

Moyens et modes de détections d'un agent infectieux chez l'hôte : les examens microbiologiques

RAPPELS

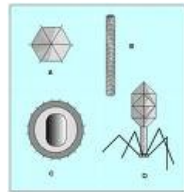
Agents infectieux = Micro-organismes (*microbes*)



Microbiologie

Les différents types de micro-organismes :

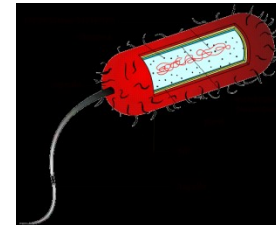
- * les bactéries



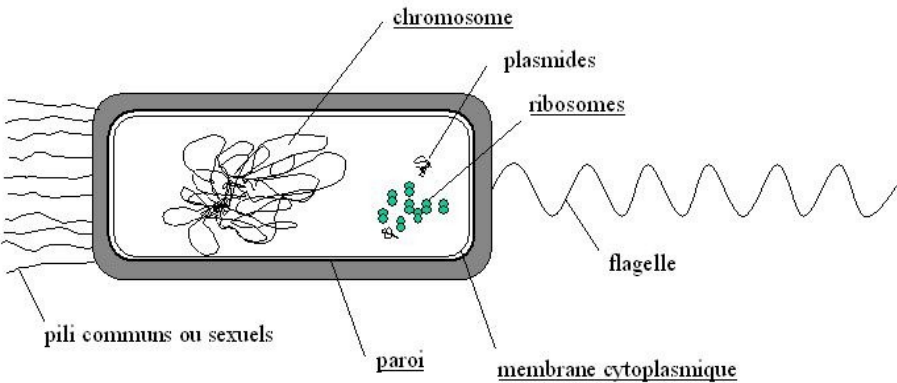
- * les virus

- * les champignons (levures et moisissures)

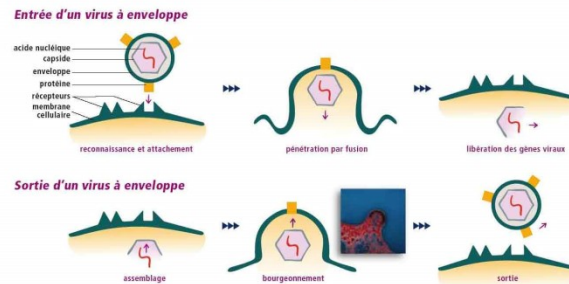
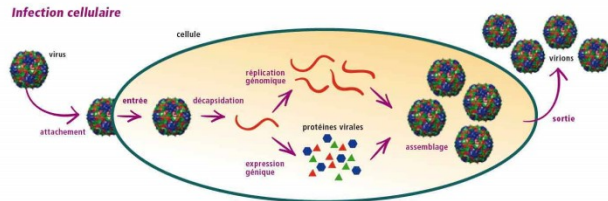
- * les parasites uni-cellulaires



Maladies infectieuses : ensemble de troubles provoqués par la multiplication chez l'homme d'agents pathogènes vivants.



- Les bactéries : capables de se multiplier sur un support inerte (ex : boîte de pétri contenant un milieu de culture solide)
- Commensales de la peau et des muqueuses



- Les virus : parasitisme intracellulaire obligatoire

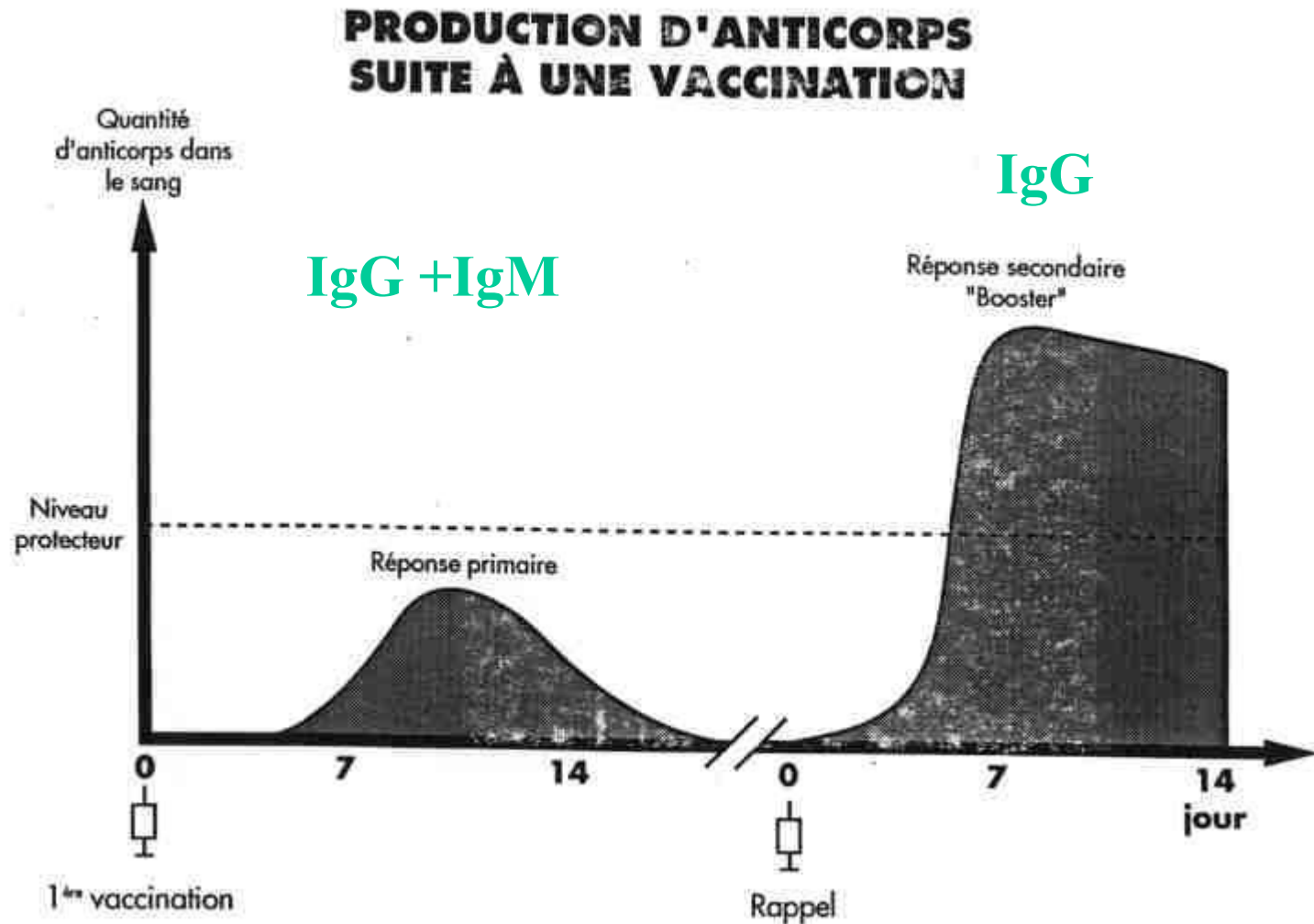
- **pénétration d'un agent infectieux dans l'organisme**
==> **cascade de réponses immunitaires**
imbriquées qui ont pour but de l'éliminer =
réponse immunitaire

