

DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

DR BECHIR: 2021-2020

I- INTRODUCTION:

❖ DIAGNOSTIC D'UNE INFECTION

Le diagnostic bactériologique est un ensemble de moyens permettant de confirmer telle ou telle étiologie infectieuse d'origine bactérienne.

Le rôle du laboratoire est de confirmer le diagnostic de l'infection, d'identifier les bactéries, de déterminer la sensibilité aux antibiotiques et de détecter les résistances.

❖ 2 MOYENS:

➤ Diagnostic direct :

mise en culture, identification.

➤ Diagnostic indirect:

mise en évidence de la réponse de l'organisme à l'infection par la présence d'anticorps spécifiques.

II-DIAGNOSTIC DIRECT

Le diagnostic direct est le seul diagnostic de certitude, car il permet la mise en évidence de la bactérie elle-même, donc finalement sa culture ou isolement qui permettra l'identification ultérieure mais aussi de préciser sa sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

II-1- Examen cyto-bactériologique :

d'une urine (ECBU),

d'une expectoration (ECBC),

d'un liquide pleural...

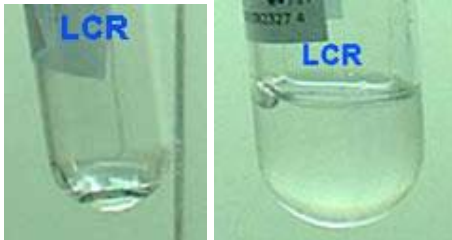




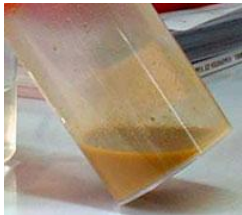
- Etapes:

1. Demande
2. Examen macroscopique
3. Examen microscopique
4. Culture.
5. Identification - ANTIBIOGRAMME.

1 - Demande: Il existe une procédure standard de recherche de cellules et de bactéries. Ceci exclut toute recherche systématique de germes particuliers qui nécessite une demande spécifique (Bacilles Acido-Alcool-Résistants).

2 - Examen macroscopique

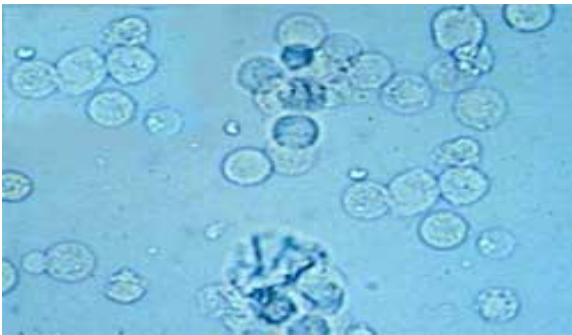
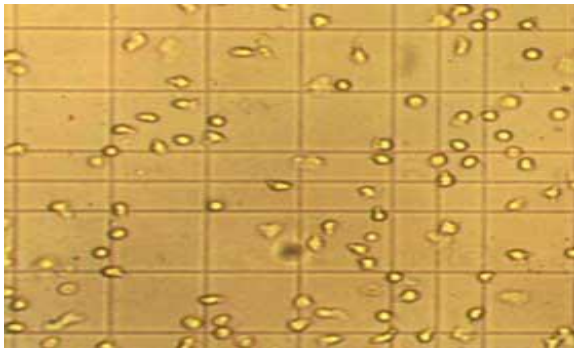
Toute infection bactérienne s'accompagne de signes biologiques comme l'éventuelle présence de leucocytes. Une modification visuelle signe une anomalie :

Trouble:			
Hématu- riques:		Odeur:	
		Consistance:	

3- Examen microscopique

nécessité de rechercher des bactéries et des éléments cellulaires de type polynucléaire ou lymphocyte(tuberculose) au microscope optique.

