



DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

Dr Nour Ben Ayed
Laboratoire de Microbiologie
CHU H.B Sfax

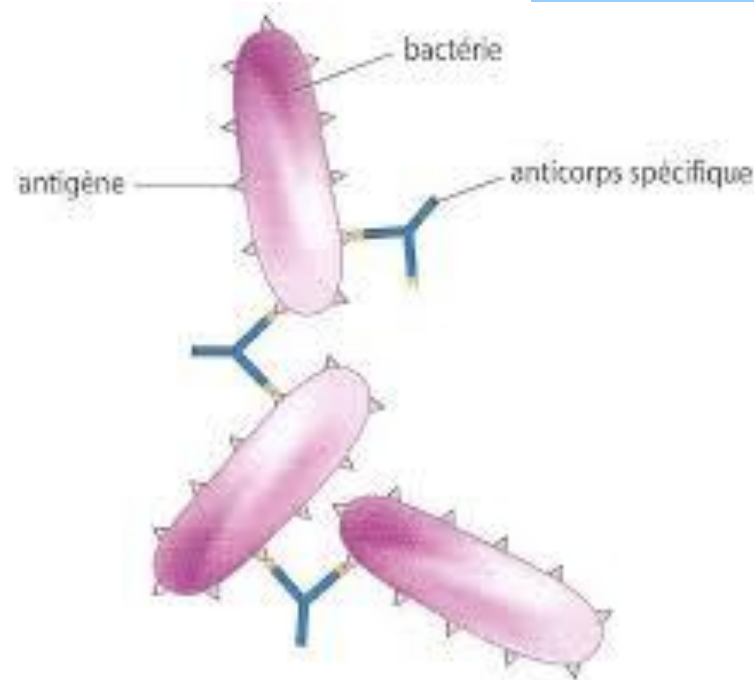
DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

Diagnostic direct

Mise en évidence de la **bactérie** ++ ou l'un de ses constituants (Ag, génome)

Diagnostic indirect

Mise en évidence de la réponse immunitaire : **Anticorps spécifiques**





DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT



DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT

- A) Isolement et identification de la bactérie**
- B) Recherche d'antigènes solubles bactériens dans les liquides biologiques**
- C) Méthodes moléculaires : mise en évidence des acides nucléiques bactériens**

A) Isolement et identification de la bactérie

I) Prélèvement

II) Examen direct

1) Examen macroscopique

2) Examen microscopique

III) Mise en culture

IV) Identification bactérienne

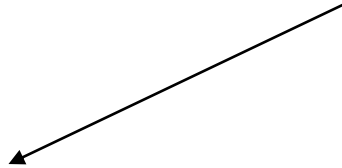
V) Étude de la sensibilité aux antibiotiques

I) Prélèvement

1) Conditions générales à respecter

- * **Avant toute antibiothérapie**; sinon : fenêtre thérapeutique
- * **Asepsie rigoureuse** afin d'éviter toute contamination du produit prélevé avec des microorganismes d'origine exogène ou endogène
- * **Renseignements cliniques**
- * **Transport rapide** et dans les bonnes conditions au laboratoire

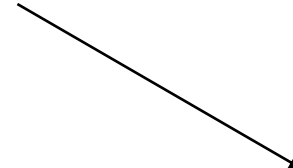
Deux types de prélèvements bactériologiques



Monomicrobien

Provenant de sites anatomiques
habituellement stériles /

Sang, LCR...



Polymicrobien

Pratiqués au niveau de sites
contenant une flore
commensale /

intestin, vagin, gorge...

2) Etude des principaux prélèvements

a) Hémoculture : L'hémoculture est un examen microbiologique permettant de rechercher la présence de bactéries ou de champignons dans le sang documentant une bactériémie ou une fongémie.

■ Une série d'hémoculture doit comporter un flacon aérobie et un flacon anaérobie

un flacon
aérobie



+

un flacon
anaérobie



une série d'hémoculture

a) Hémoculture :

■ Objectif : Prélever le sang **stérilement** en évitant sa contamination par la flore commensale cutanée.

Bonne Antiseptie : 5 temps



a) Hémoculture :

■ Quantité de sang à prélever : le paramètre le plus influent sur la **sensibilité** de l'hémoculture

Chez l'adulte

Volume minimum : 20 ml soit 10 ml par flacon

Volume optimal : 40 à 60 ml soit 4 à 6 flacons

Prélèvement multiple

4 à 6 flacons

En 2 ou 3 ponctions



Prélèvement unique

4 à 6 flacons

En 1 seule ponction



a) Hémoculture :

- Quantité de sang à prélever : le paramètre le plus influent sur la **sensibilité** de l'hémoculture