- **2 types de réponses :**
 - * **non spécifique**
 - **identique quelque soit l'agent infectieux**
= réaction inflammatoire

 - * **spécifique**
 - **dirigée contre un micro-organisme donné**

=> immunité à médiation humorale
(Anticorps = Immunoglobuline (Ig))
=> immunité à médiation cellulaire
(Lc T cytotoxiques (reconnaissance et élimination des cellules contenant des antigènes étrangers))

2 temps : réponse primaire/réponse secondaire



Les examens de laboratoire en microbiologie

EXAMENS MICROBIOLOGIQUES

**==> prélèvements à visée diagnostique étiologique
d'une infection**

*** éléments d'orientation (non spécifiques)**

*** prélèvements microbiologiques**

Eléments d'orientation

*** leucocytes (globules blancs)**

= hyperleucocytose ($> 10\,000/\text{mm}^3$, $> 10\text{ Giga/l}$)

==> polynucléose neutrophile (PN $> 7\,000/\text{mm}^3$ $> 7\text{ Giga/l}$)

(neutropénie PN $< 1500/\text{mm}^3$ = virus)

==> hyperlymphocytose ($> 4\,000/\text{mm}^3$ $> 4\text{ Giga/l}$)

= virus (coqueluche)

==> syndrome mononucléosique

*** marqueurs de l'inflammation**

- la vitesse de sédimentation (VS)**
N : 3-7 mm à la 1 ère heure
Pas spécifique
- la protéine C réactive (CRP)**
Plus spécifique
Surveillance du traitement
- la procalcitonine (PCT)**

Examens spécifiques

= mise en évidence du micro-organisme ou
d'une réaction spécifique engendrée par celui-ci
= diagnostic de certitude

==> **Diagnostic direct**

= mise en évidence de l'agent pathogène

==> **Diagnostic indirect**

= sérodiagnostic

= recherche d'anticorps spécifiques

==> Diagnostic direct

= mise en évidence de l'agent pathogène

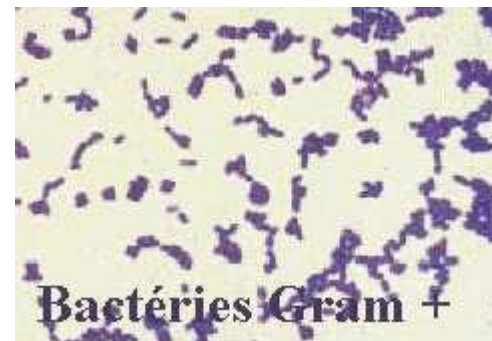
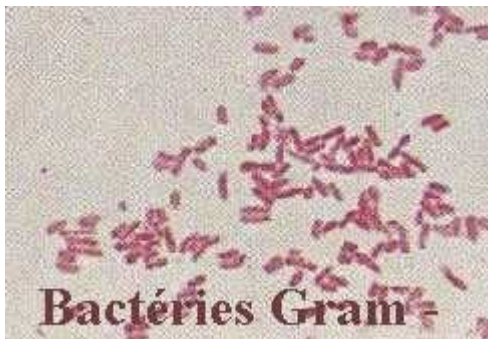
(rechercher en fonction du contexte clinique ou en fonction de la localisation de l'infection)

•examen microscopique direct

- à frais

- colorations spécifiques

coloration de Gram



Coloration de Gram

Positive (violet)

Négative (rose)

Cocci à gram positif

Bacilles à gram positif

Cocci à gram négatif

Bacilles à gram négatif

Diplocoques



Streptocoques



Staphylocoques



Bacilles diphtériques

Bacilles tétaniques

Méningocoques

Gonocoques

Escherichia coli

Salmonelle

Vibrio cholera

Classification pratique des bactéries à partir des caractères morphologiques ==> orientation

==> Diagnostic direct

= mise en évidence de l'agent pathogène

*** examen microscopique direct**

- à frais
- colorations spécifiques

Gram

autres colorations (Ziehl)