3 – 1- Etat frais:

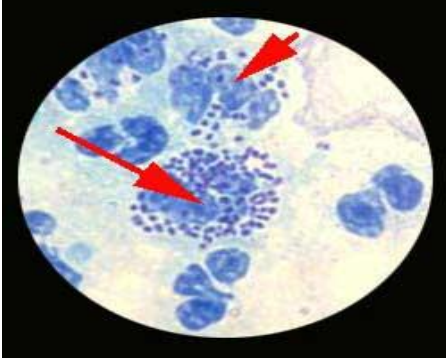
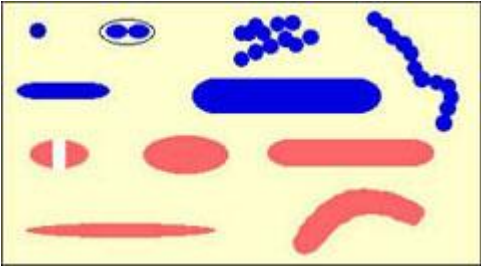
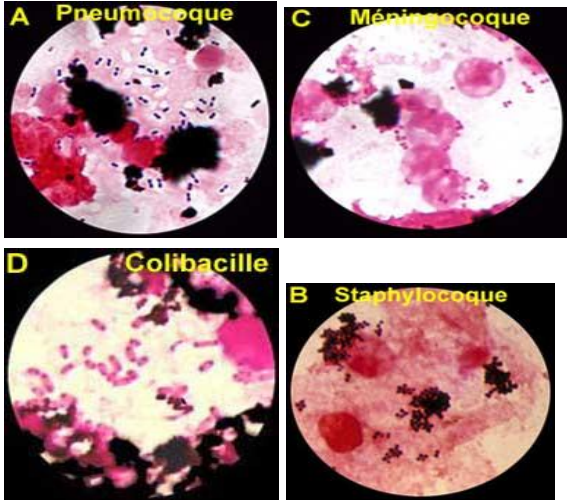
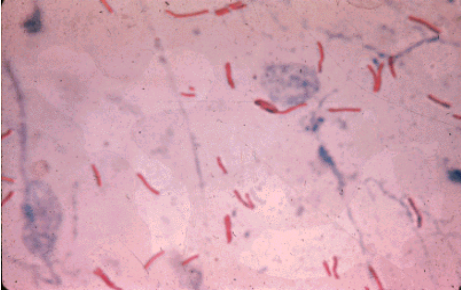
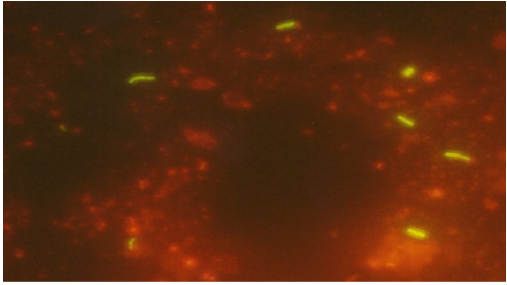
	
Présence de bactéries	Numération

Une préparation est obtenue avec le dépôt d'une goutte entre lame et lamelle, puis on observe au microscope d'une part, la présence éventuelle de bactéries (coque, diplocoque, chaînette, coccobacille, bacille...), le type de mobilité .

Par ailleurs, lors de cette observation, seront évaluées les cellules avec une appréciation semi-quantitative (rares, peu nombreux, nombreux, très nombreux...) ou mieux quantitative, exprimée par nombre d'éléments / mm³ ou ml ou par champ.

- Exemple d'une cellule de Malassez pour LCR, liquides de ponction, urines

3.2. Examen après coloration: Un frottis fin est obtenu à partir du produit pathologique, puis coloré permettant une meilleure visualisation des bactéries et/ou des éléments cellulaires.

<p>A- Coloration simple: Le frottis fin est traité par un seul colorant basique (bleu de méthylène)</p> <p>→ pus urétral pour la recherche de gonocoque: diplocoques en grain de café intracellulaires :</p>	
<p>B- Coloration différentielle : Compte tenu des différences structurales (cf anatomie) de la paroi des bactéries, la coloration de Gram découverte par Hans GRAM en 1884 permet de distinguer les bactéries colorées en violet (G+) de celles en rose (G-).</p> 	
<p>C- Examen après coloration spéciale (Ziehl-Neelsen)</p>	
<p>D- Microscopie au fond noir (condenseur spécial) : Il s'agit de rechercher des bactéries sur lesquelles la lumière s'est réfléchi. Cette recherche est inhabituelle,</p>	
<p>E- Microscopie électronique : rarement utilisée en pratique, plus souvent dans le cadre de l'identification d'une nouvelle étiologie bactérienne (Bartonella, Helicobacter...).</p>	

Premières conclusions:

Les éléments récoltés de l'examen macroscopique et surtout microscopique fournissent souvent des arguments diagnostiques de très forte présomption qui vont permettre la mise en route d'une thérapeutique adaptée.

