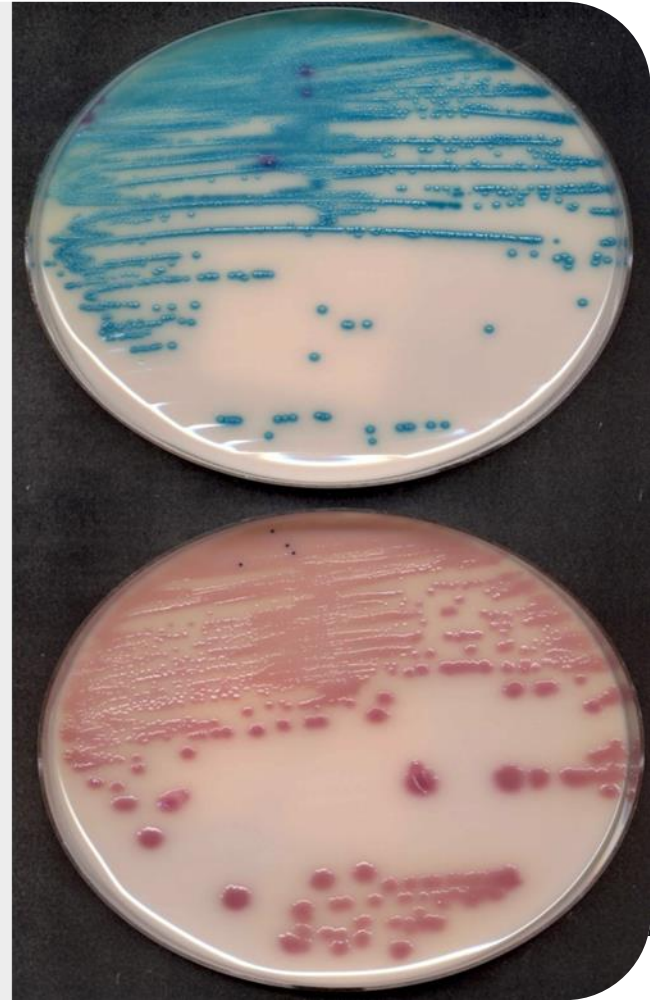




# Comment identifier ?

$10^6$  UFC/ml  
Entérocoque

$> 10^7$  UFC/ml *E.coli*



(siemens)

(di-TOF)

- ⇒ révolution technologique
- ⇒ nom exact de la bactérie en quelques minutes à un faible coût

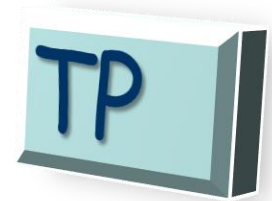


# Comment identifier ?

## Identification phénotypique:

- **méthodes rapides:**

- ▶ milieux sélectifs et chromogènes
- ▶ pneumocoque et optochine
- ▶ Tests biochimiques simples et rapides :
  - ▶ Cocci à Gram positif : catalase
  - ▶ Streptocoque  $\beta$ -hémolytique et groupage
  - ▶ Staphylocoque: slide, coagulase
  - ▶ Bacilles Gram négatif : oxydase



- **méthode requérant 24h de culture supplémentaire :**

- galeries API (Streptocoques, entérobactéries, aérobie stricts, anaérobies)
- automates : Vitek® (Bio-Mérieux), Phoenix® (Becton-Dickinson), Walk-Away® (Siemens)

⇒ nom exact de la bactérie en 24h (parfois moins)

- **méthode rapide récente = spectrométrie de masse (Maldi-TOF)**

⇒ révolution technologique

⇒ nom exact de la bactérie en quelques minutes à un faible coût



# Impact médical = conclusions à J1

Renseignements fournis par l'examen macroscopique et microscopique :

- liquide clair/trouble ...
- polynucléaires neutrophiles ?
- bactéries ?
  - monomicrobien / polymicrobien ?
  - mobiles ?
  - Gram+, Gram- ?

