

# MOYENS ET MODES DE DÉTECTION D'UN AGENT INFECTIEUX DU PRÉLÈVEMENT À L'EXAMEN MICROBIOLOGIQUE

UE 2.5 S3  
Dr Méhalaine  
Promotion 2021-2024

# Plan

1. Eléments pour le diagnostic d' une infection
  - A. Etiologie d'une infection
2. Recherche directe
  - A. Pré-requis pour un prélèvement réussi
  - B. Les différents prélèvements
  - C. Analyses microbiologiques
  - D. Recherche d'antigènes par techniques immunochromatographique
  - E. Autres Techniques de diagnostique
3. Diagnostic indirect : sérologie

# ELÉMENTS POUR LE DIAGNOSTIC D'UNE INFECTION

- ⊙ Élément de base : la clinique
  - Signes généraux d'infection (fièvre, tension, température, diarrhée)
  - Signes spécifiques ( taches purpuriques, éruptions diverses).
- ⊙ Examens complémentaires :
  - Imagerie.
  - Biologie (CRP, PCT, NFS...).
- ⊙ Recherche étiologies de l'infection:
  - Prélèvement microbiologie

# ETIOLOGIE D'UNE INFECTION

- ⊙ Recherche directe de la bactérie, du virus, du parasite... :
  - Par examen direct
  - Par culture
  - Par recherche antigénique
  - Par biologie moléculaire
- ⊙ Recherche indirecte
  - Recherche d'anticorps dirigées spécifiquement contre l'agent infectieux (Sérologie)

# PRÉ-REQUIS POUR UN PRÉLÈVEMENT RÉUSSI

- Prescription obligatoire.
- Guidés par la symptomatologie et observation clinique
- Localisation ?
  - Organes cibles(LCR, abcès profonds, épanchements...)
  - Sang au cours de la dissémination
  - Porte d'entrée (cutanéomuqueuse, matériel implantables...)
  - Liquides et sécrétions biologiques.

# PRÉ-REQUIS POUR UN PRÉLÈVEMENT RÉUSSI

- ⦿ A quels moments?
  - le plus tôt possible, avant tout traitement.
  - Pic fébrile
  - Echec thérapeutique ou évolution défavorable.
- ⦿ Précautions indispensables?
  - Stérilement en suivant les recommandations à la fois pour protéger le patient et la qualité du prélèvement.
  - Transport rapide au laboratoire
  - Utilisation du matériel et des milieux appropriés.

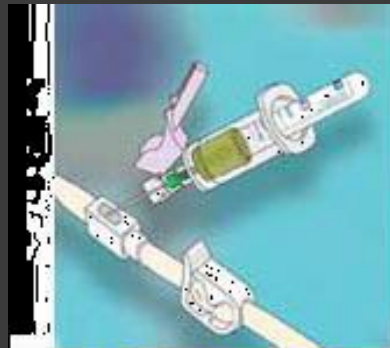
# LES PRÉLÈVEMENTS

## ○ Urines

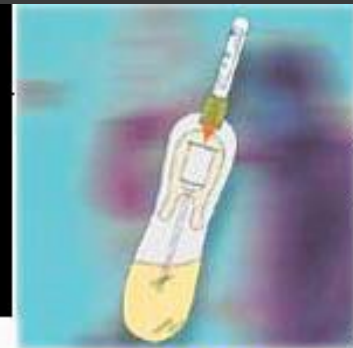
- Classiquement utilisée pour la réalisation d'un ECBU (bandelettes préalable conseillée) :
  - Nitrites, sang, leucocytes.
  - Attention pédiatrie et patients sondés.
  - Toilettes + milieu de jet.



Patient autonome



Patient sondé



Pédiatrie



# LES PRÉLÈVEMENTS

## ◎ Urines

- Urines de 24h pour le diagnostic de Tuberculose, bilharzioses...
- Recherche d'antigènes bactériens (pneumocoques, legionella) ou virales (CMV)





# LES PRÉLÈVEMENTS

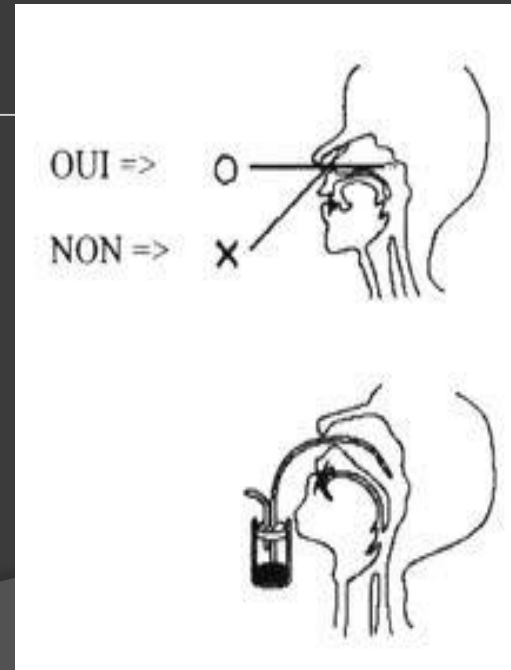
## ⊙ Prélèvements ORL

- Aspiration nasopharyngée

- Recherche virale principalement (VRS, Grippe, CMV, coqueluche, rougeole).

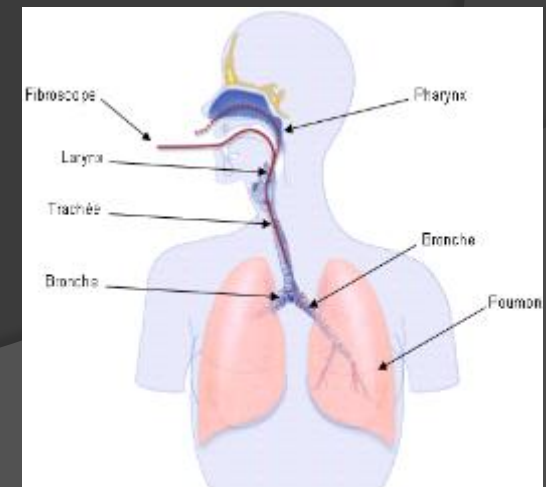
## ⊙ Prélèvements pulmonaires

- Crachat (ECBC)



# LES PRÉLÈVEMENTS

- LBA (Lavage Broncho-Alvéolaire)
  - Fibroscope
  - Instillation de sérum physiologique dans Bronche et réaspiration (4 à 6 fois)
  - Tolérance mauvaise et contamination.
  - Avantage : recherche de germes opportunistes (Pneumocystis, CMV, Nocardia), intracellulaire (Legionelle)
- PDP (Prélèvement Distal Protégé)
  - Sans fibroscopie
  - Volume faible
  - Sans contamination par la flore oro-pharyngée



# LES PRÉLÈVEMENTS

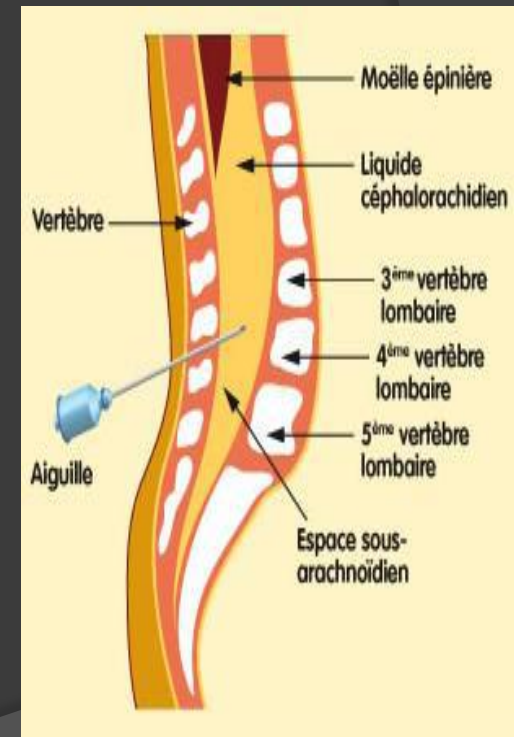
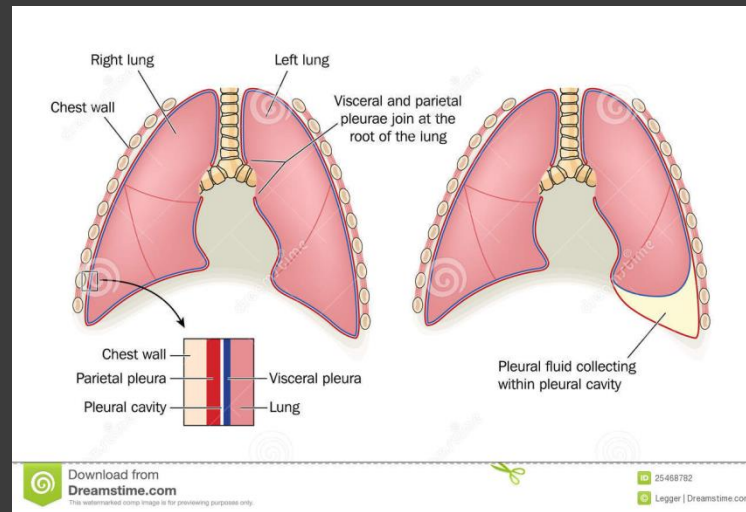
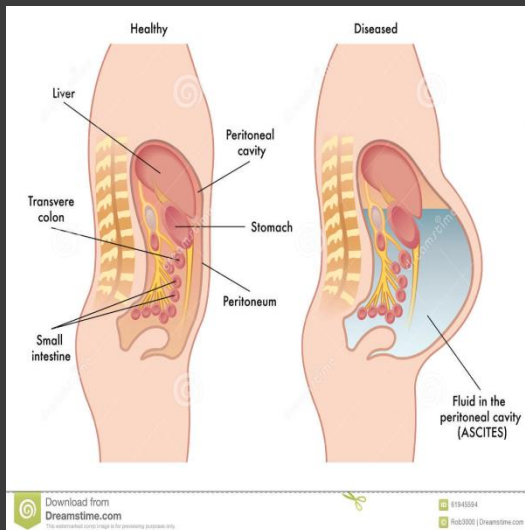
## ◎ Selles (coproculture)

- Une grosse noix dans pot stérile
- Préférer les fragments muqueux, glaireux, sanglants.
- Renseignements indispensables pour orienter les recherches :
  - Coproculture standard avec recherche de **Salmonella, Shigella, Yersinia, Campylobacter, Choléra** (voyage)...
  - Recherche de BMR : à préférer aux écouvillons.
  - Recherche de toxines à *Clostridium difficile*  
Post-ATB ou épidémie seule indication.
  - Recherche de parasite : Ne pas mettre  
À +4°C.