*** cultures**

- **bactéries**

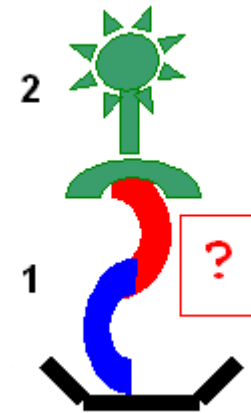
aérobies ou anaérobies

exigeantes ou non

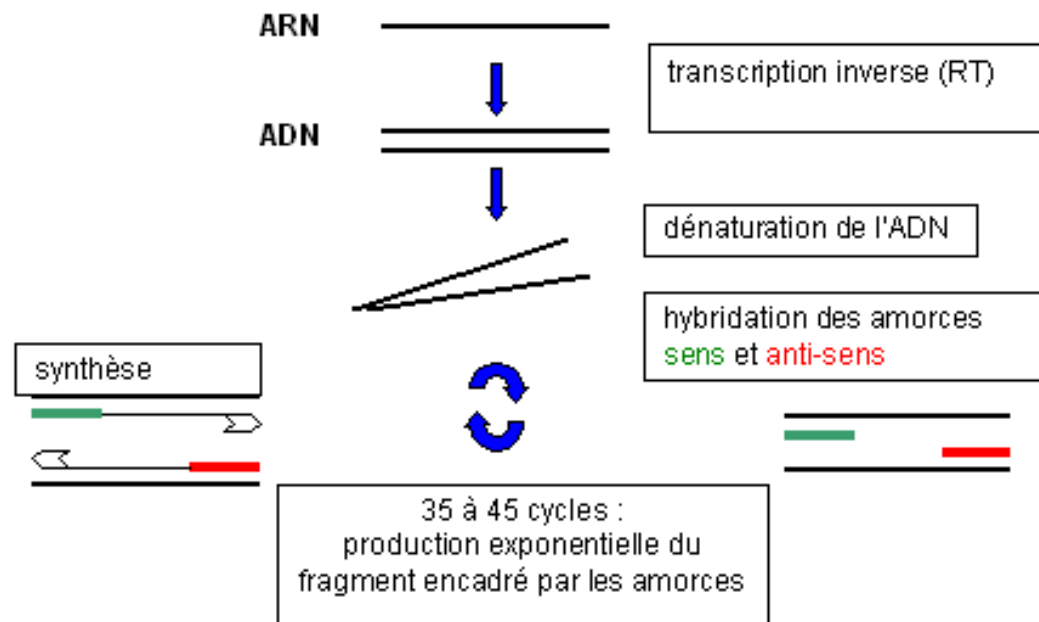
- **virus**

* **génome (ADN ou ARN)**

- **hybridation moléculaire**

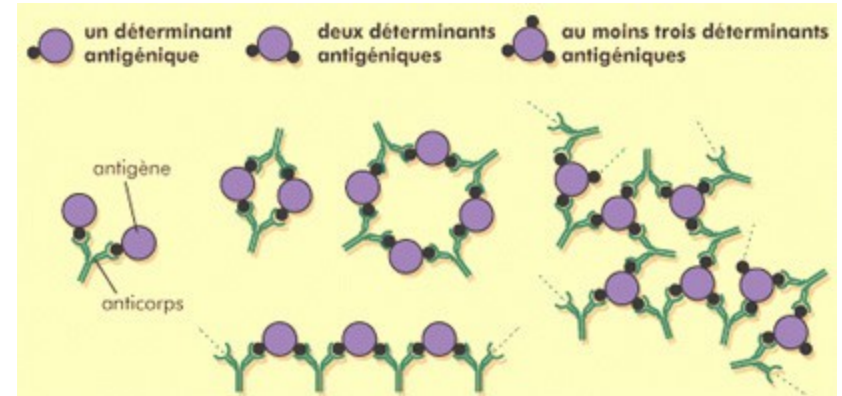


- **amplification génique (PCR)**

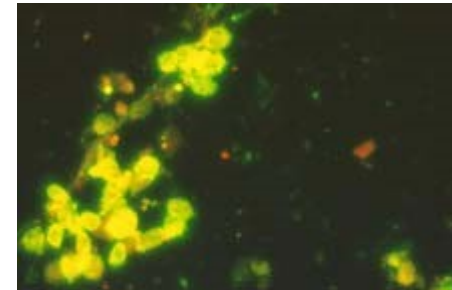


* antigènes

- antigènes solubles



- immunofluorescence



- méthodes immunoenzymatiques

Ex : Ag Hbs , P24

==> Diagnostic indirect

= sérodiagnostic

= recherche d'anticorps spécifiques

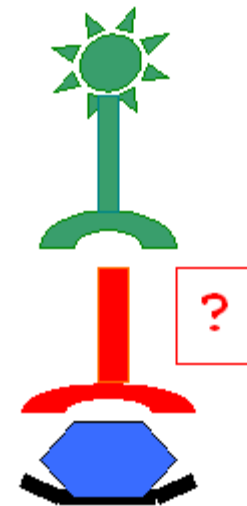
- dépend de :

