

DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIE

DEFINITION:

C'est l'ensemble des étapes du laboratoire qui apportent la preuve direct ou indirecte de l'infection bactérienne suspectée cliniquement.

On distingue:

Diagnostic direct: permet d'isoler l'agent responsable ou ses constituants à partir d'un produit pathologique.

Diagnostic indirect: permet de détecter les anticorps antibactériens spécifique dans le sérum du malade: diagnostic sérologique.

Intérêt:

- confirmer une infection suspectée cliniquement
- identifier l'agent incriminé dans l'infection
- rectifier un traitement ATB sur la base d'un antibiogramme.
- dépister des infections cliniquement asymptomatiques.

DIAGNOSTIC DIRECT

Il apporte la preuve directe de l'infection en révélant, dans le prélèvement:

- Soit la bactérie par microscopie et/ou culture
- Soit des antigènes bactériens
- Soit de l'ADN bactérien

1. prélèvements bactériologiques:

- la façon d'effectuer un prélèvement est primordiale car un mauvais prélèvement conduit à un mauvais examen cytobactériologique (perte de temps)
- De la qualité du prélèvement dépendent la valeur et la fiabilité du résultat de l'analyse.

Ces critères de qualités sont:

➤ **Concernant le prélèvement proprement dit :**

- ▶ Prélever avant toute antibiothérapie si non sous fenêtre thérapeutique de 3 à 4 jours.
- ▶ Effectuer une désinfection correcte du site de prélèvement ainsi que des mains du personnel chargé du prélèvement .
- ▶ Utiliser du matériel stérile pour réaliser et collecter le prélèvement.
- ▶ Respecter un volume suffisant du prélèvement destiné à l'analyse.

➤ **Transport et conservation :**

- le prélèvement doit être transporté rapidement au laboratoire d'analyse.
- le délai de transport ne doit pas dépasser une heure en moyenne.
- certains germes fragiles nécessitent un milieu de transport : ex milieu de STUART pour *Neisseria gonorrhoeae* dans les prélèvements génitaux.
- la température de conservation du prélèvement en attendant l'analyse :

T° de Conservation	37°C (étuve)	+4°C (réfrigérateur)	mise en culture immédiate Pas de conservation
Prélèvements	hémoculture, LCR Liquides de ponction Pus d'abcès non fistulisés Prothèses	Urines post mictionnelles Selles Expectorations Moins de 2h	Prélèvement de gorge Pus d'oreille, abcès fistulisé, Pvts gynécologiques Pvts génitaux masculins
Remarques	ils ne comportent aucune flore microbienne associée	une flore microbienne qui risque d'interférer avec l'agent causal La multiplication de cette flore est ralentie à +4°	ils ne tolèrent pas de conservation, ces prélèvements seront si possible effectués au laboratoire et mis en culture immédiatement

a/ l'hémoculture :

Il s'agit de la mise en culture du sang, sur des milieux de culture appropriés, afin de mettre en évidence des microorganismes (normalement le sang est stérile, lorsque des germes y pénètrent, on parle de bactériémie. Une bactériémie accompagnée d'un syndrome infectieux est une septicémie dont la forme la plus grave est le choc septique).

- Prélever le sang avant toute antibiothérapie.
- Prélever au moment des pics fébriles ou des frissons.
- Se laver les mains et porter des gants stériles.
- Désinfecter la veine du pli du coude du centre vers la périphérie (alcool iodé Bétadine ou alcool à 70°, 2 fois)
- Prélever 10 ml de sang/flacon chez l'adulte, 5 ml/flacon chez l'enfant, 1ml/flacon chez le nourrisson
- Désinfecter à la Bétadine le bouchon du flacon d'hémoculture.
- Ensemencer le sang prélevé dans le flacon d'hémoculture.
- Homogénéiser les flacons et les transportés dans du coton.
- Au laboratoire, les incuber à 37°C : Ne jamais mettre au réfrigérateur.
- Prélever 3 à 4 hémocultures espacées d'au moins 30 mn par 24h.