# LES PRÉLÈVEMENTS

- LCR (Liquide Céphalo-Rachidien)
  - Urgence absolue en cas de suspicion de méningite
  - Transport urgent +++ car germes fragiles
- Ponctions (ascite, articulaire, Pleurale)



# LES PRÉLÈVEMENTS

## ○ Hémocultures

- Une hémoculture = un flacon aérobie + un flacon anaérobie.
- Prélèvement veineux **STERILE** avec un volume précis
- indications
  - Hyperthermie  $>38,5$  °C
  - Hypothermie  $<36,5$ °C
  - Frissons
- Prélèvements répétés avant toute antibiothérapie.



# LES PRÉLÈVEMENTS

## ⦿ Prélèvements cutanéomuqueux



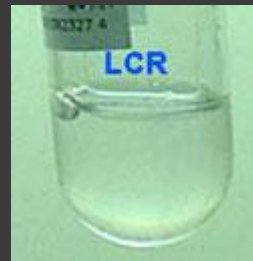
# Analyses microbiologiques des prélèvements

- Bactériologie «classique»
  - Examen macroscopique
  - Examen microscopique
  - Mise en culture
  - Identification
  - Antibiogramme
- Mycologie-parasitologie et virologie
- Recherche d'antigènes solubles
- Méthodes moléculaires

# Examen macroscopique

- Les infections bactériennes peuvent s'accompagner de signes visibles :

- **Trouble**
- Hématurie
- Autres colorations
- Odeur (anaérobies, pyo)
- Consistance (selles)





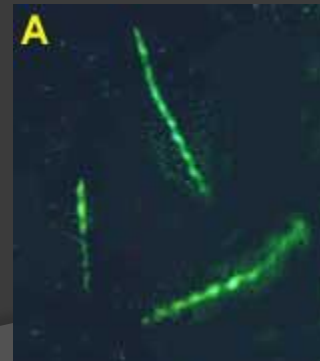
# Examen microscopique

**Intérêt diagnostique : +++**

**Milieux de cultures à sélectionner**

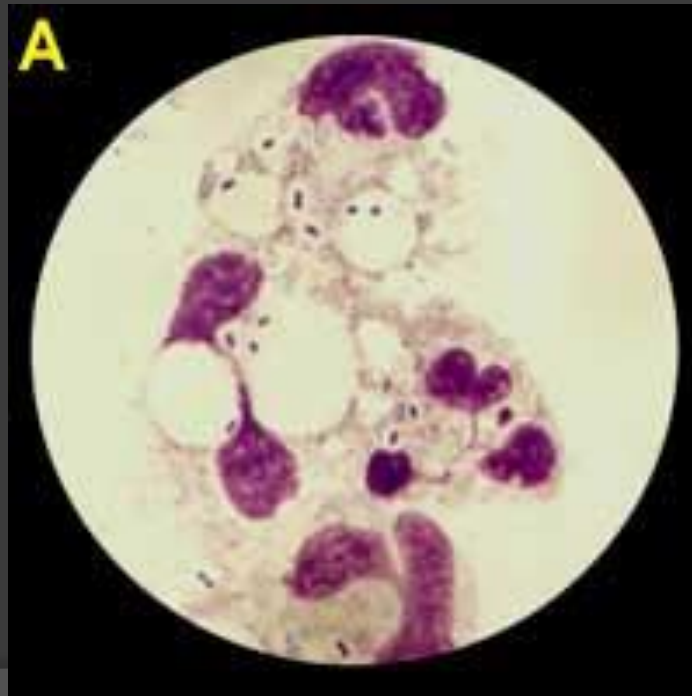
## ⊙ Examen cytologique

- État frais : quantitatif ou semi-quantitatif
  - leucocytes, hématies, germes
  - Microscope à fond noir



# Examen microscopique

- Coloration (MGG) : qualitatif à visée cytologique pour observer les polynucléaires, macrophages, lymphocytes... Les bactéries peuvent être visible.

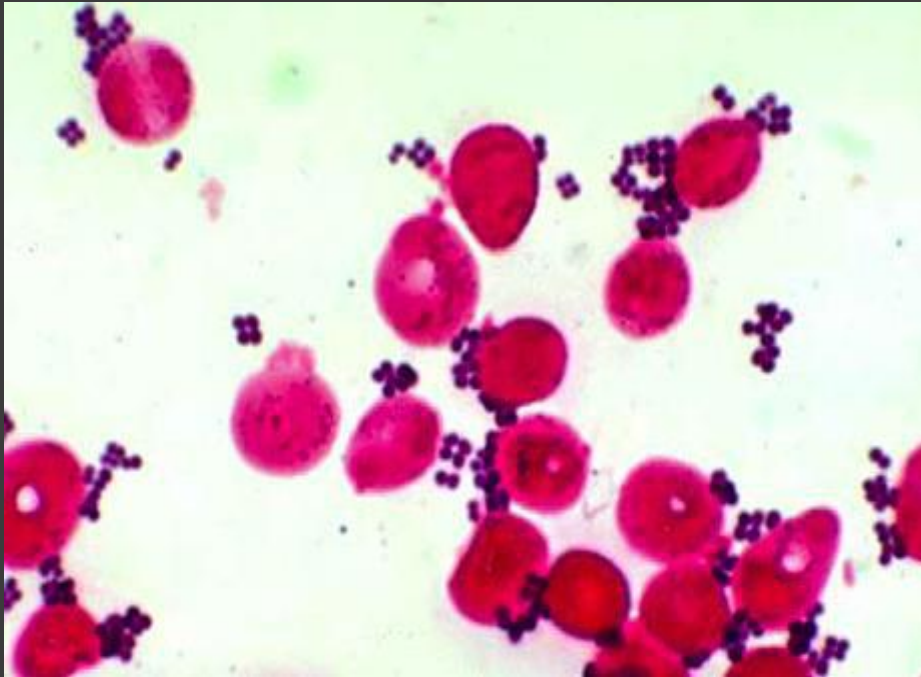


# Examen microscopique

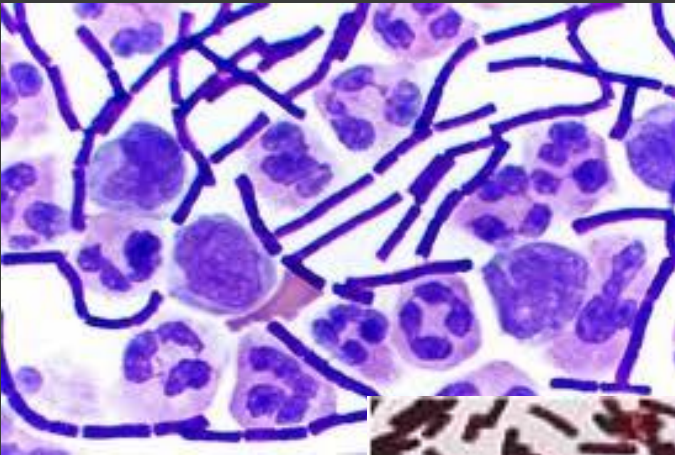
## ⦿ Examen bactériologique

- Gram : information importante qui conditionne la prise en charge efficace d'une infection (choix antibiotiques probabilistes).
- Coloration différentielle : Compte tenu des différences structurales de la paroi des bactéries:
  - Gram positif : coloré en violet
  - Gram négatif : coloré en rose
- Attention certaines bactéries ne se colore pas au Gram (Mycobactéries, tréponèmes)

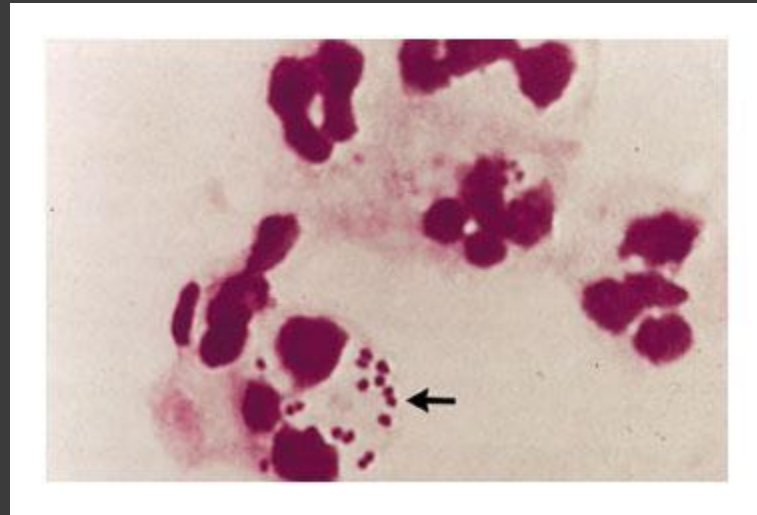
# Cocci Gram positif



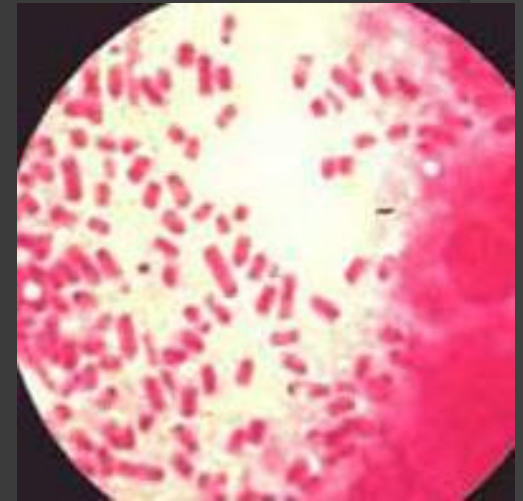
# Bacille gram positif



# Cocci gram négatif



# Bacille gram négatif



# Autres colorations

- Coloration de Ziehl-Neelsen :





# EXAMEN MICRO –MACRO : 1° ÉLÉMENTS DE DIAGNOSTIQUES

- ⊙ l'examen macroscopique et **surtout microscopique** fournissent souvent des **arguments diagnostiques** de très forte présomption.
- ⊙ Mise en route d'une thérapeutique adaptée
- ⊙ Choix des milieux de cultures à ensemercer
- ⊙ Résultats des cultures permettront :
  - Identification,
  - test des sensibilités aux traitements
  - besoins en nouvelles orientations diagnostiques

# Culture et isolement

- Les bactéries étant des êtres vivants plus ou moins fragiles un certains nombres de conditions sont requis :
  - les géloses doivent répondre aux besoins nutritifs et énergétiques
  - Incubation à 37°C
  - Délai d'incubation de 24h à plusieurs jours (42 pour les BK)
  - Atmosphère : aérobie, anaérobie, sous 5% de CO<sub>2</sub>...
- Existence de milieux sélectifs pour éliminer certaines bactéries commensales, détection spécifiques de BMR...