Chez l'enfant

Volume : en fonction du poids

1 Flacon pédiatrique

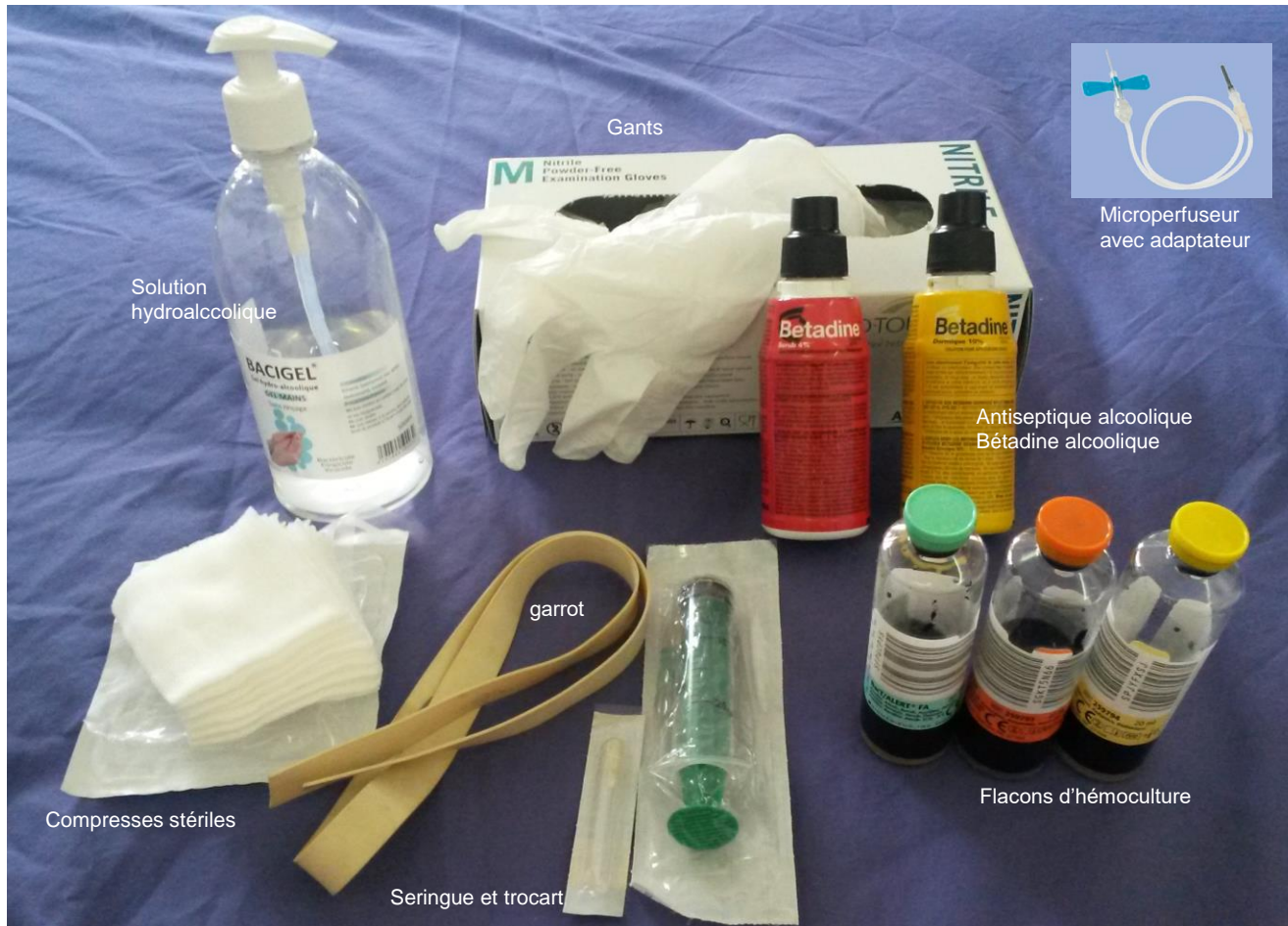
<1 kg => 0,5 à 2 ml de sang / 1 flacon péd/24h

Entre 1,1 et 2 kg => 1,5 à 4,5 ml de sang / 1 flacon péd/24h

Entre 2,1 et 13 kg => 3 à 6 ml de sang / 1 flacon péd/24h

a) Hémoculture :

■ Matériel nécessaire:



a) Hémoculture :

■ Technique du prélèvement :

➤ Port d'un masque de type chirurgical et de lunettes de sécurité couvrantes



➤ Lavage ou désinfection des mains du préleveur



➤ Marquer la **limite de la zone du remplissage** sur les flacons



➤ **Désinfection de l'opercule des** flacons d'hémocultures avec des compresses stériles imbibées d'alcool



a) Hémoculture :

■ Technique du prélèvement :

- Poser le garrot et repérer la veine (Avant-bras++)
(JAMAIS SUR CATHETER)



- Enfiler des gants à usage unique
(ou gants stériles si risque de retouche du point de ponction)

a) Hémoculture :

■ Technique du prélèvement :

- Désinfection du point de ponction : Antisepsie cutanée large du site de ponction choisi sans repasser sur la zone déjà traitée
- **Etape essentielle pour détruire la flore cutanée +++**
- Ne plus palper la veine après cette étape



a) Hémoculture :