La culture ou l'isolement de l'agent causal sera, cependant, essentielle. Elle permettra l'identification ultérieure mais aussi de préciser sa sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme).

4-Culture et isolement

L'examen cyto-bactériologique d'un produit pathologique débute par l'examen macroscopique, puis l'examen microscopique .

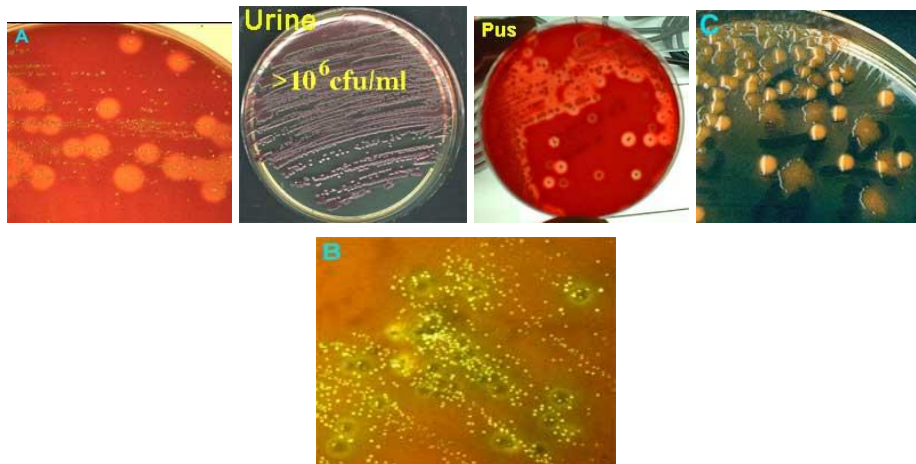
Après ensemercer le produit pathologique pour un éventuel isolement d'un ou plusieurs germes.

Divers milieux sont utilisés qui doivent satisfaire les besoins nutritifs et énergétiques des bactéries à cultiver ,

En pratique, sont utilisés plusieurs milieux solides (gélifiés) avec une technique particulière d'ensemencement (isolement orthogonal ou en cadran) permettant l'isolement de clones bactériens sous la forme de colonies (de l'ordre de 10^6 bactéries).



Délai d'incubation : De très nombreuses espèces bactériennes cultivent après 18 à 24 H d'incubation à 37°C. Cependant d'autres espèces ont des délais d'incubation plus longs telles *Mycobacterium tuberculosis* (temps moyen d'isolement de l'ordre de 21 jours)



5-Identification – Antibiogramme:

- A l'aide de tests d'orientation rapide : oxydase, catalase, coagulase...
- Par ensemencement d'une galerie biochimique adaptée :
Identification de *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* par un ensemble de réactions du métabolisme intermédiaire avec la galerie commerciale. Exemple API20E (Physiologie-Croissance)



Exemple d'un antibiogramme (méthode de diffusion ou des disques) d'une souche de *Escherichia coli* productrice d'une pénicillinase (cours sur les Antibiotiques).

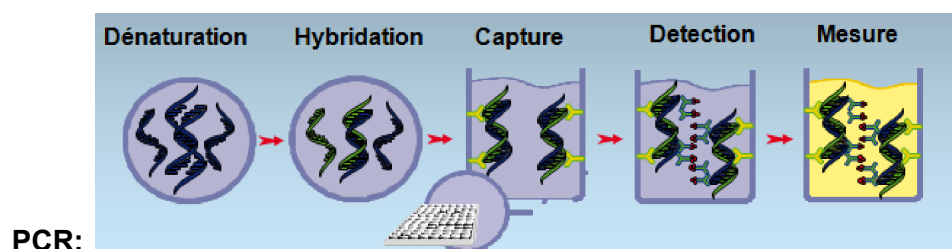


A l'heure actuelle, existent des automates qui effectuent dans un délai de quelques heures, l'identification et l'antibiogramme