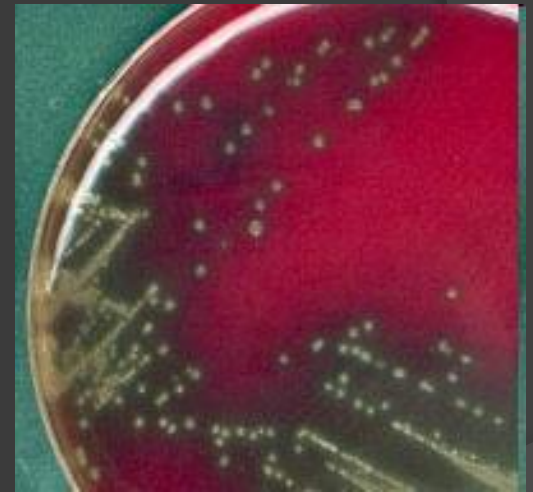
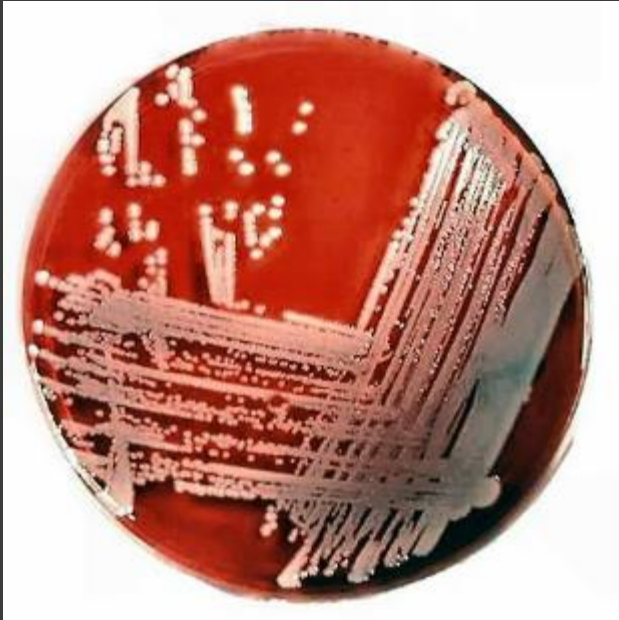
# ELÉMENTS DE DIAGNOSTIQUES

- Type de milieux où pousse la bactérie
- Type respiratoire : culture en aérobiose et/ou en anaérobiose
- Aspect des colonies
- Présence d'une hémolyse (alpha, bêta)
- Quantification du nombre de colonies



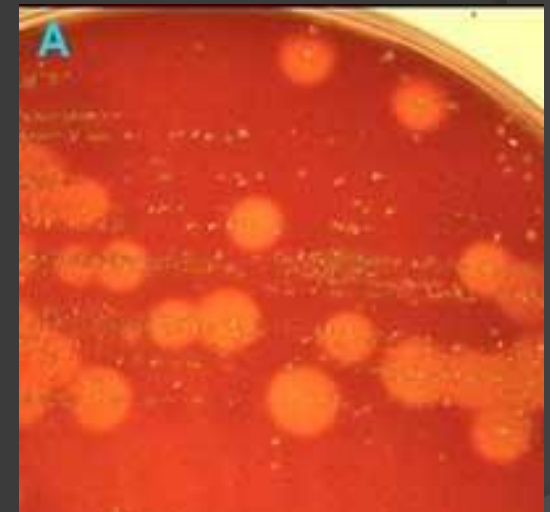
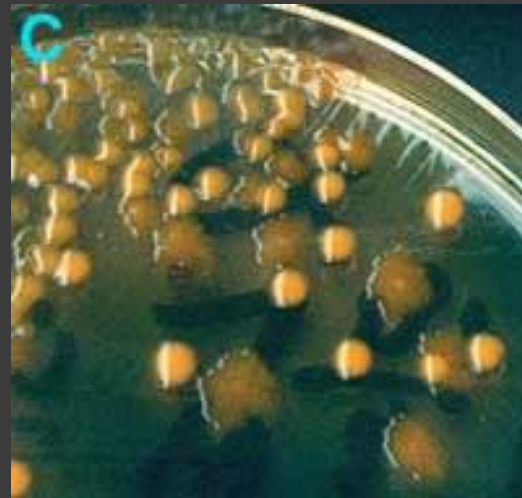
# Analyses des cultures

- Cultures uni-ou pauci-microbiens



# Analyses des cultures

- Prélèvements plurimicrobiens



# IDENTIFICATION DÉFINITIVE

- Demande de 6 à 24h de plus
- tests d'orientation rapide : oxydase, catalase, coagulase...
- Propriétés biochimiques (métabolisme respiratoire, glucidique, enzymatique).



- +/-biologie moléculaire
- Spectrométrie de masse

# INTERPRETATION

## ⊙ **Prélèvements monomicrobiens:**

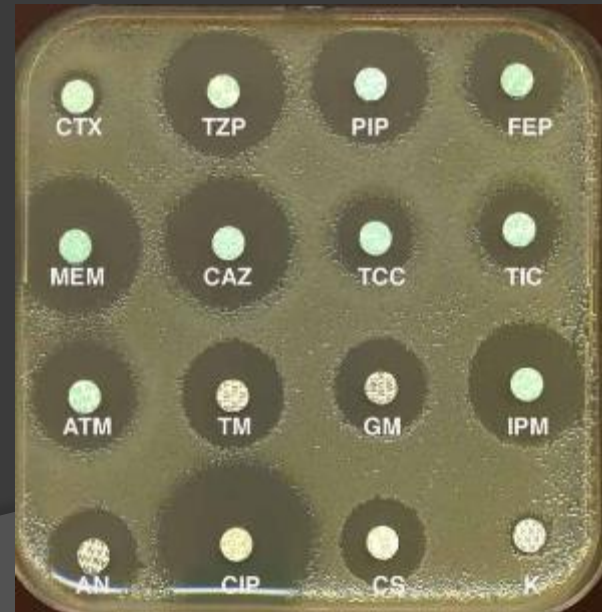
- provenant de sites normalement stériles (sang, urine, LCR, tissus...)
- interprétation assez facile
- Examen direct capital, rapide, très informatif

## ⊙ **Prélèvements polymicrobiens:**

- du revêtement cutanéomuqueux avec flore commensale (gorge, selles, vagin, peau)
- diagnostic plus difficile: repérer une bactérie pathogène au milieu de bactéries commensales souvent très abondantes
- Examen direct peu contributif

# Antibiogramme

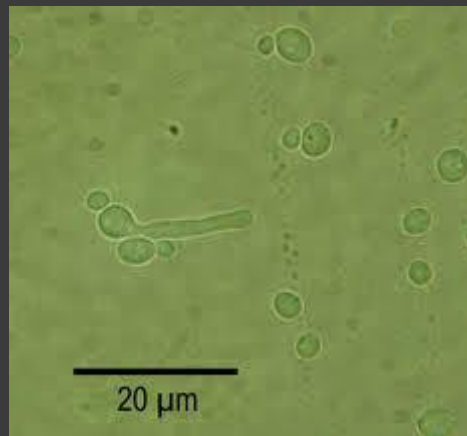
- Détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.
- Panel de molécules testées fonction de l'espèce bactérienne.
- Adaptation du traitement antibiotique
- Mesure isolement? BMR?
- Epidémiologie





# Mycologie, Parasitologie et Virologie

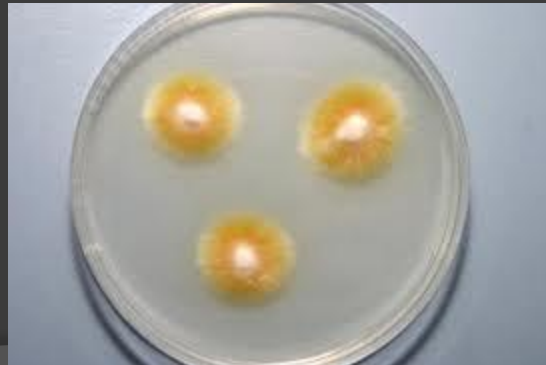
- Mycologie :
  - Mêmes principes que la bactériologie avec un examen microscopique, cultures, identification +/- antifongigramme.



- Recherche de levures (candida spp, Cryptococcus neoformans) responsables d'infections systémiques chez les patients immunodéprimés ou locales.

# Mycologie, Parasitologie et Virologie

- recherche de dermatophytes : phanères et peaux
  - responsables d' infections localisées : herpès circiné, teigne, onycho-mycoses.



# Parasitologie

- ⦿ Peu ou pas de culture
- ⦿ Tout repose sur l'examen macroscopique et microscopique avant ou après technique de concentration



# Virologie

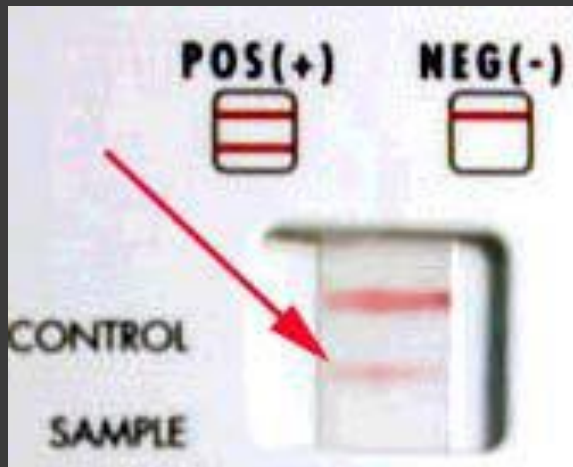
- Culture rare (laboratoire spécialisé) uniquement pour Herpes virus simplex ou CMV.
- Diagnostic principalement par **sérologie**, **biologie moléculaire (qualitative ou quantitative)** ou recherche d'antigènes.

# RECHERCHE D'ANTIGÈNES PAR TECHNIQUES IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES

- Avantages : précocité, simplicité, rapidité, diagnostic tardif
- Sensibilité variable
- Urines : pneumocoque, Legionella pneumophila...
- LCR
- Selles : toxines de Clostridium difficile, Helicobacter pylori, kystes de Giardia, rota- et adéno-virus....
- Inconvénient:
  - pas d'isolement du germe responsable,
  - certaines souches peuvent ne pas être détectées (légiennella),
  - Positivité peut rester plusieurs mois après guérison.