■ Technique du prélèvement :

Désinfection du point de ponction : en respectant les

5 temps d'antisepsie :

➤ **DéterSION : savon antiseptique**

(Bétadine scrub[®], Biseptine[®], Hibiscrub[®])

➤ **Rinçage** : Eau stérile

➤ **Séchage** : Compresses stériles

➤ **Antisepsie avec des antiseptiques alcooliques**

(Bétadine alcoolique[®], Biseptine[®], Hibitane 0,5 %[®])

➤ **séchage (respecter le temps d'action des antiseptiques)**

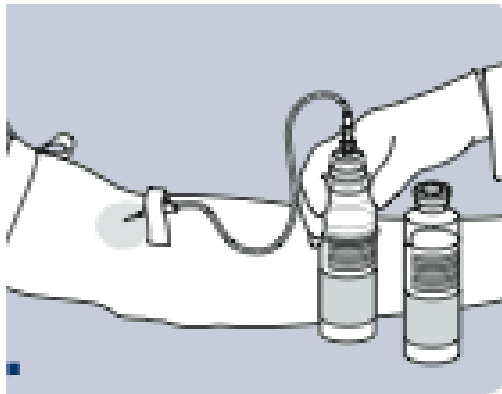
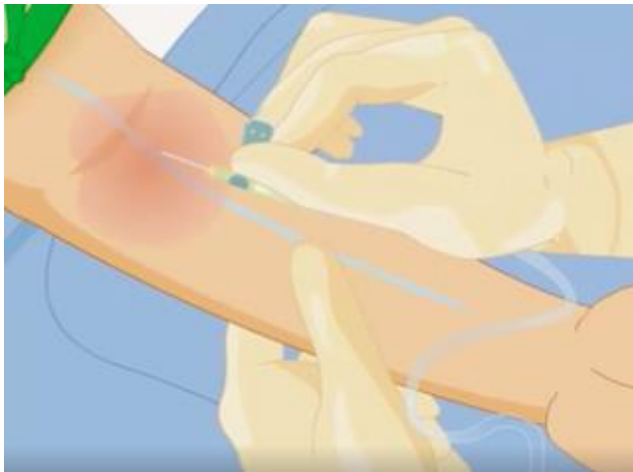
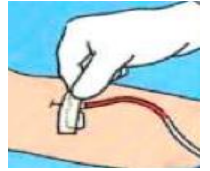
Ne plus palper la veine après cette étape



a) Hémoculture :

■ Technique du prélèvement :

- Prélèvement du sang (flacon aérobie puis flacon anaérobie) en contrôlant le bon remplissage des flacons



a) Hémoculture :

■ Technique du prélèvement :

- Identification correcte de tous les flacons prélevés.



a) Hémoculture :

■ Technique du prélèvement :

➤ Envoyer les hémocultures au laboratoire le plus rapidement possible

A température ambiante (ne jamais conserver à 4° C)



b) ECBU: Examen cytobactériologique des urines



1) Adulte normal :

- * Moment du prélèvement : le matin au réveil, ou urines ayant séjournées au moins 4h dans la vessie
- * Lavage hygiénique des mains
- * Toilette soigneuse au savon ou antiseptique / dakin de la région vulvaire chez la femme et du méat chez l'homme, suivi d'un rinçage
- * Éliminer le 1^{er} jet (20 ml) d'urines
- * Recueillir au minimum 20 – 30 ml d'urines
= 2^{ème} jet dans un flacon stérile



2) Nourrisson:

- * Désinfection soigneuse au dakin de toute la région périnéale suivi d'un rinçage/séchage
- * Placer un collecteur stérile (poche adhésive à usage unique)
- * Dès que la miction est terminée, retirer le collecteur et transvaser les urines soigneusement dans un flacon stérile
- * Si le temps d'attente dépasse 30 mn, placer une autre poche après une nouvelle désinfection (éviter les contaminations)