II-2- Méthodes moléculaires

Il existe depuis quelques années, des méthodes pour identifier une bactérie dans un produit pathologique ou d'une culture. Le principe en est simple puisqu'il consiste à amplifier un gène entier ou non avec des amorces spécifiques qui peut être ultérieurement révélé, ou par hybridation ou encore séquencé et comparé avec ceux déposés dans des banques (EMBL, NCBI par exemple)

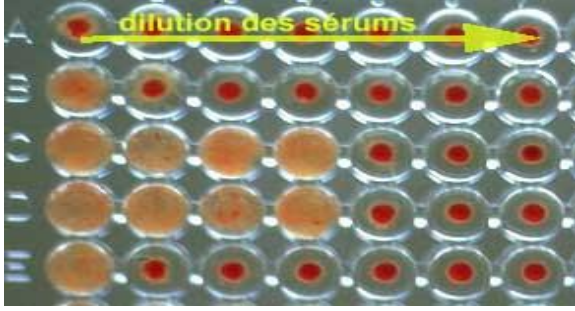
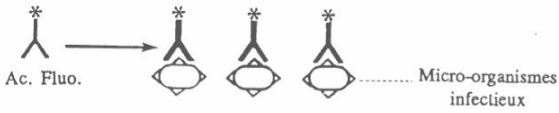
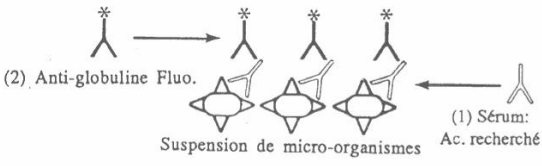
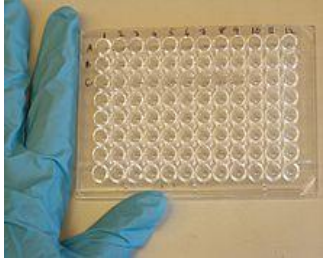
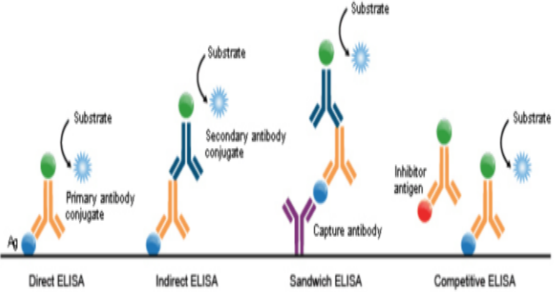
SPÉCIFICITÉ, RAPIDITÉ, SENSIBILITÉ



III- DIAGNOSTIC INDIRECT OU SÉROLOGIQUE

Il se base sur les conséquences induites chez l'hôte (réaction immunologique), à savoir la production d'anticorps

La réaction immunitaire ne se développe qu'à partir d'un délai, de l'ordre de 8 à 10 jours

<p>Réaction d'agglutination: en tubes (sérodiagnostic de Widal-Felix, Wright....) avec des dilutions du sérum (Wright du 1/10 au 1/1280e) Recherche d'anticorps par une technique de révélation utilisant les globules rouges</p>	
<p>Immunofluorescence directe</p>	
<p>Immunofluorescence indirecte</p>	
<p>La méthode immuno-enzymatique ELISA</p> 	

❖ **Quelques exemples de sérodiagnostic:**

Brucellose : agglutination (Wright), Antigène tamponné ou Rose bengale, Fixation du complément, Coombs, IFI, ELISA

Chlamydioses : IFI, Fixation du complément

Legionellose : IFI, ELISA

Lyme (maladie) : IFI, ELISA, Western-blot

Mycoplasmes : Fixation du complément, ELISA

Salmonelloses : anti-typhoparathyphoïdiques (Widal-Félix)

Infections profondes à Staphylocoques : anti-staphylolysines alpha

Infections à Streptocoques du groupe A : anti-streptolysines, anti-streptodornases, anti-streptokinases

Syphilis : TPHA, FTA, TPI, ELISA