# RECHERCHE D'ANTIGÈNES PAR TECHNIQUES IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES (SUITE)

- Recherche d'antigènes solubles pneumocoque



# Autres Techniques de diagnostique

- La microbiologie «traditionnelle» peut être prise en défaut:
  - Culture impossible (traitement antibiotique préalable, *Treponema...*)
  - culture trop complexe (*Chlamydiae trachomatis*)
  - culture trop lente par rapport à l'urgence (*Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, ...).
  - Incontournable pour la virologie : +++
- On utilise des méthodes moléculaires et plus récemment la spectrométrie de masse.

# LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

- **PCR et séquençage** : détection et identification des microorganismes dans les prélèvements biologiques ou après isolement (ARNr 16S ou gène sodA pour strepto).
- **PCR temps réel** : détection qualitative des CT et NG et quantitative avec charge virale
- **PCR et hybridation sur sondes** (Exemple de l'identification d'une espèce de mycobactérie avec le réactif Inno-Lipa)
- Epidémiologie: détection de gènes de résistance ou de virulence.



# LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

## ⊙ Avantages :

- Gain de sensibilité
- Gain de spécificité
- Gain de temps dans certains cas

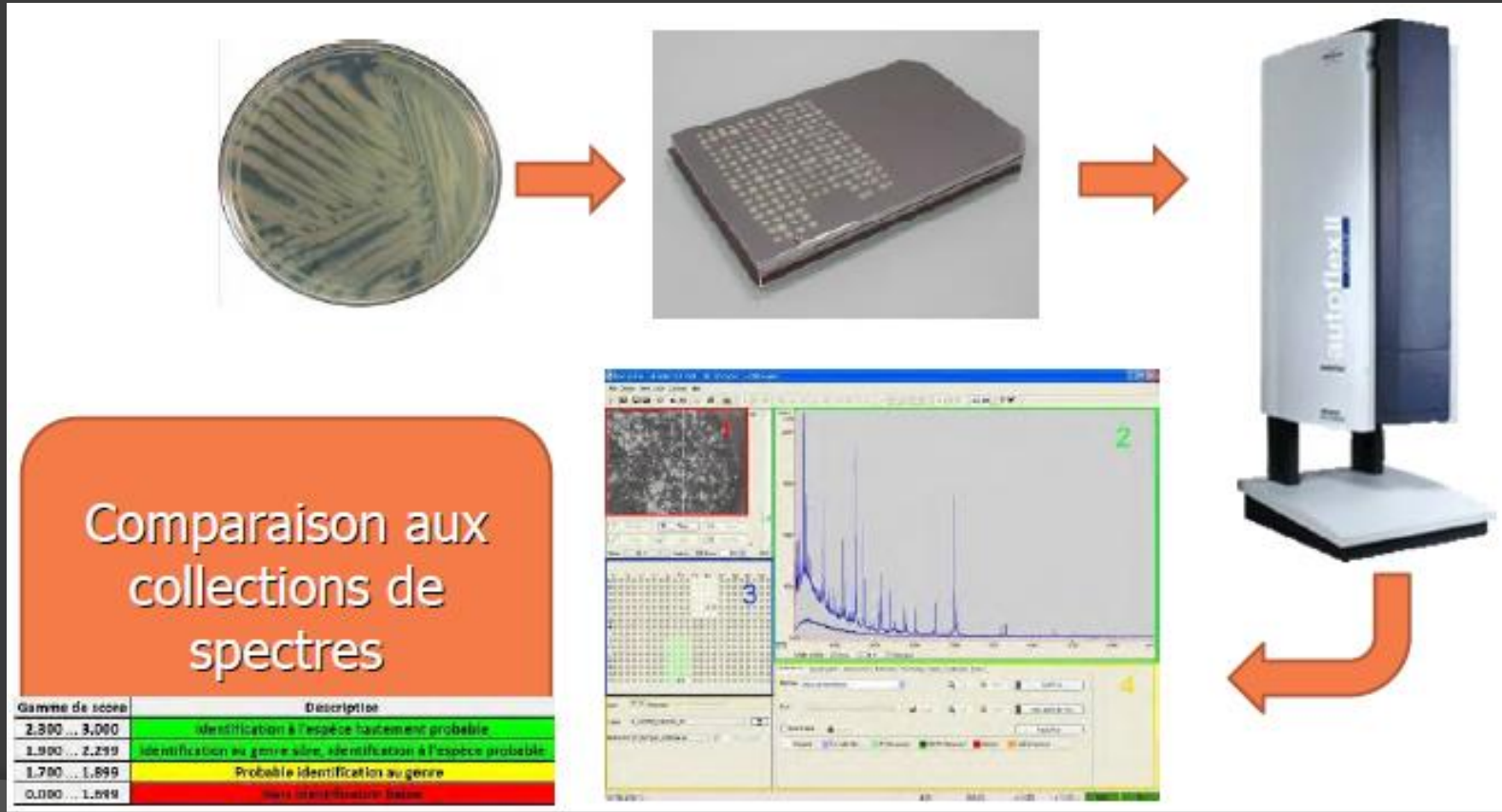
## ⊙ Inconvénients :

- Centre spécialisé
- Coût
- Main d'œuvre qualifiée
- Délai de réalisation
- Attention aux résultats négatifs (Myo LCR).



# SPECTROMÉTRIE DE MASSE

- Technique d'ionisation douce
- Permet l'analyse de la composition de biomolécules (peptides, protéines, sucres, polymères...)



# SPECTROMÉTRIE DE MASSE

- peut remplacer rapidement l'identification phénotypique en routine ( rapide et économique)
- Efficace pour l'identification des bactéries d'hémocultures.
- Limites : richesse et fiabilité des banques.
- Perspectives: Autres échantillons comme les urines, le LCR

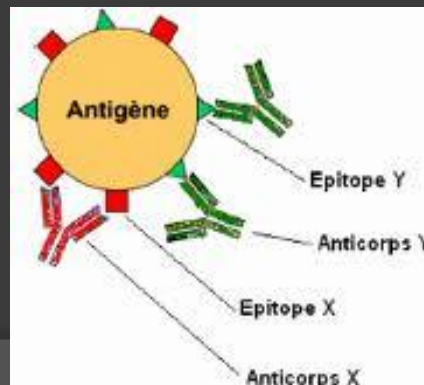
# DIAGNOSTIC INDIRECT : SÉROLOGIE

## ⦿ Le sérodiagnostic : Principe

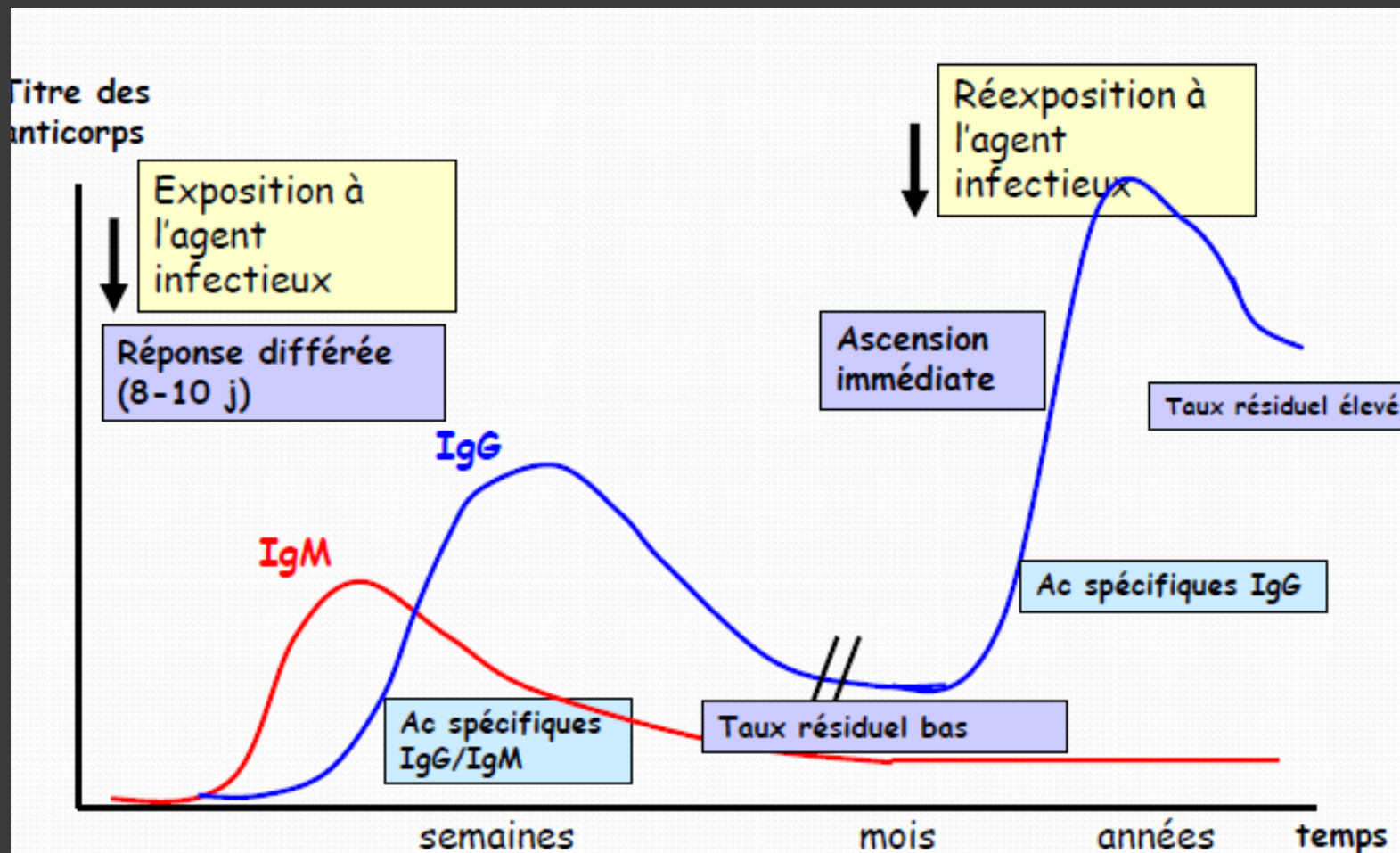
- Réaction de l'hôte contre des antigènes exprimés par les bactéries, virus, parasites.
- Entraîne production d'anticorps spécifiques.
- Réponse détectable après 8 à 10 jours.
- **spécificité** relative (réactions croisées) et **sensibilité** variable.