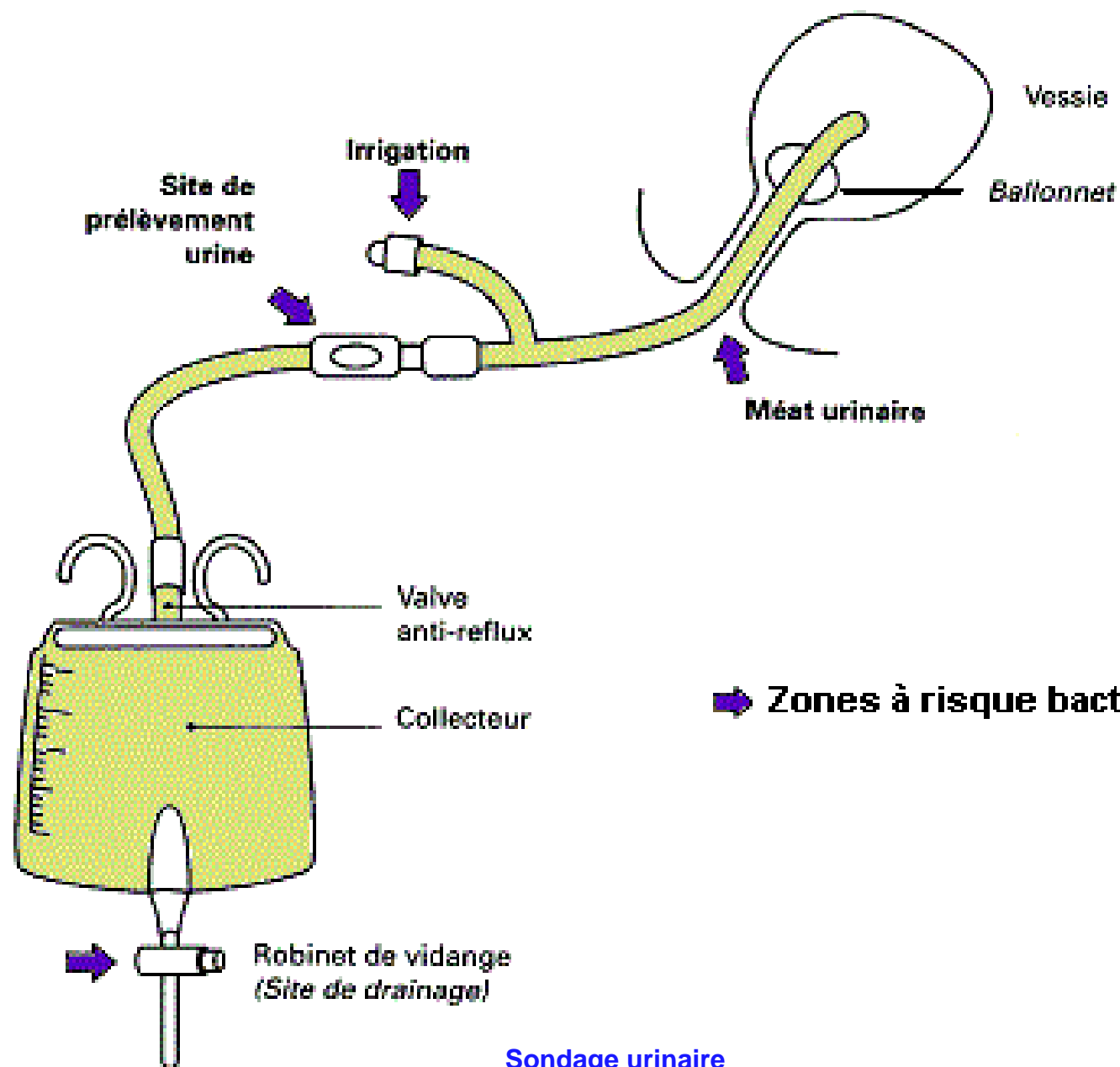


3) Patient sondé

- * Ne pas prélever à partir du sac d'urines
- * Clamper la sonde en aval pendant 5 mn
- * Désinfecter en amont du clamp avec un antiseptique
- * Prélever à la seringue

4) Ponction sus pubienne ou cathétérisme







jamais déconnecter
la sonde



jamais prélever à partir du
sac d'urines



- Lavage hygiénique des mains et port de gants à usage unique non stériles
- Clamper la sonde en aval pendant 15 à 30 minutes

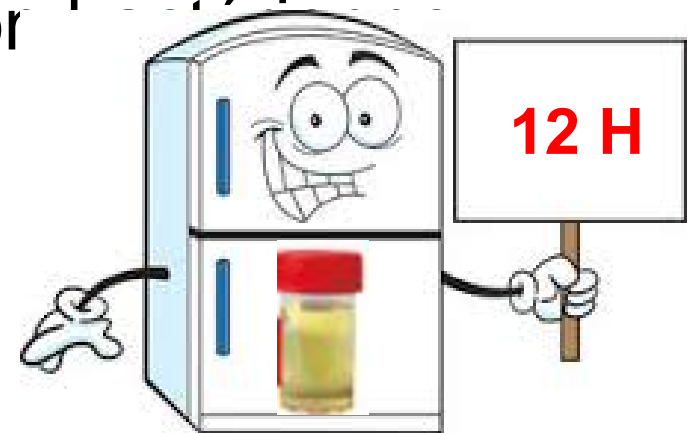
- Désinfecter le site de ponction avec une compresse stérile imbibée d'antiseptique alcoolique (Ex Bétadine alcoolique).