*** la cinétique de la réponse anticorps
= souvent diagnostic tardif (2 sérums)**

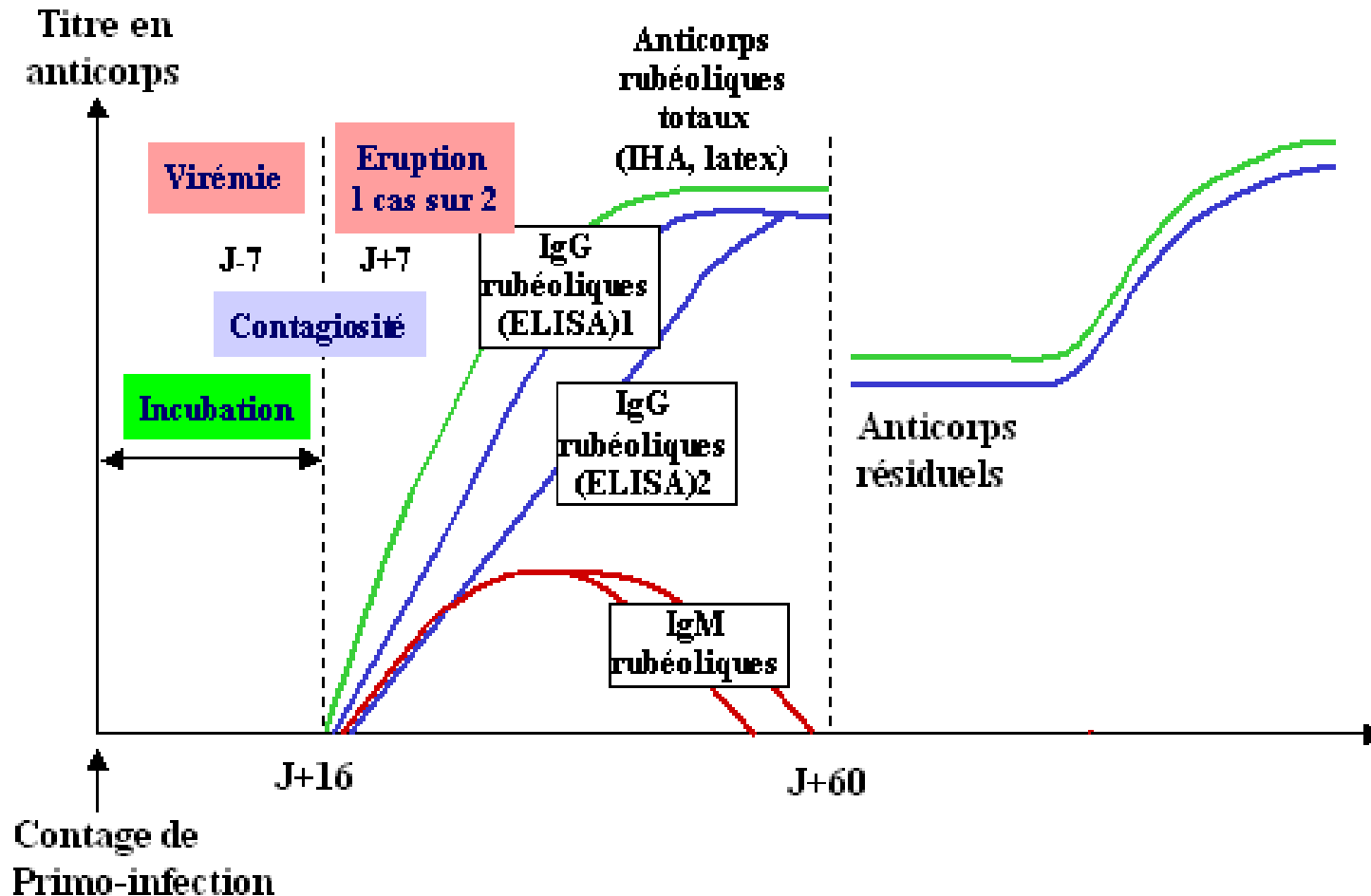
*** du type de réponse**

Humorale ou cellulaire

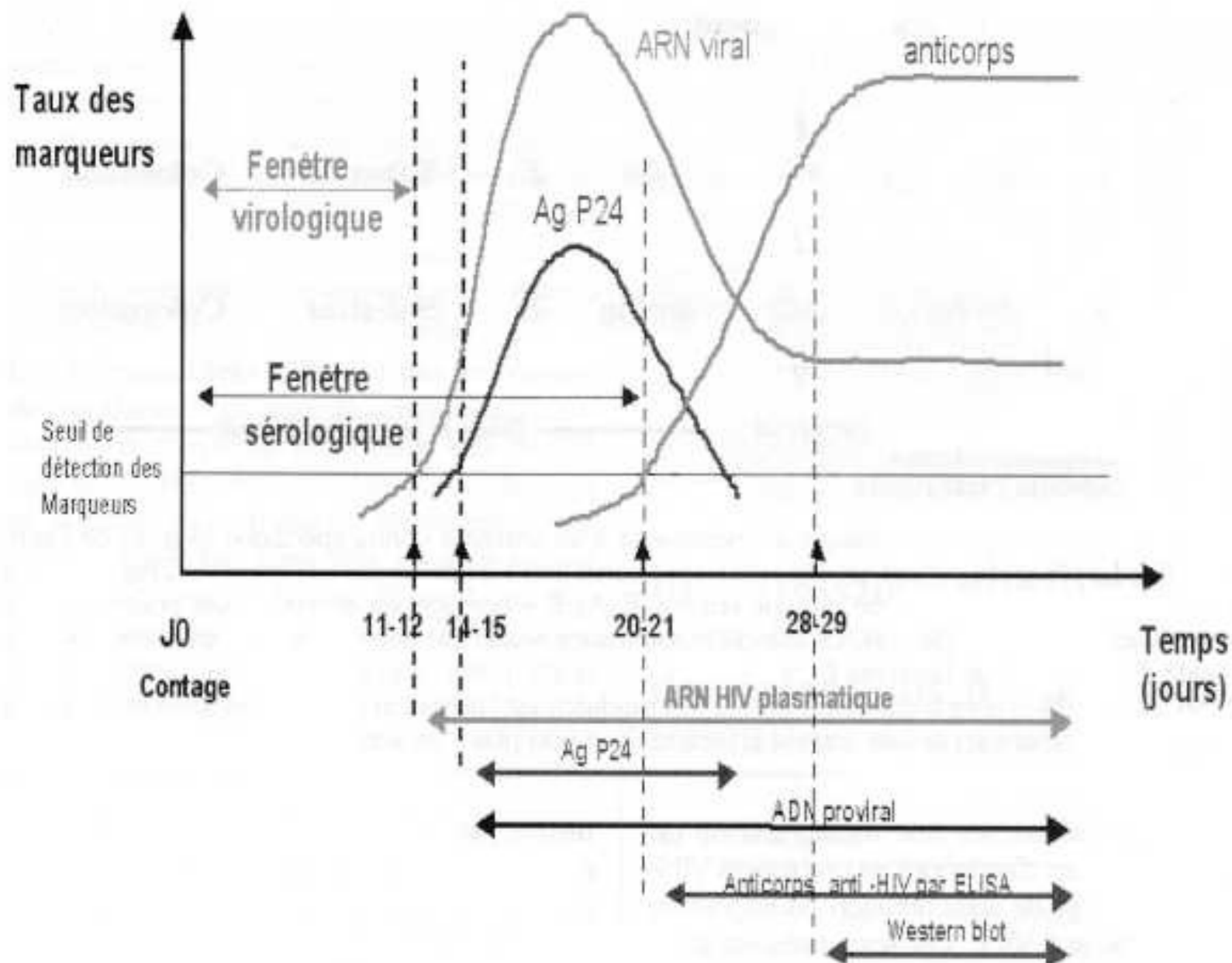
- recherche d' IgG, IgM (IgA)



Cinétique des anticorps rubéoliques au cours de la primo-infection et de la réinfection