# DIAGNOSTIC INDIRECT : SÉROLOGIE

- Confirmer résultat dans un délai de quinze jours.
- Intérêts limités en bactériologie, plus utilisé en virologie et parasitologie :
  - Infection due à une bactérie à croissance difficile ou impossible
  - Diagnostic rétrospectif d'une infection récente
  - Études épidémiologiques : séroprévalence



# CINÉTIQUE DES ANTICORPS

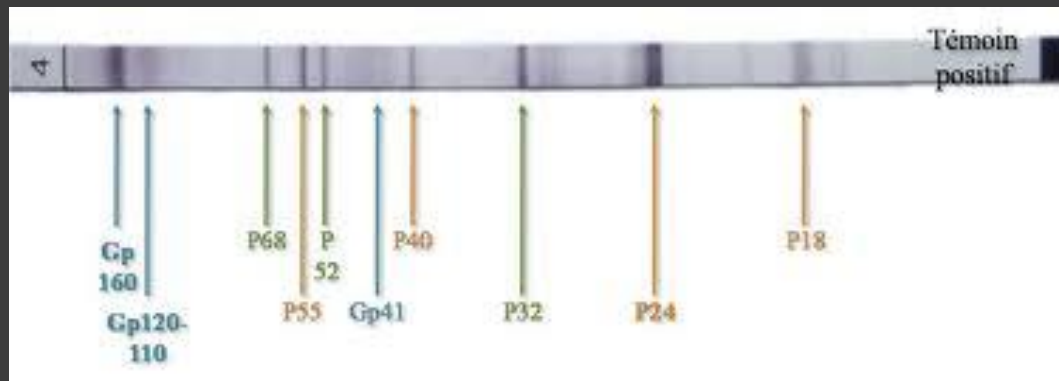


# SÉROLOGIES D'INTÉRÊT CLINIQUES

- ⊙ Bactéries responsables d'infections pulmonaires (germes intracellulaires non cultivables) :
  - *Chlamydiae pneumoniae*
  - *Mycoplasma pneumoniae*
- ⊙ Bactéries responsables d'infections génitales
  - *Treponema pallidum* (syphilis)
- ⊙ Bactéries responsables de maladies disséminées :
  - Brucellose
  - Maladie de Lyme
- ⊙ Exemple de sérologie parasitaire :
  - **Toxoplasmose : suivi femme enceinte +++**

# SÉROLOGIES VIRALES

- Seul élément avec la biologie moléculaire utilisable pour établir un diagnostic.
- Utilisation de techniques de confirmation par exemple : Western blot



- Notion d'avidité pour apprécier l'ancienneté des Ig G.
- Sérologies de diagnostiques :
  - HIV (couplée avec un Ag p24), Hépatites, Herpes viridae, rubéole (femme enceinte)...

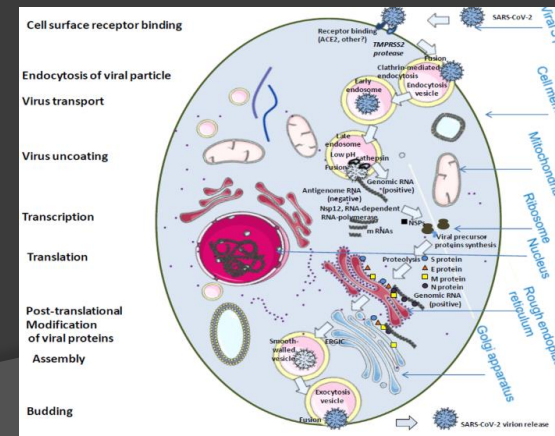
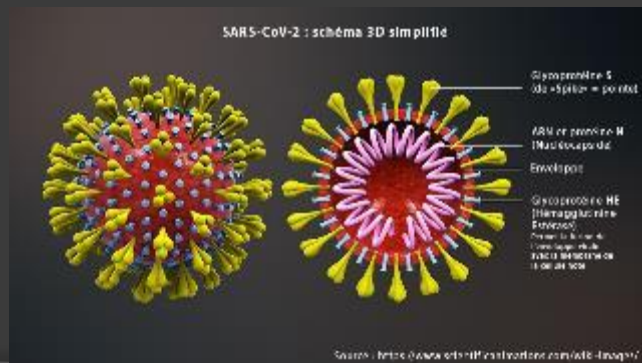


# Conclusion

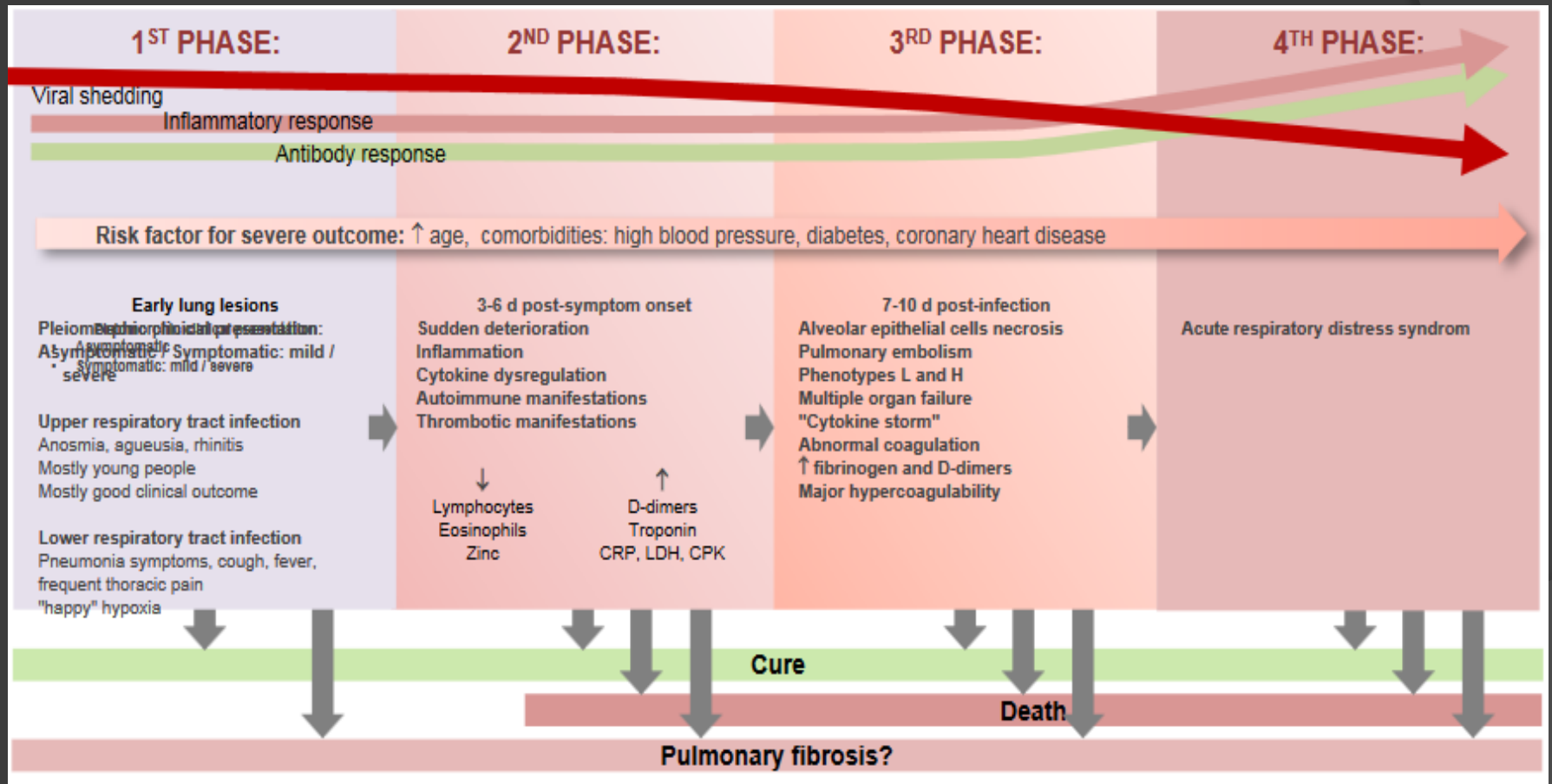
- ⦿ Le but : orienter le plus rapidement possible sur l'agent infectieux responsable :
  - Examen direct
  - Culture
  - Biologie moléculaire, spectrométrie...
- ⦿ Importance de la qualité des prélèvements et des renseignements
- ⦿ Faisceau d'arguments clinico-biologiques.

# Cas COVID19

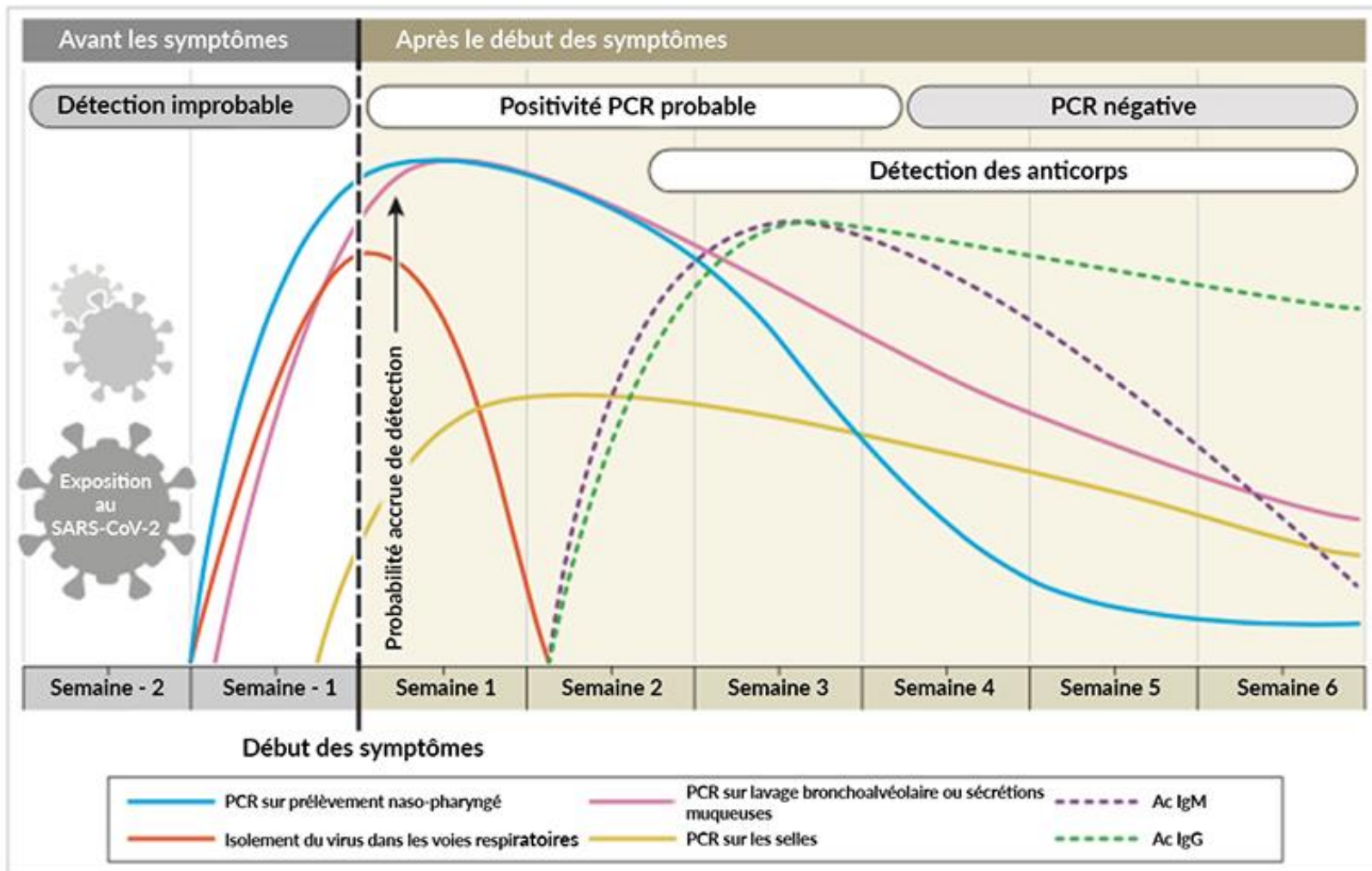
- Virus émergent
- Difficulté à diagnostiquer en début d'épidémie, absence d'outils diagnostiques à grande échelle.
- Développement méthode diagnostic rapide