- Prélever avec seringue et aiguille stériles un échantillon d'urine et transvaser dans un flacon d'ECBU stérile
- Déclamper la sonde

- **Acheminement rapide** au laboratoire dans les plus brefs délais (maximum 30 mn)

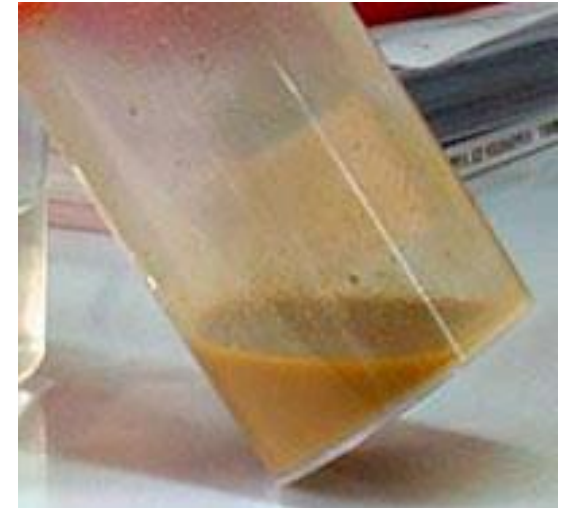
A défaut, placer les urines quelques heures à +
4° C

(12 h) afin d' éviter la multiplication
rapide à température ambiante



c) Coproculture

- C' est la recherche de bactéries pathogènes dans les selles.
- Les selles doivent être fraîchement émises dans un flacon stérile et transportés immédiatement au laboratoire sinon conservés à $+4^{\circ}\text{C}$



d) Prélèvement de pus

- Il faut éviter toute contamination par des bactéries commensales
- Nettoyer soigneusement avec un antiseptique les bords de l'abcès ou de la plaie
- Prélever dans les régions les plus purulentes avec une seringue ou un écouvillon



A) Isolement et identification de la bactérie

I) Prélèvement

II) Examen direct

1) Examen macroscopique

2) Examen microscopique

III) Mise en culture

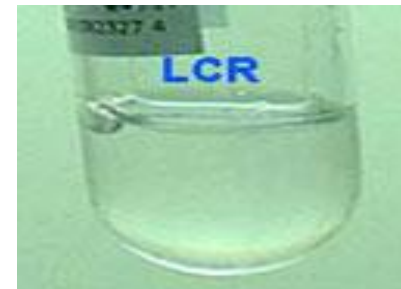
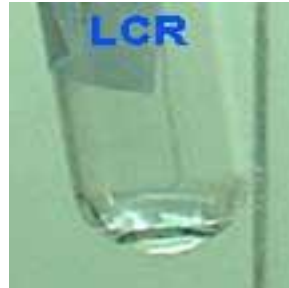
IV) Identification bactérienne

V) Etude de la sensibilité aux antibiotiques

II) Examen direct

1) Examen macroscopique : aspect, couleur, consistance, odeur

Trouble : urine, LCR, liquide pleural ou articulaire



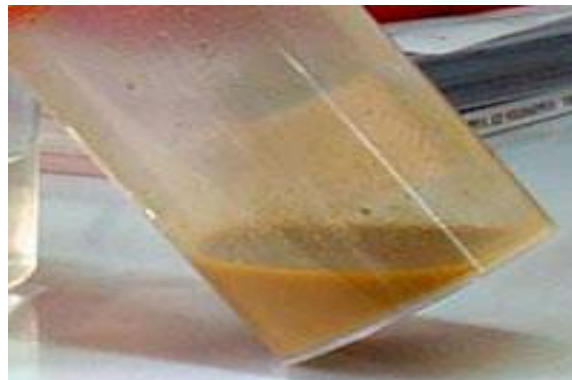
Hématurique : urine, LCR, liquide pleural ou articulaire



Odeur : fétide des infections à germes anaérobies stricts



Consistance : Exemple d'une selle diarrhéique.



A) Isolement et identification de la bactérie

I) Prélèvement

II) Examen direct

1) Examen macroscopique

2) Examen microscopique

III) Mise en culture

IV) Identification bactérienne

V) Etude de la sensibilité aux antibiotiques

2) Examen microscopique ++

- * Apprécier la réaction cellulaire
- * Rechercher la présence de bactéries



donne un premier diagnostic présomptif au prescripteur

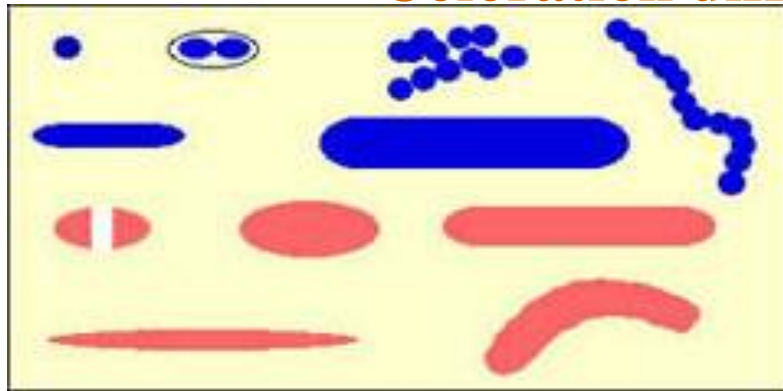
Examen microscopique :