Cinétique d'apparition des anticorps anti-VIH



Les prélèvements microbiologiques

Principes généraux

= diagnostic étiologique

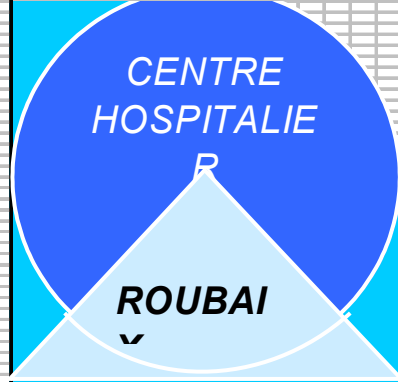
==> traitement spécifique

- la qualité du résultat dépend de la qualité du prélèvement

- * protocole de prélèvement rigoureux**
- * asepsie + + +**
- * conditions d'acheminement au laboratoire respectées**
- * demande précise**

le bon de demande

- * produit à examiner = site de prélèvement**
- * date (et heure) du prélèvement**
- * renseignements cliniques utiles (antécédents, traitement antibiotique ...)**
- * analyse demandée**
 - bactériologie standard**
 - recherche de germes anaérobies**
 - recherche de bactérie précisément nommée (ex : coqueluche, gonocoque ...)**
 - recherche de mycobactéries (BK)**
 - recherche d'un virus donné**



LABORATOIRE
BACTERIOLOGIE
MYCOLOGIE
PARASITOLOGIE
VIROLOGIE

03 20 99 31 40

Nom

Prénom :

Epouse

Date de naissance

ou étiquette

URINE

- ☐ ECBU Mode de prélèvement
- ☐ Voie naturelle
- ☐ Sonde vésica
- ☐ Autre :
- ☐ Cytologie
- ☐ HLM (respecter le protocole)
- ☐ Antigénurie légionelle

MATERIEL

- ☐ Cathéter central ☐ Fémoral
- ☐ Sous-clavière
- ☐ Jugulaire
- ☐ Autre :
- ☐ Cathéter périphérique
- ☐ Redon
- ☐ Drain ☐ Localisation :
- ☐ Lame
- ☐ Sonde
- ☐ Stérilet

URO-GENITAL

- ☐ Recherche du streptocoque du groupe B
- ☐ Leucorrhée / Vagin
- ☐ Placenta
- ☐ Loochies
- ☐ Liquide amniotique
- ☐ Endocol
- ☐ Urétral
- ☐ Sperme
- ☐ Autre :

PRELEVEMENTS PERINATAUX

- ☐ Liquide gastrique
- ☐ Autre :

PULMONAIRE

- ☐ ECBC
- ☐ Aspiration endo-trachéale
- ☐ LBA
- ☐ Brossage protégé

LIQUIDE D

- ☐ Liquide pleura
- ☐ Liquide ascite
- ☐ Liquide articu
- ☐ Liquide périca
- ☐ Liquide dialys
- ☐ Liquide péritor
- ☐ Autre :
- ☐ 0 Bactériologie
- ☐ 0 Bactériologie
- ☐ 0 Cytologie : tu
- ☐ 0 Cristaux : tub

- ☐ Oreille
- ☐ Nez
- ☐ Pharynx / Gor
- ☐ Oeil
- ☐ Autre :

HEMO

AVANT TOUT PRELEVEMENT CONNAITRE

==> les conditions de réalisation

*** matériel**

- nombre de tubes**
- type de tube, de pot**
- milieu stérile**
- milieu de transport si nécessaire**

*** quand ?**

- avant antibiothérapie**
- à jeun**
- sous kiné respiratoire**
- 3 jours de suite**

*** transfert au laboratoire**

- heures d'ouverture**
- délai de transfert**
- conditions de conservation**

Flores commensales	Abondance	Espèces principales
Flore de la peau	10^2 - 10^5 /cm ²	Staphylocoques, microcoque, anaérobies, corynébactéries
Flore des voies digestives		
Flore buccale (salive)	10^5 - 10^6 /ml	Streptocoques
Plaque dentaire	10^9 - 10^{11} /g	Streptocoques, anaérobies
Estomac	0	
Duodéno-jéjunum	10^2 - 10^4 /ml	Anaérobies +++
Intestin grêle	10^7 - 10^8 /ml	(Bactéroides, BGP,
Colôn	10^{11} /g	Clostridium), entérobactéries, entérocoque
Flore des voies respiratoires		
Naso-pharynx	Abondante	Streptocoques, staphylocoques
Trachée-bronches	0	
Flore des voies génitales		
Urètre	10^3 /ml	Staphylocoques, corynébactéries
Vagin	10^9 /ml	Lactobacilles, anaérobies

Autres cavités ➔ stérile (ex : circulation sanguine, urine ...)

HEMOCULTURE

- = détection des bactéries dans le sang
- = diagnostic d'une septicémie (bactériémie)

- Comment ?

- dans les meilleures conditions d'aseptie
- 2 flacons (aérobie/anaérobie)
- volume de sang =

8-10 ml



1-3 ml



Quand ?

- avant tout traitement antibiotique (ou avant une injection)
- lors de l'élévation de température, lors des frissons, juste après le pic thermique
- en cas d'hypothermie
- inutile si température normale

Combien ?

- plusieurs ponctions + + +
- 2 à 3 / 24 heures

Où ?

- au niveau de la veine périphérique
- jamais au niveau d'un cathéter (sauf diagnostic différentiel)

Transfert rapide au laboratoire ou conservation à 37°C

Cas particuliers

- endocardite, brucellose
 - 6 /24h
 - incubation prolongée
- leptospires, mycobactéries

Interprétation

- Entérobactéries (*E. coli*, *Proteus...*),
Pneumocoque, *Listeria*, *Bacteroides* ...