# Histoire de la maladie COVID19



# Marqueurs COVID19



# Quels moyens diagnostic?

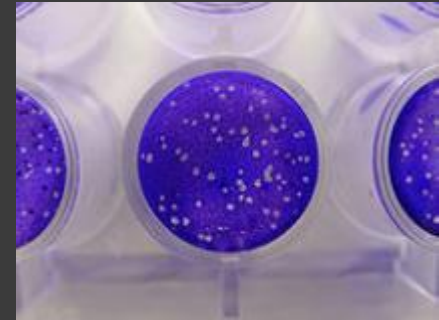
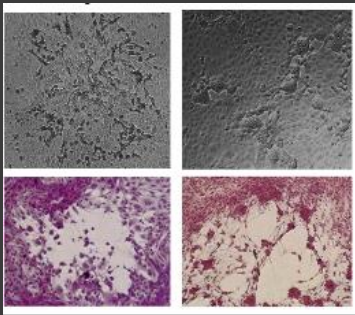
- ⦿ Diagnostic direct: culture virale, recherche d'ARN viral, test antigénique.
- ⦿ Diagnostique indirect: Sérologie
- ⦿ Chronologie des tests:
  - Culture virale
  - Séquençage du génome
  - RT-PCR cible du génome spécifique du virus
  - Sérologie
  - Test antigénique

# Identification agent infectieux

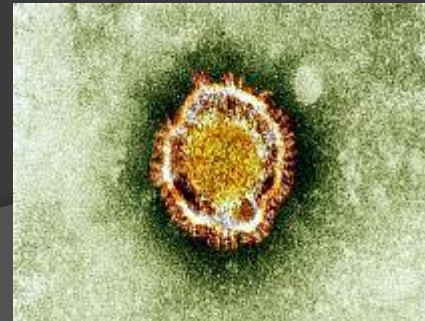
- Autopsie, prélèvement.