état frais : **Mobilité** bactérienne+

examen après colorations : **GRAM** +++

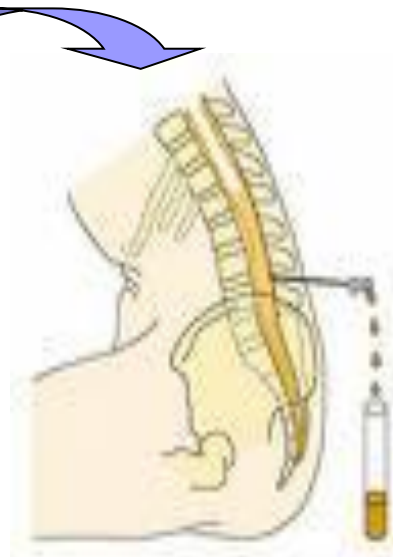
Examen après coloration (Grossissement de 1000, en général)

* Coloration différentielle : Coloration de Gram

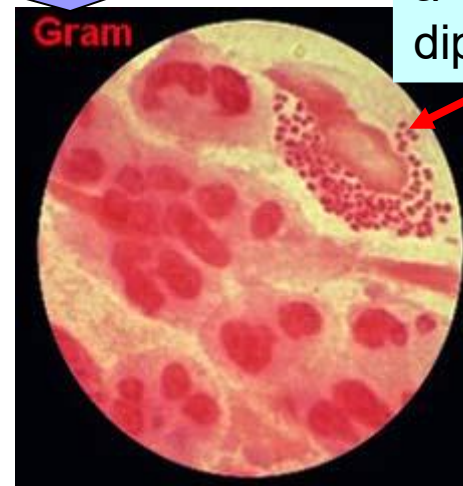


bactéries à Gram (+)

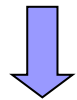
bactéries à Gram (-)



LCR
trouble



Présence de cocci
à Gram négatif en
diplocoque

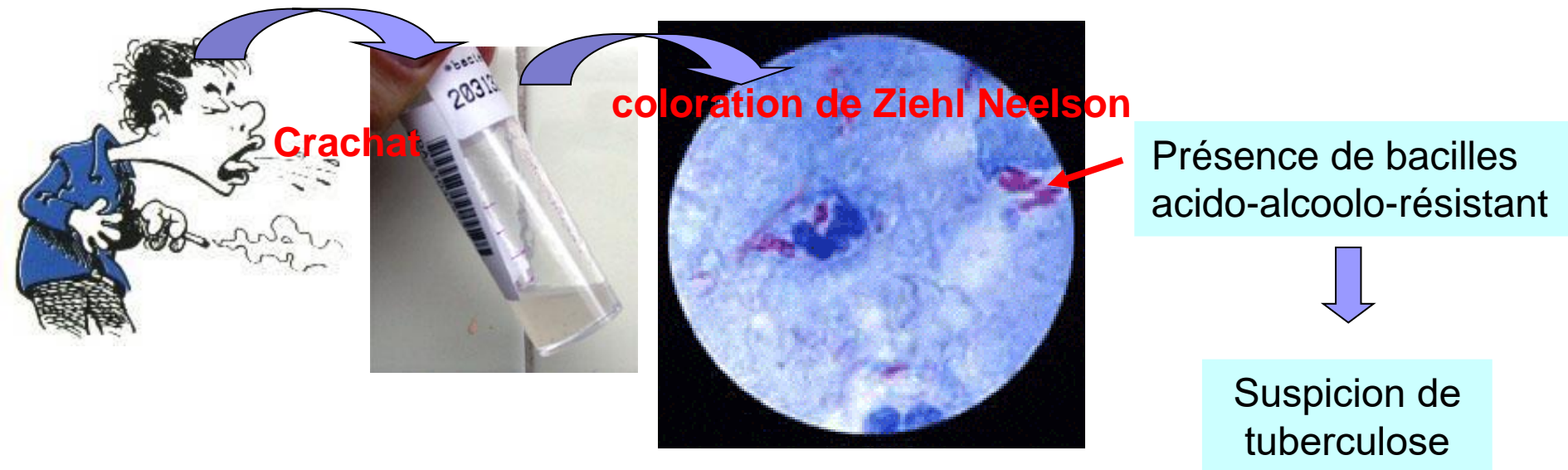


Suspicion de
méningite à
méningocoque

* Colorations spéciales :

Certaines colorations permettent l'étude de certaines bactéries (qui ne se colorent pas au Gram) ou de certains détails de la structure bactérienne : flagelles, spores...

Ex coloration de Ziehl Neelson : Etude du caractère acido-alcoolorésistant (mycobactéries)



A) Isolement et identification de la bactérie

I) Prélèvement

II) Examen direct

1) Examen macroscopique

2) Examen microscopique

III) Mise en culture

IV) Identification bactérienne

V) Etude de la sensibilité aux antibiotiques

III) Culture - Isolement :

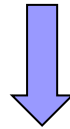
La mise en culture du produit pathologique est **indispensable**



isolement de la bactérie qui infecte le malade



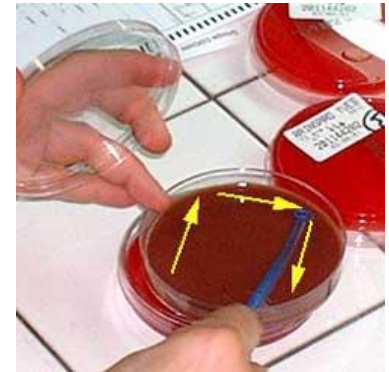
Identification précise de cette bactérie
tester sa **sensibilité aux antibiotiques**



Elle nécessite l'utilisation de milieux de culture riches tels que la gélose au sang, la gélose "chocolat" et en plus sélectifs si le prélèvement est polymicrobien.