1+ ==> bactériémie

- Staphylocoque à coagulase négative,
corynébactéries, *Propionibacterium*,
streptocoque

2+ ==> bactériémie

DISPOSITIFS INTRA-VASCULAIRES

= cathéters, chambre implantable

Analyse bactériologique après ablation :

- 3 à 5 cm dans un pot stérile
- méthode quantitative de Brun-Buisson :
 - $< 10^3$ ufc/ml = contamination
 - $> \text{ou} = 10^3$ ufc/ml = colonisation ou infection



Analyse bactériologique matériel en place :

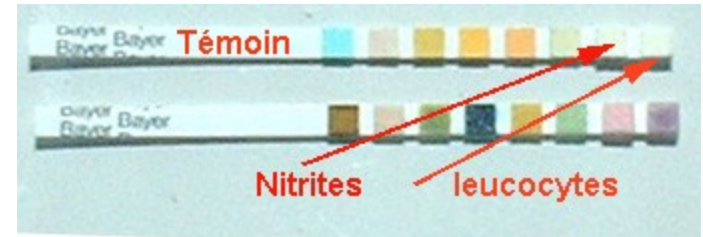
- hémoculture différentielle

ECBU : Examen cyto-bactériologique des urines

**==> diagnostic d'une infection urinaire
pyélonéphrite ou cystite**

*** bandelette urinaire**

- leucocyte estérase**
- nitrites**



*** prélèvement**

- urine fraîche du matin**
- pot stérile**
- milieu du jet (1er jet dans urétrite et prostatite)**
- toilette antiseptique**



- * vulvaire chez la femme**
- * du gland et du méat urinaire chez l'homme**
- * du périnée avec mise en place d'une poche adhésive chez le nouveau-né**

- transfert rapide au laboratoire ou conservation à + 4°C

*** cytologie**

- leucocytes (numération)**
- hématies (numération)**
- cristaux**
- autres éléments**

*** culture quantitative**

==> critères d'interprétation

- Bactériurie $< 10^3$ UFC/ml : absence d'infection**
- Bactériurie $> 10^5$ UFC/ml : infection probable**
- entre 10^3 et 10^5 UFC/ml : zone d'incertitude**

==> à confronter avec la leucocyturie

Leucocyturie	Bactériurie	Culture	Interprétation
$<10^3$	$<10^3$	-	urine normale
$>10^4$	$\geq 10^5$	+	infection certaine
$<10^3$	$\geq 10^5$	+	infection débutante
			Enfant/aplasie
$>10^4$	$\leq 10^3$	-	infection décapitée
			Tuberculose

- en général, culture monomicrobienne, sinon contamination probable

SECRECTIONS BRONCHO-PULMONAIRES

Examen cyto-bactériologique d'une expectoration (ECBC)

Examen cyto-bactériologique d'une aspiration endo-trachéale (AET, ASPB)

**==> diagnostic d'une pneumopathie
d'une pneumonie**

Communautaire ou nosocomiale

ECBC : - à jeûn, rinçage de la bouche

- kiné respiratoire => *crachat induit*

- transfert rapide au laboratoire ou conservation à + 4°C

- AET (aspiration endo-trachéale)

- brossage protégé

- liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA)



*** la qualité de l'échantillon (contamination salivaire éventuelle)
est appréciée par la cytologie**

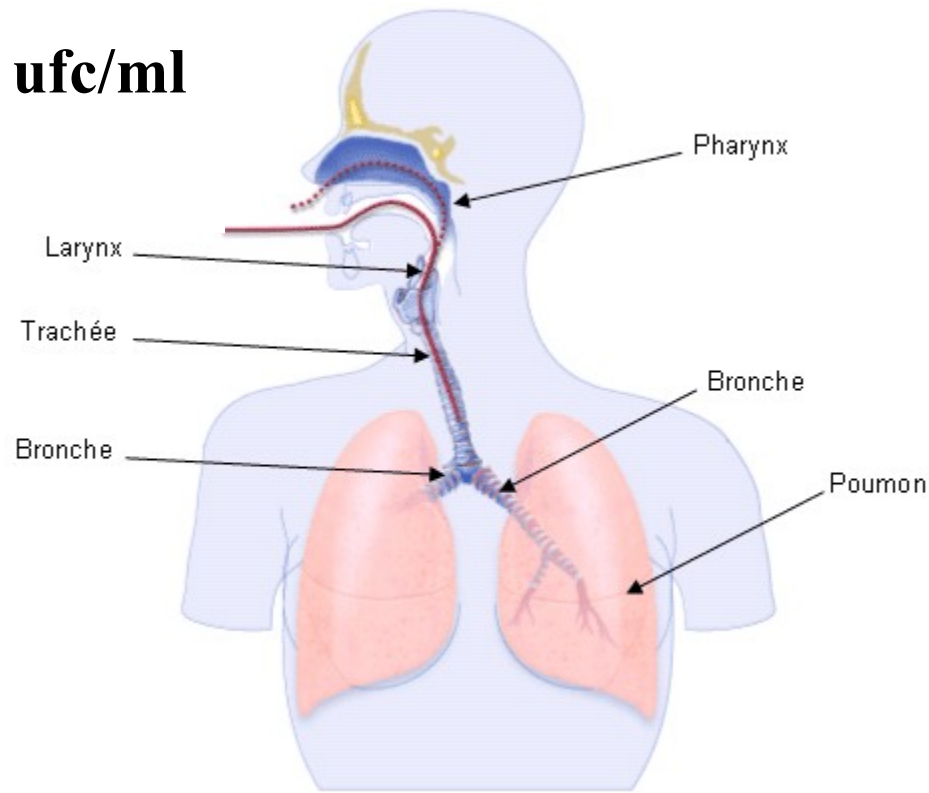
présence de cellules pavimenteuses

présence de macrophages alvéolaires ou cellules bronchiques

*** seuil :**

ECBC : 10^7 ufc/ml

prélèvements « protégés » : 10^4 ufc/ml



EXAMEN CYTO-BACTERIOLOGIQUE DU LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN LCR

==> diagnostic d'une méningite

* ponction lombaire

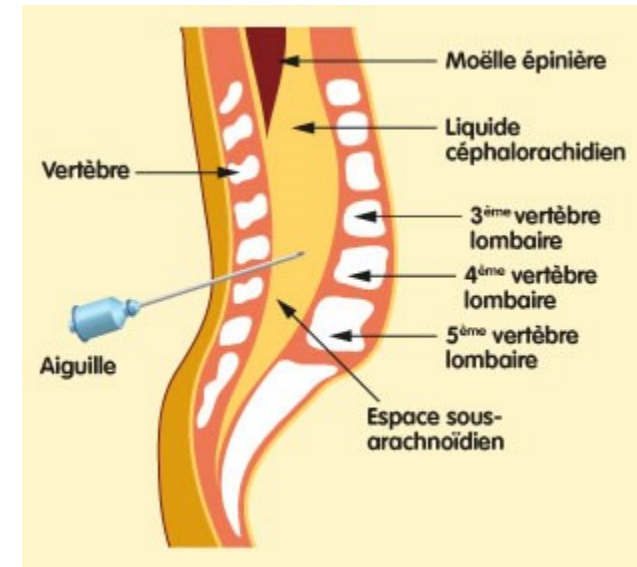
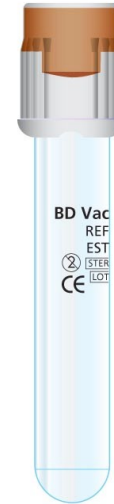
- 3 tubes stériles
- cytologie
- chimie
- bactériologie

+/- BK

Parasites (Cryptocoque)

Virus par PCR (Herpes, enterovirus..)