Le milieu pour hémoculture est classiquement un bouillon conditionné en flacon sous pression réduite ; On trouve divers modèles, les uns pour incubation conventionnelle, les autres spécifiques pour incubateurs automatisés. En incubation classique, diverses options sont proposées : la présentation Biphase (phase solide - phase liquide) retrouvée dans le modèle CASTANEDA et présentation monophasique : bouillon pour hémoculture de l'Institut Pasteur d'Algérie.

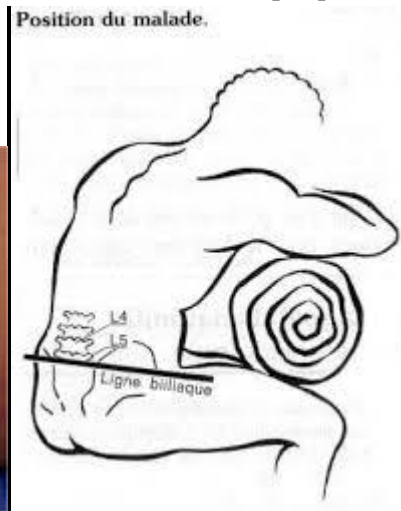


Les autres pour incubation automatisée :

b/ Liquide céphalo-rachidien : LCR : (porter des gants stériles) :

C'est un prélèvement d'urgence, on l'obtient en faisant des ponctions lombaires, le LCR est stérile.

-Désinfecter l'espace intervertébral L4-L5 ou L5-S1 du centre vers la périphérie à la Bétadine.



-ponctionner avec une aiguille avec mandrin stérile

-laisser s'écouler 2 à 5 ml de LCR dans un tube stérile

-envelopper le tube dans du coton et le transporter rapidement au laboratoire d'analyse. Ne jamais mettre au réfrigérateur.

-Parfois on fournit des tubes gélosés au clinicien et donc il l'ensemence directement.



c/ les urines : pour Etude Cyto Bactériologique des Urines : ECBU

-Prélever les urines avant toute antibiothérapie

-Prélever les urines ayant séjourné au moins 4h dans la vessie, les urines du matin sont les meilleurs.

-Le prélèvement est précédé d'un lavage soigneux des organes génitaux externes, d'avant en arrière, à l'eau et au savon ou au dakin, suivi d'un rinçage à l'eau.

-Le malade élimine le 1^{er} jet d'urine, puis prélève 20ml du milieu du jet, directement dans un flacon stérile fourni par le laboratoire.

-Pour les enfants il y a des collecteurs d'urines adhésifs qui recueillent l'urine, il faut les renouveler toutes les 20 mn.

-Pour les malades sondés, recueillir l'urine en piquant la sonde après désinfection.

-Pour certains malades : on fait des ponctions sus pubiennes.

-Les urines doivent être transportées au laboratoire d'analyse en moins d'1 h.

-Les urines peuvent être conservées à +4°C pendant une durée ne dépassant pas 2h.

d/ les selles : pour coproculture

Avant antibiothérapie, prélever les selles fraîches du matin

-le récipient utilisé est un flacon stérile ou, à défaut très propre.

-Conservation <2h à +4°C en attendant l'analyse.

e/ pus et épanchements : suppurations :

-Prélever avant toute antibiothérapie

-Désinfecter la peau du centre vers la périphérie.

-Ponctionner l'abcès fermé à l'aiguille montée sur une seringue stérile

-Aspirer le pus

-Une fois l'aiguille retirée, chasser l'air de la seringue

-Adresser la seringue au laboratoire d'analyse

-Si pus provenant d'abcès ouverts (fistulisés) ou ulcération : prélever le pus à l'aide d'un écouvillon stérile.

f/ les liquides de ponction : liquide pleural, liquide d'ascite, liquide péricardique, liquide péritonéale, liquide articulaire

g/ prélèvements de la sphère ORL : sont effectués en cas d'angines, de sinusite ou d'otite : sont généralement faits à l'écouvillon.

h/ prélèvements de la sphère respiratoire : l'examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) : se pratique couramment en cas de suspicion de pneumopathie ou de bronchites, doit être prélevé le plus soigneusement possible (afin d'éviter la contamination par la salive), avant de procéder, il faut effectuer un rinçage soigneux de la bouche à l'eau stérile.