III) Culture - Isolement :

* **Milieux solides : isolement \Rightarrow colonies**



* **Milieux liquides : enrichissement**



*** Incubation :**

- Etuve à 37°
- Aérobiose ou anaérobiose
- 18 à 24 h



A) Isolement et identification de la bactérie

I) Prélèvement

II) Examen direct

1) Examen macroscopique

2) Examen microscopique

III) Mise en culture

IV) Identification bactérienne

V) Étude de la sensibilité aux antibiotiques

IV) Identification :

- * Caractères morphologiques**

- * Caractères cultureux**

 - conditions nécessaires à la croissance bactérienne

 - aspect des colonies

- * Étude du métabolisme bactérien**

- * Caractères antigéniques**

A) Isolement et identification de la bactérie

I) Prélèvement

II) Examen direct

1) Examen macroscopique

2) Examen microscopique

III) Mise en culture

IV) Identification bactérienne

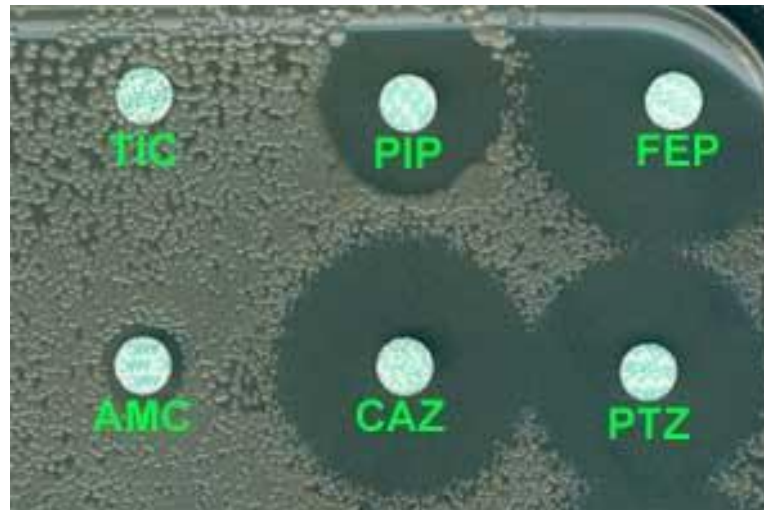
V) Étude de la sensibilité aux antibiotiques

V) Antibiogramme :

L'examen bactériologique ne se limite pas à l'isolement et l'identification d'une bactérie.

Il doit permettre au clinicien une meilleure thérapeutique pour son patient.

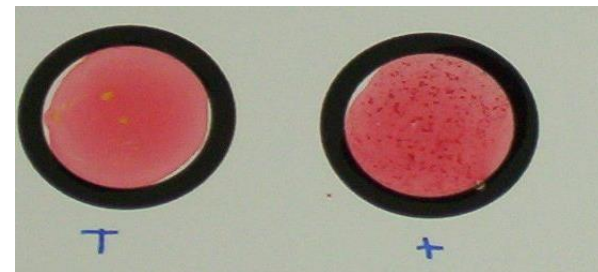
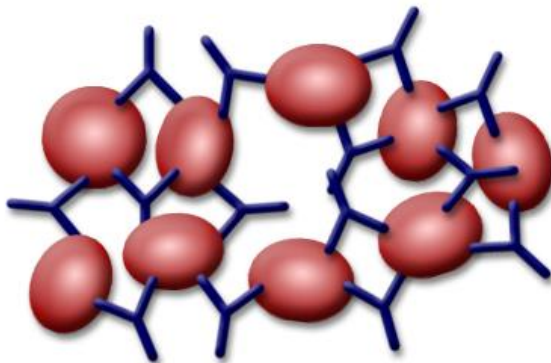
Ceci est possible grâce à l'antibiogramme qui teste in vitro la sensibilité de la bactérie aux différents antibiotiques.