Antigènes solubles de pneumocoque



* transmission rapide au laboratoire + + +

LIQUIDES D'EPANCHEMENT

Liquide d'ascite, pleural, artriculaire, péricardique...

- biochimie
- cytologie
- bactériologie



COPROCULTURE

= diagnostic étiologique d'une diarrhée d'origine infectieuse

- Salmonelle, Shigelle, Yersinia, Campylobacter

**- recueil de selles dans un pot stérile et transmission
au laboratoire dans les meilleurs délais ou + 4°C**

+/- toxine de *Clostridium difficile*

+ Parasitologie des selles

+ Recherche de Rotavirus et Adenovirus

SECRECTIONS GENITALES

(prélèvement vaginal, urétral, sperme ...)

- sur écouvillon (toujours 2)



- milieu de transport

- * gonocoque
- * chlamydia/mycoplasmes
- * virus (Herpes)



PRELEVEMENTS O.R.L

- * Gorge (pharynx)
 - * Langue
 - * Nez
- sur écouvillon (2)



PRELEVEMENTS PERINATAUX

*** chez la maman :**

- liquide amniotique**
- placenta**

*** chez le nouveau-né :**

- liquide gastrique**
- méconium**

...



SUPPURATIONS et PRELEVEMENTS PER- OPERATOIRES

==> fonction de la quantité

- seringue + + +**
- pot stérile**
- écouvillons - - -**



==> recherche de germes anaérobies

AUTRES

- drains, redons

==> pot stérile



- plaie, escarre, ulcère



PRELEVEMENTS DE DEPISTAGE DE BACTERIES MULTIRESISTANTES (BMR)

- écouvillons (humidifiés)

*** rectal (anal)**

*** nasal**

==> isolement des patients



ANTIBIOGRAMME

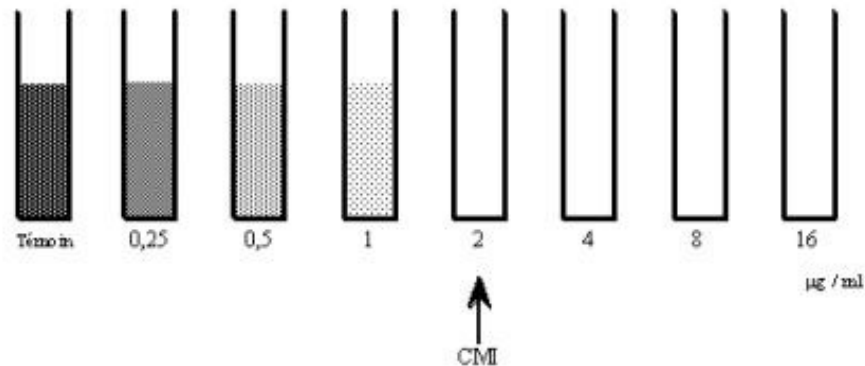
= détermination de la sensibilité aux antibiotiques d'une bactérie

==> réalisé sur toute bactérie identifiée comme étant potentiellement pathogène et relevant d'une antibiothérapie

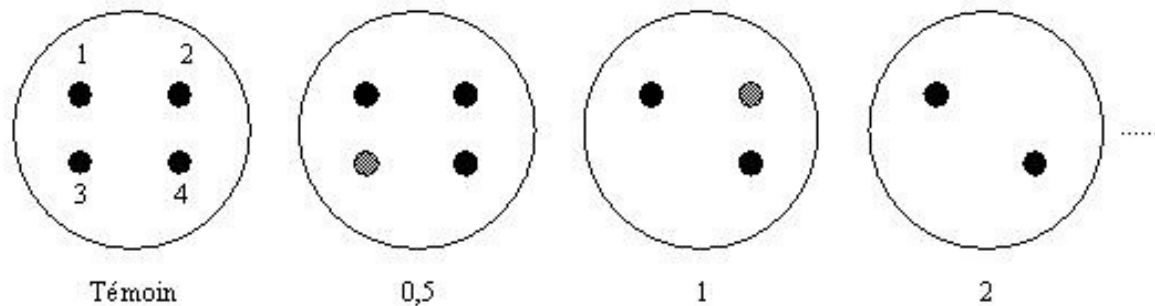
==> principe :

= déterminer la concentration minimale d'un antibiotique donné qui est capable d'inhiber la culture de la bactérie (*CMI = concentration minimale inhibitrice*)

Détermination de la CMI



Détermination des CMI en milieu liquide (Ex : CMI 2 $\mu\text{g/ml}$)



Détermination des CMI en milieu solide (CMI Souche 1 est $> 2 \mu\text{g/ml}$;
Souche 2 est $2 \mu\text{g/ml}$; Souche 3 est $1 \mu\text{g/ml}$...)