**+ l'identification précise**

**⇒ choix thérapeutique adapté**



**💣 Cas particulier des hémocultures = flacons = milieux liquides ⇒ mais identification par MALDI-TOF possible 4h après la subculture sur milieu solide**

# Place des outils moléculaires pour l'identification ?

---

**J1**  
culture



A votre avis ?

réfléchissez y

...

réponse après la  
pause !

# Antibiogramme

**J0**

examen microscopique

**J1**

culture

**J2**

identification/antibiogramme



# Pourquoi réaliser des antibiogrammes ?

---

- un antibiotique donné n'est actif que sur certaines espèces bactériennes
- utile pour toutes les espèces bactériennes pour lesquelles une résistance acquise aux antibiotiques a été montrée
- indispensable en cas de rechute après traitement antibiotique de première intention
- nécessaire en cas d'infection chronique

# Catégories thérapeutiques définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

Les lettres S, I et R subsistent, et prennent désormais les significations suivantes :

- S : sensible à posologie STANDARD  
→ probabilité élevée de succès thérapeutique à posologie standard de l'antibiotique
- R : résistant.  
→ forte probabilité d'échec thérapeutique même en cas de forte exposition de la bactérie à l'antibiotique
- **I : sensible sous conditions d'une forte exposition**  
→ une bactérie sera catégorisée comme **sensible** à forte exposition lorsqu'il y a une forte probabilité de succès thérapeutique due au fait que l'exposition de la bactérie à l'antibiotique est **augmentée** par l'utilisation **de posologies élevées** ou par la **concentration spontanément élevée** de l'antibiotique au site infectieux en raison de ses caractéristiques pharmacocinétiques





# Impact médical = conclusions à J2

Renseignements fournis par l'examen macroscopique et microscopique :

- liquide clair/trouble, etc
- polynucléaires?
- bactéries?
  - monomicrobien / polymicrobien?
  - mobiles?
  - Gram+, Gram-?

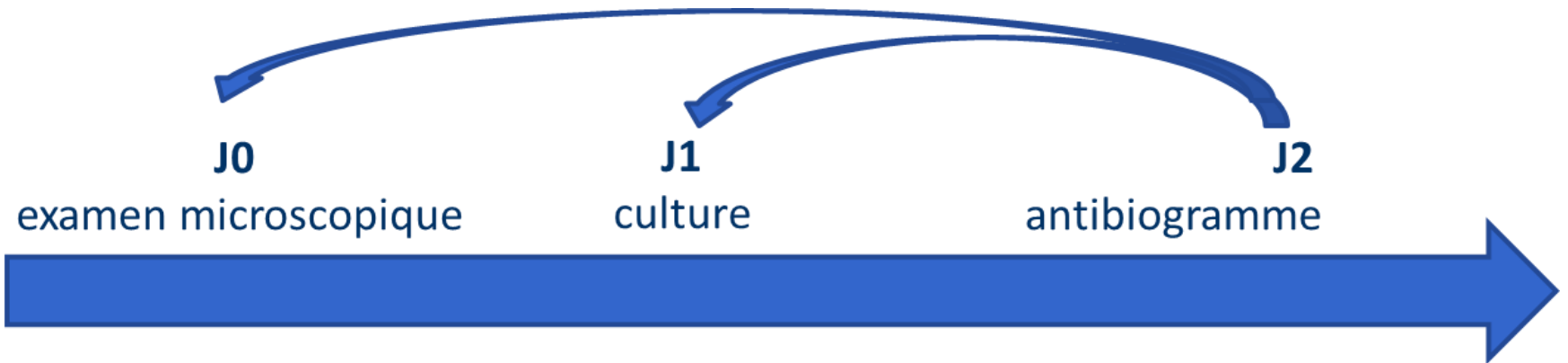
+ l'identification précise

+ antibiogramme

⇒ choix **thérapeutique optimisé**

# Place des outils moléculaires pour l'antibiogramme (dès J0 ?) ?

---



A votre avis ?  
réfléchissez y ... réponse après  
la pause !