- Culture cellulaire

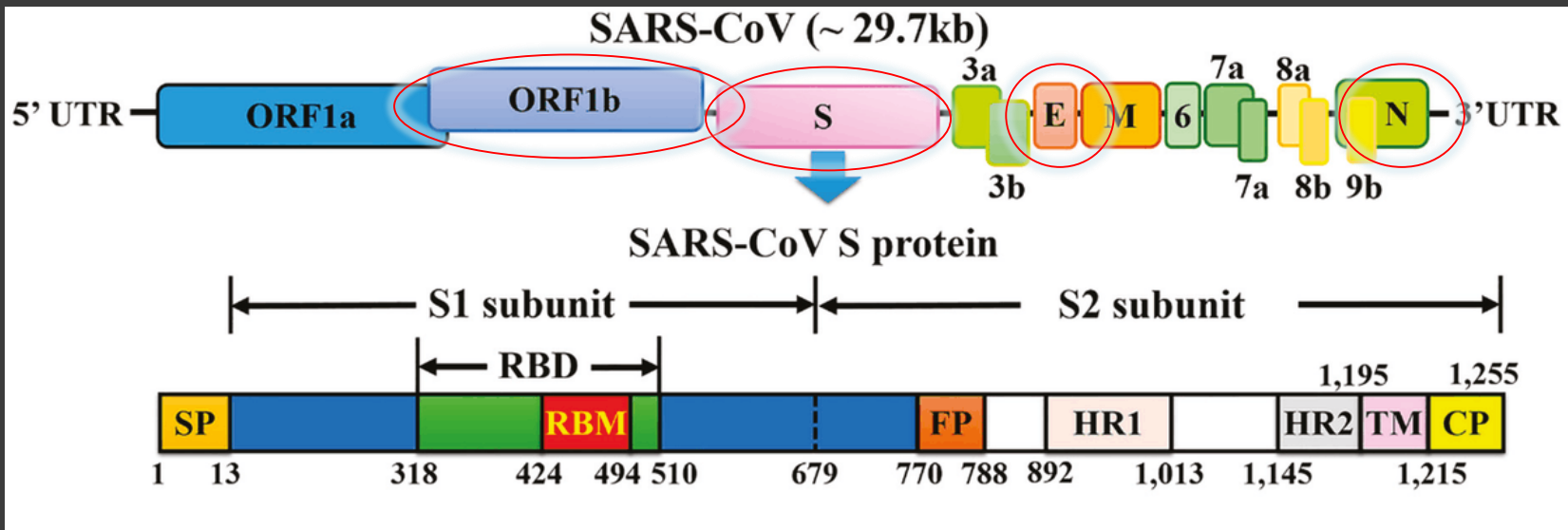
- Microscope optique



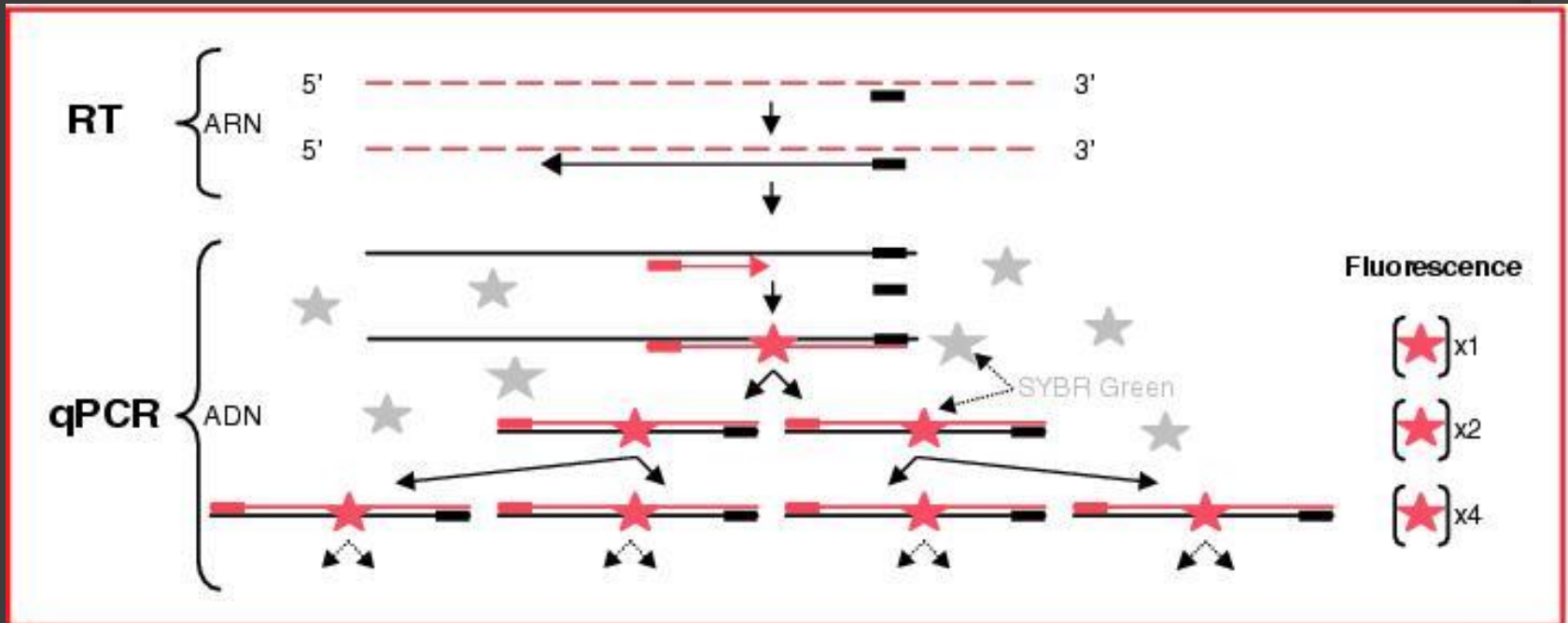
- Microscope électronique



# Séquençage du génome

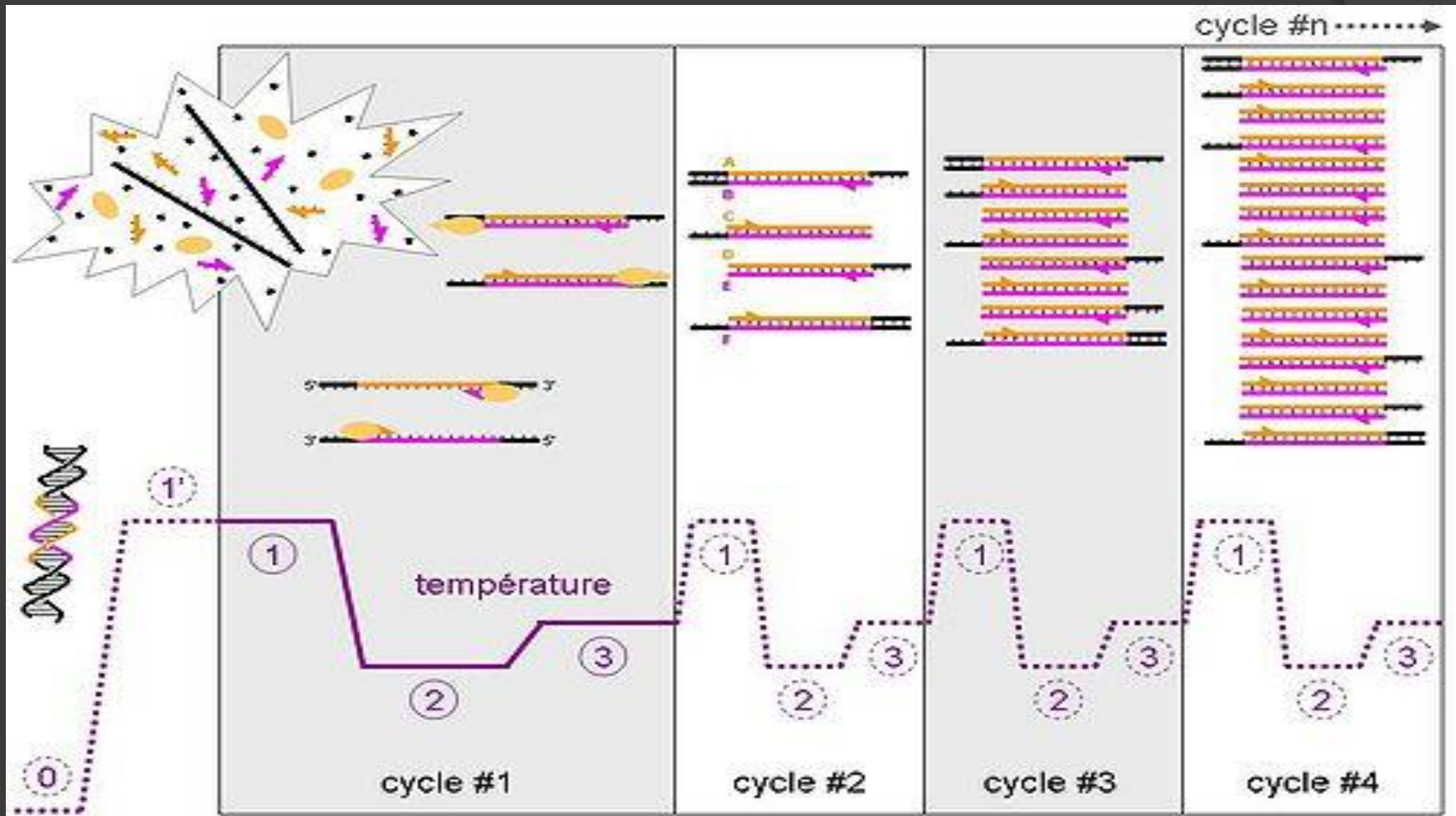


# RT-PCR



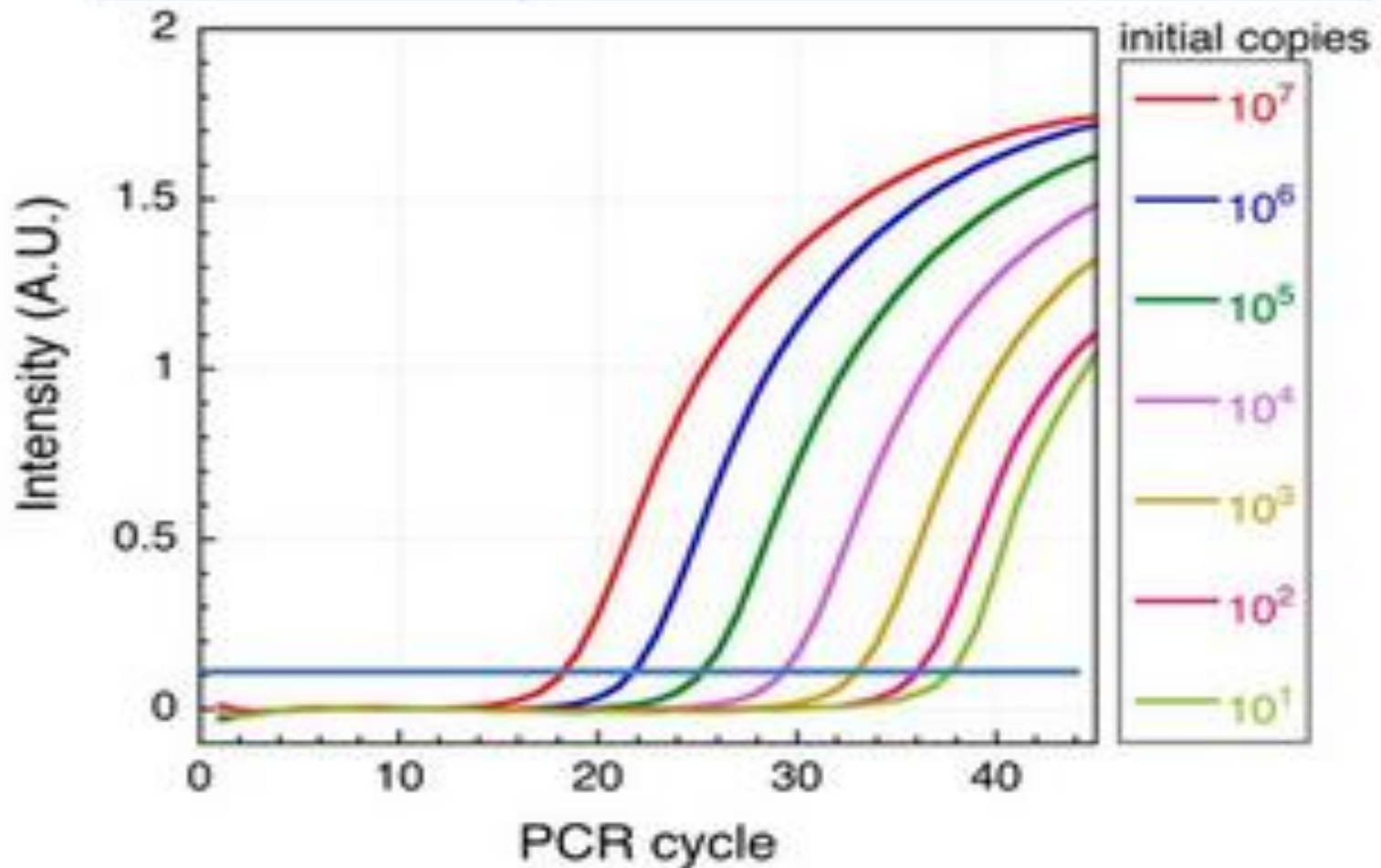


# RT-PCR

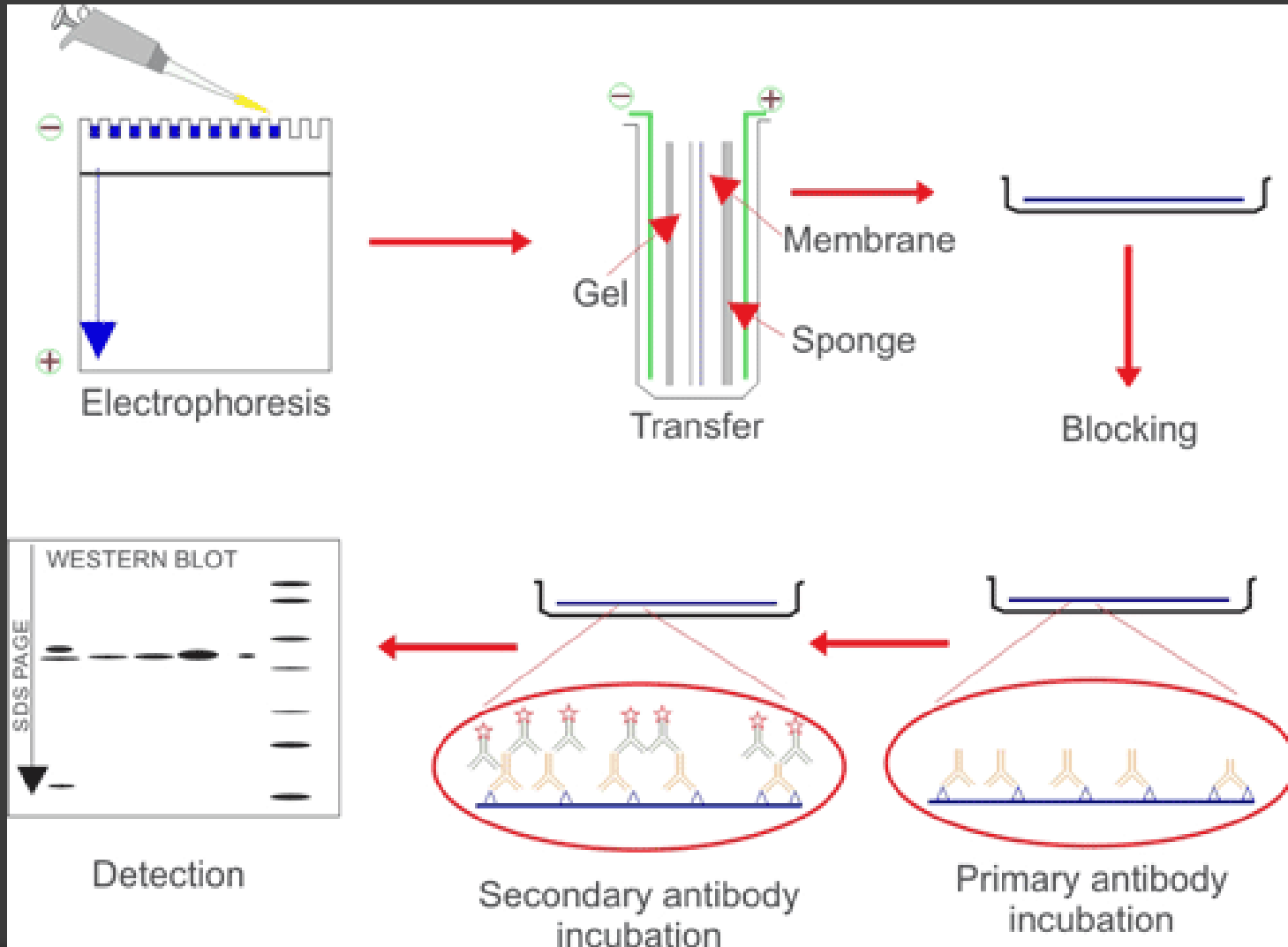


# RT-PCR

## Résultats de qPCR sur différents étalons

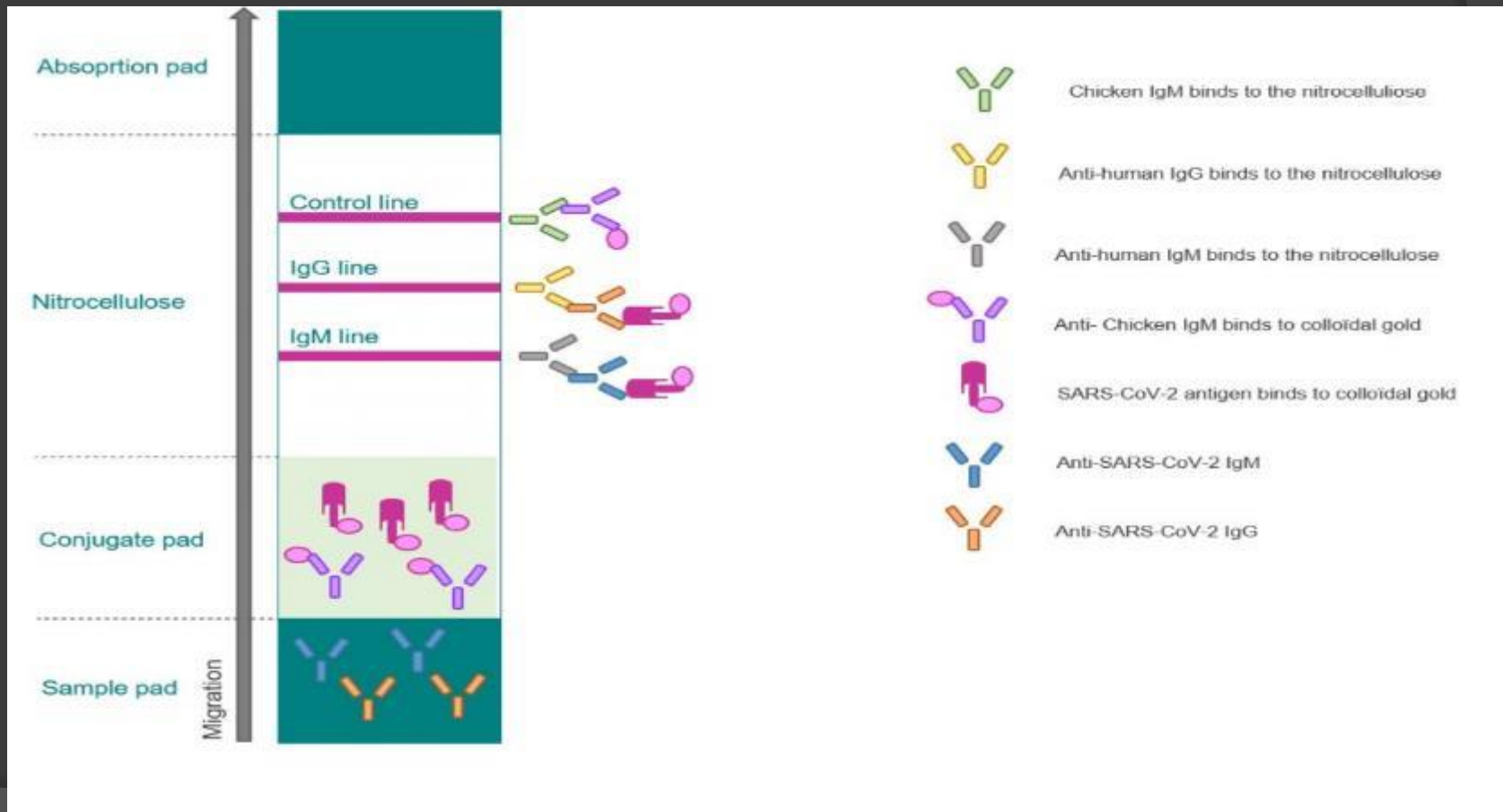


# Développement test sérologique



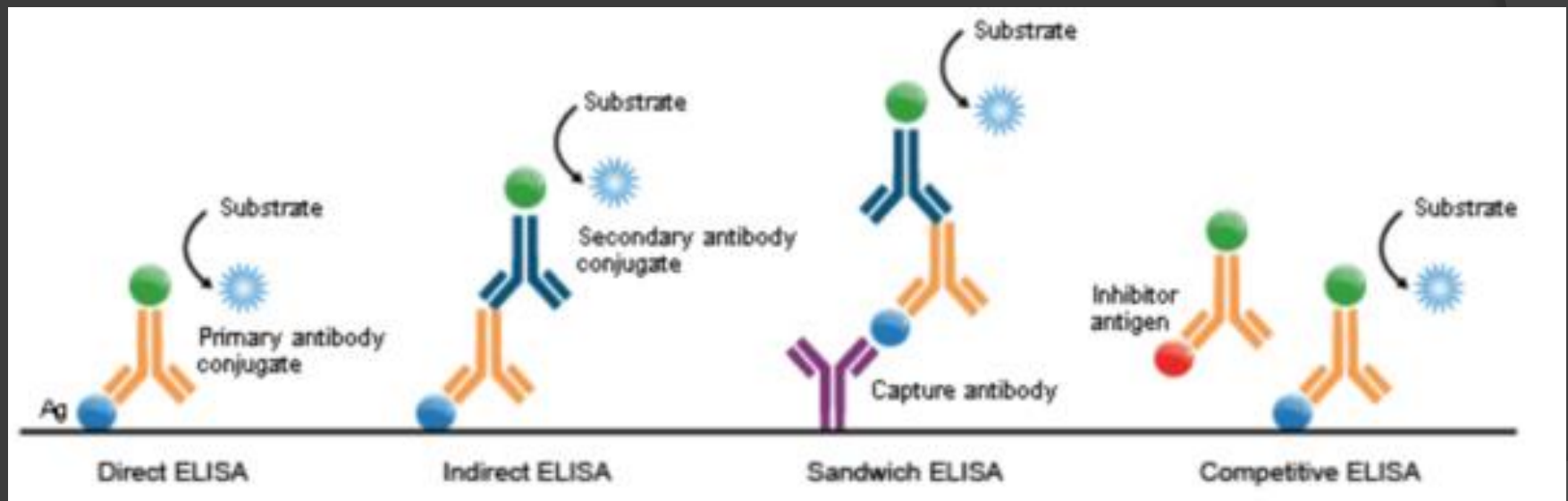
# Test Sérologique

- Test immunochromatographique (bandelette)  
Technique moins sensible



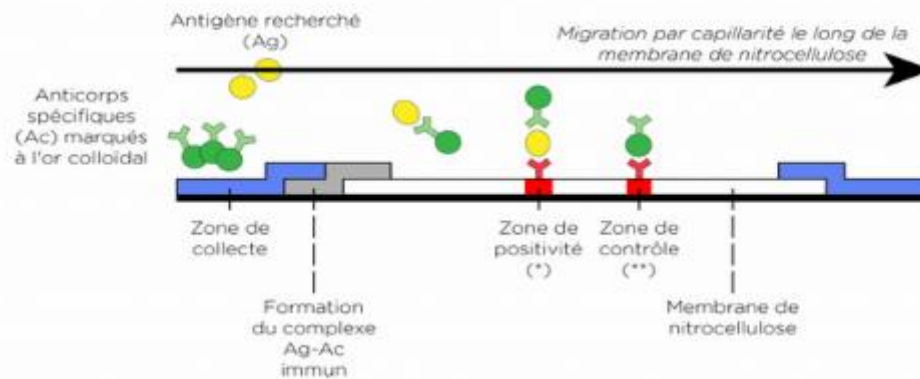
# Test Sérologique

- ELISA: technique plus sensible



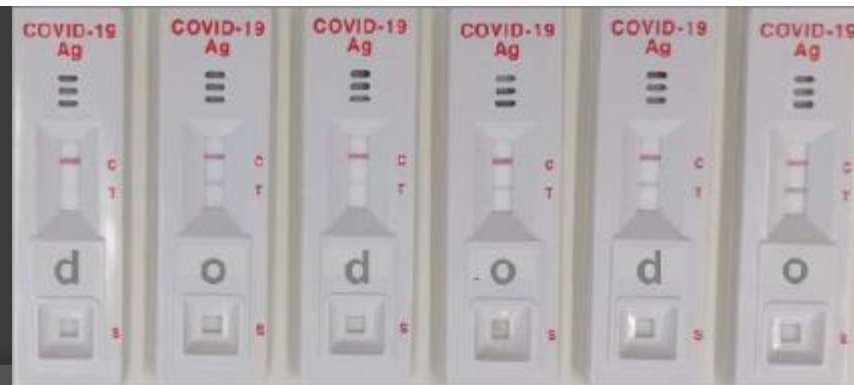
# Test antigénique

## Représentation schématique d'un test d'immunochromatographie



(\*) Capture du complexe Ag-Ac par un 2ème Ac spécifique et formation d'une première ligne rouge

(\*\*) Capture de l'excédent d'Ac marqués à l'or colloïdal et formation d'une seconde ligne rouge



# Fiabilité test antigénique?

ABBOTT												
	Spécificité				Sensibilité				VPP		VPN	