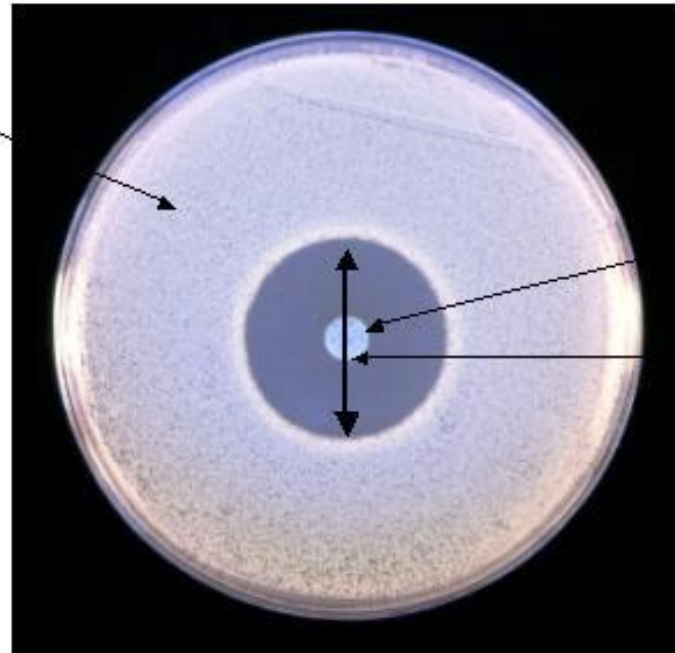
- une souche est dite :

SENSIBLE : si cette concentration est inférieure aux concentrations sériques qui peuvent être atteintes par un traitement à dose habituelle

RESISTANTE : si cette concentration est supérieure aux concentrations maximales que l'on puissent obtenir sans être toxiques

INTERMEDIAIRE : si cette concentration ne peut être obtenue qu'en augmentant la posologie

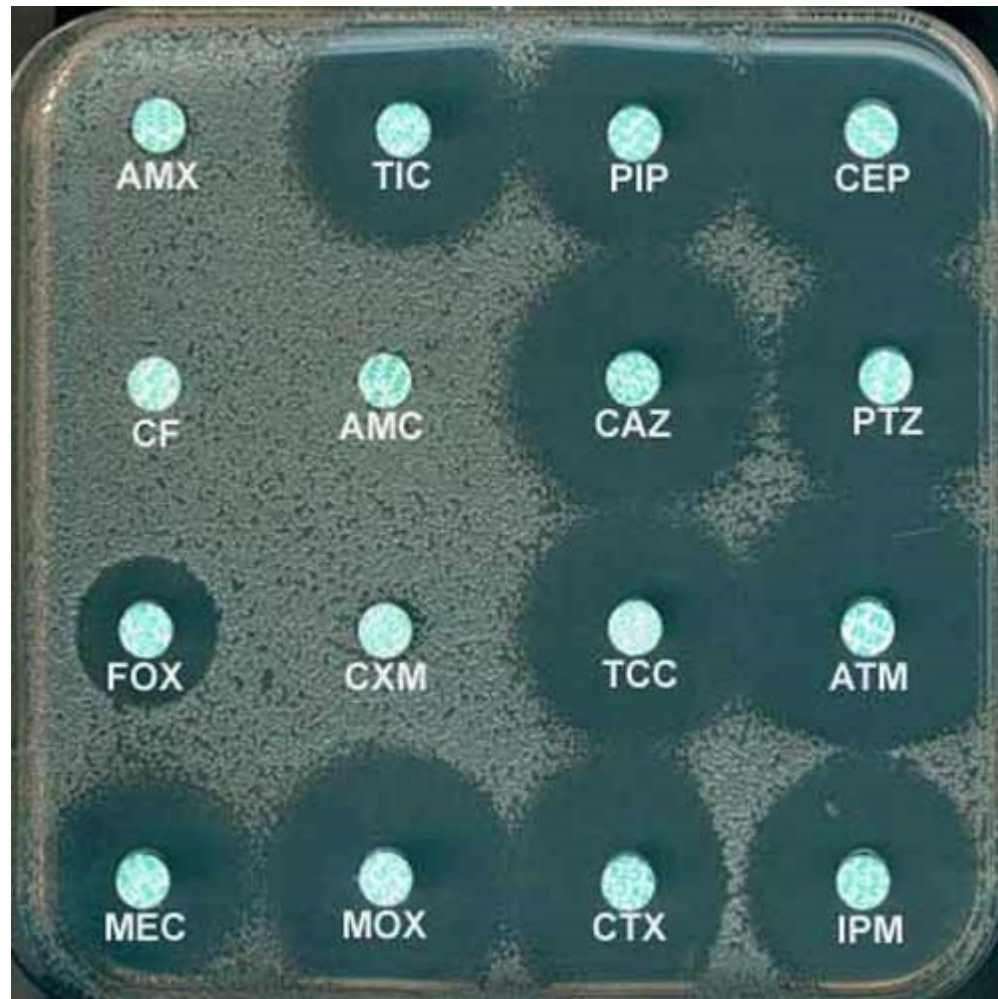
Culture bactérienne de
la souche à tester
obtenue après
ensemencement d'un
inoculum standardisé



Disque d'oxacilline

Mesure du diamètre
de la zone
d'inhibition





Exemple : *Enterobacter aerogenes*

Antibiotique	1	Antibiotique	1
Ampicilline	R >32 mg/l	Tobramycine	R >16 mg/l
Amox.+ Ac. clavulan	R >32 mg/l	Gentamicine	S <1 mg/l
Ticarcilline	R >128 mg/l	Amikacine	I 16 mg/l
Ticar.+ Ac.clavulan	R >128 mg/l	Nétilmicine	R >32 mg/l
Pip.+ Tazobactam	I 64 mg/l	Acide nalidixique	R >32 mg/l
Céfalotine	R >64 mg/l	Norfloxacin	R >16 mg/l
Céfoxitine	R >64 mg/l	Ofloxacin	R >8 mg/l
Céfotaxime	I 32 mg/l	Ciprofloxacine	R >4 mg/l
Ceftazidime	R >64 mg/l	Nitrofurantoine	I 64 mg/l
Imipénème	S <1 mg/l	Cotrimoxazole	R >320 mg/l

Commentaire : **béta-lactamase à spectre étendu et céphalosporinase de haut niveau**

Examens bactériologiques

Démarche diagnostique

Chronologie de la réponse

1er jour ==> Echantillon

- examen macroscopique : aspect de

l'échantillon

- examen microscopique :

*** cytologique**

*** coloration**

==> 1er résultat

- mise en culture sur milieu approprié

*** milieu de base**

*** milieu sélectif**

*** milieu spécifique**

2ème jour (matin)

- observation des cultures, tests d'identification rapide ...

==> résultat partiel

2-3ème jour

- identification bactérienne
- antibiogramme

==> résultat définitif

- éventuellement poursuite de la culture
(anaérobies, bactéries à croissance lente ...)