Exemple d'un antibiogramme (méthode de diffusion ou des disques) d'une souche de *Escherichia coli*

B) Recherche d'antigènes solubles bactériens dans les liquides biologiques

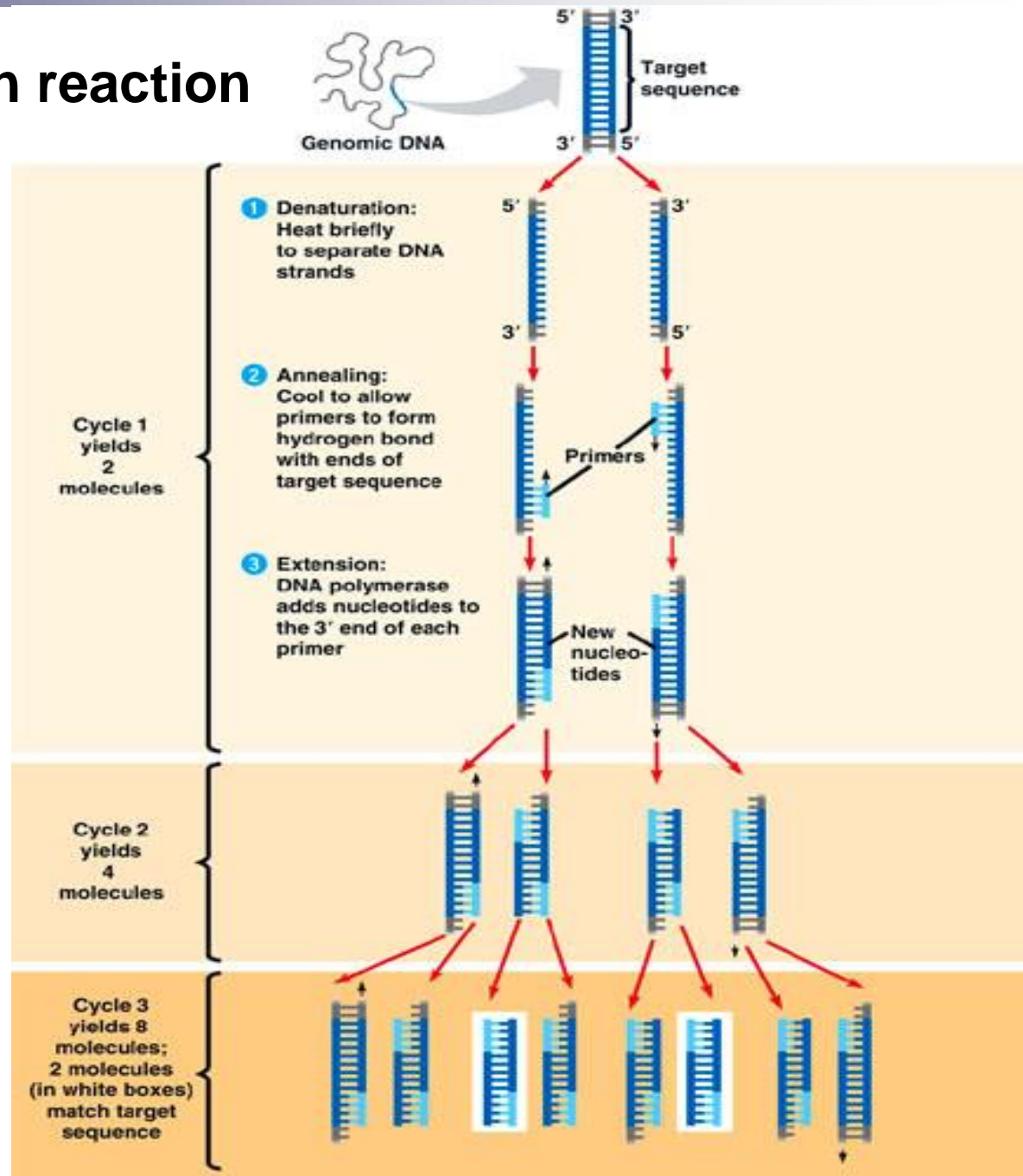
- Principe : Certaines bactéries libèrent dans les liquides biologiques (le liquide céphalo-rachidien, le sérum ou les urines) des **antigènes solubles** de nature **polysaccharidique (capsulaires)**.
- Technique de recherche : **agglutination** de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques des antigènes bactériens.
- Indication : diagnostic rapide des **infections décapitées**
- Ne remplace jamais la mise en culture du produit pathologique



C) Méthodes moléculaires : mise en évidence des acides nucléiques bactérien

- Principe : détection de l'acide nucléique bactérien (ADN ou ARN) à l'aide essentiellement de la technique d'amplification génique (=PCR : Polymerase chain reaction).
- Indications : diagnostic rapide des infections dues à des bactéries à croissance lente, difficile ou non cultivables.
- Ne remplace jamais la mise en culture du produit pathologique.

PCR : Polymerase chain reaction





DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE INDIRECT

Diagnostic indirect ou sérologique

- Il consiste à mettre en évidence la réponse immunologique humorale (**production d'anticorps**: IgG, IgM) à un agent infectieux
- Méthodes : recherche et dosage des anticorps spécifiques des antigènes bactériens dans le sérum du malade
- Prélèvement : 5 à 10 ml de sang par ponction veineuse
- Indications : Le sérodiagnostic est fondamental au cours de plusieurs situations :
 - * bactérie difficile ou impossible à cultiver
 - * infection ancienne (isolement de la bactérie impossible)