	N témoins	Témoins négatifs	IC 95%		N cas	% Cas positifs	IC 95%		Prévalence 1%	Prévalence 5%	Prévalence 1%	Prévalence 5%
<b>Global</b>	337	100,0%	98,9%	100,0%	295	55,3%	49,4%	61,0%	100,0%	100,0%	99,6%	97,7%
<b>Délai d'apparition des symptômes</b>												
					97	79,4%	70,0%	86,9%	100,0%	100,0%	99,8%	98,9%
					103	52,4%	42,4%	62,4%	100,0%	100,0%	99,5%	97,6%
					63	33,3%	22,0%	46,3%	100,0%	100,0%	99,3%	96,6%
					24	37,5%	18,8%	59,4%	100,0%	100,0%	99,4%	96,8%
					200	65,5%	58,5%	72,1%	100,0%	100,0%	99,7%	98,2%
<b>Ct value</b>												
<b>Par sous-groupes</b>	Ct ≤20				40	95,0%	83,1%	99,4%	100,0%	100,0%	99,9%	99,7%
	Ct ]20-25]				90	83,3%	74,0%	90,4%	100,0%	100,0%	99,8%	99,1%
	Ct ]25-30]				73	57,5%	45,4%	69,0%	100,0%	100,0%	99,6%	97,8%
	Ct >30				88	8,0%	3,3%	15,7%	100,0%	100,0%	99,1%	95,4%
	Ct ≤33				245	65,7%	59,4%	71,6%	100,0%	100,0%	99,7%	98,2%
	Ct ≤25				130	86,9%	79,9%	92,2%	100,0%	100,0%	99,9%	99,3%
	Ct ≤23				96	94,8%	88,3%	98,3%	100,0%	100,0%	99,9%	99,7%
	<b>Sévérité</b>											
					202	58,4%	51,3%	65,3%	100,0%	100,0%	99,6%	97,9%
					92	47,8%	37,3%	58,5%	100,0%	100,0%	99,5%	97,3%