2. Fiche de renseignement: +++

Est primordiale, accompagne obligatoirement tout prélèvement destiné à une analyse microbiologique.

Doit être dûment remplie par le médecin : Nom, prénom, âge, date du prélèvement, lieu et nature du prélèvement, résumé des signes cliniques et parfois le germe suspecté, traitement antibiotique en cours ou datant de moins de 7 jours.

3. Traitement des prélèvements au laboratoire:

a/Enregistrement au laboratoire: dans un registre: un numéro d'ordre interne au laboratoire leur est attribué

b/Examen macroscopique : fournit des informations importantes et a une valeur d'orientation:

Clair, Trouble, hématique, purulent

c/Examen microscopique :

EF: état frais: examen d'une goutte de prélèvement entre lame et lamelle:

- Apprécie la réaction inflammatoire et la chiffre par mm³ (ex: examen d'un LCR: 500 leucocytes/mm³) sur cellule Malassez ou Nageotte
- précise le caractère des cellules inflammatoires (PN altérés ou non, lymphocytes)
- détecte les bactéries à l'état vivant, leur morphologie et mobilité.

Les examens après coloration:

✓ Colorations simples:

Coloration de Gram: (cf. TP)

Coloration au bleu de méthylène: Apprécie la réaction leucocytaire et colore les germes.

✓ Colorations spéciales:

-Coloration au MGG: (May- Grunwald –Giemsa): Elle apprécie la richesse et morphologie des cellules d'un prélèvement.

-Coloration de Ziehl-Neelsen: Elle recherche les bacilles acido-alcoolo-résistants (ex: BK)

-Immunofluorescence direct (IFD): Utilisé pour révéler la présence de certaines bactéries de culture difficile, directement à partir du prélèvement, en mettant en évidence les Ag bactériens grâce à un AC monoclonal marqué à la fluorescéine.

d. Recherche des antigènes solubles: Ce sont des antigènes spécifiques d'une espèce bactérienne libérés dans les liquides biologiques tel le LCR, les urines..., leur détection est à visée diagnostique:

N.meningitidis, *S.pneumoniae*, *H. influenzae*, *listeria monocytogène*, d'*Escherichia coli K1* et de *streptococcus agalactiae* (Beta hémolytique du groupe B) dans le LCR par agglutination.

Légionella pneumophila et *s. pneumoniae* dans les urines par immunochromatographie.

e. Mise en culture de prélèvement: Sur milieux approprié : simple, enrichie, sélectif

Conditions d'incubation: température, tension d'oxygène, tension du CO₂, la durée d'incubation.

f. Identification bactérienne: en se basant sur les caractères cultureux, coloration de Gram, les tests rapides: catalase, oxydase, les caractères biochimiques,

Etude antigéniques: étude des antigènes de groupe ou de type: technique d'agglutination

g. Tester la sensibilité du ou des germes isolés aux antibiotique: antibiogramme par la technique de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CLSI (voir cour tests de sensibilité aux ATB)

h. Interprétation:

Bactérie pathogène spécifique: cause toujours le même type de maladie ex: *Brucella* et brucellose, *Salmonella typhi* et fièvre typhoïde.

Bactéries pathogènes opportuniste: banales bactéries commensales de la peau et des muqueuses ou bactérie de l'environnement : l'interprétation est basée sur les critères cliniques et l'abondance de la culture.

Diagnostic direct par les techniques de biologie moléculaire: Mise en évidence de marqueurs moléculaire: identification d'un gène spécifique dans un mélange de fragments d'ADN bactérien par PCR: polymerase chain reaction.

Application: infections dues à des bactéries à croissance difficile ou très lente: tuberculose pauci-bacillaire, les infections génitales, les endocardites à hémoculture négative.

Conclusion:

Le diagnostic bactériologique est la clé de voûte des explorations en pathologie infectieuse.

De la qualité du prélèvement dépende la qualité de l'analyse bactériologique et la rigueur dans l'interprétation et la validation des résultats : tout ça nécessite une bonne coopération entre clinicien et microbiologiste.