



# Que deviennent vos prélèvements microbiologiques ?

Gericco 2012  
Anne Cady  
Laboratoire CHBA, Vannes  
[anne.cady@ch-bretagne-atlantique.fr](mailto:anne.cady@ch-bretagne-atlantique.fr)

# Pourquoi faire des prélèvements microbiologiques?

## Diagnostic microbiologique d'une infection

- identification précise de l'agent causal
- étude de la sensibilité aux anti-infectieux.

## Diagnostic direct :

Mise en évidence de l'agent infectieux (bactérie, virus, parasite)

## Diagnostic indirect :

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



diagnostic sérologique

# Diagnostic direct

## Importance des renseignements cliniques +++

Conditionnent certaines recherches :

- **milieux ou techniques spécifiques** pour certaines bactéries de croissance difficile ou lente  
ex: mycobactéries, légionelles, Nocardia, mycoplasmes, bartonelles...
- **incubation prolongée**
  - prélèvements ostéo-articulaires
  - hémocultures dans contexte d'endocardite

# Diagnostic direct

## Importance de la qualité du prélèvement+++

Pour s'affranchir au maximum des contaminations par les flores saprophytes

**Peu de pathogènes spécifiques** (ex : *Mycobacterium tuberculosis*), beaucoup de bactéries commensales, potentiellement pathogènes

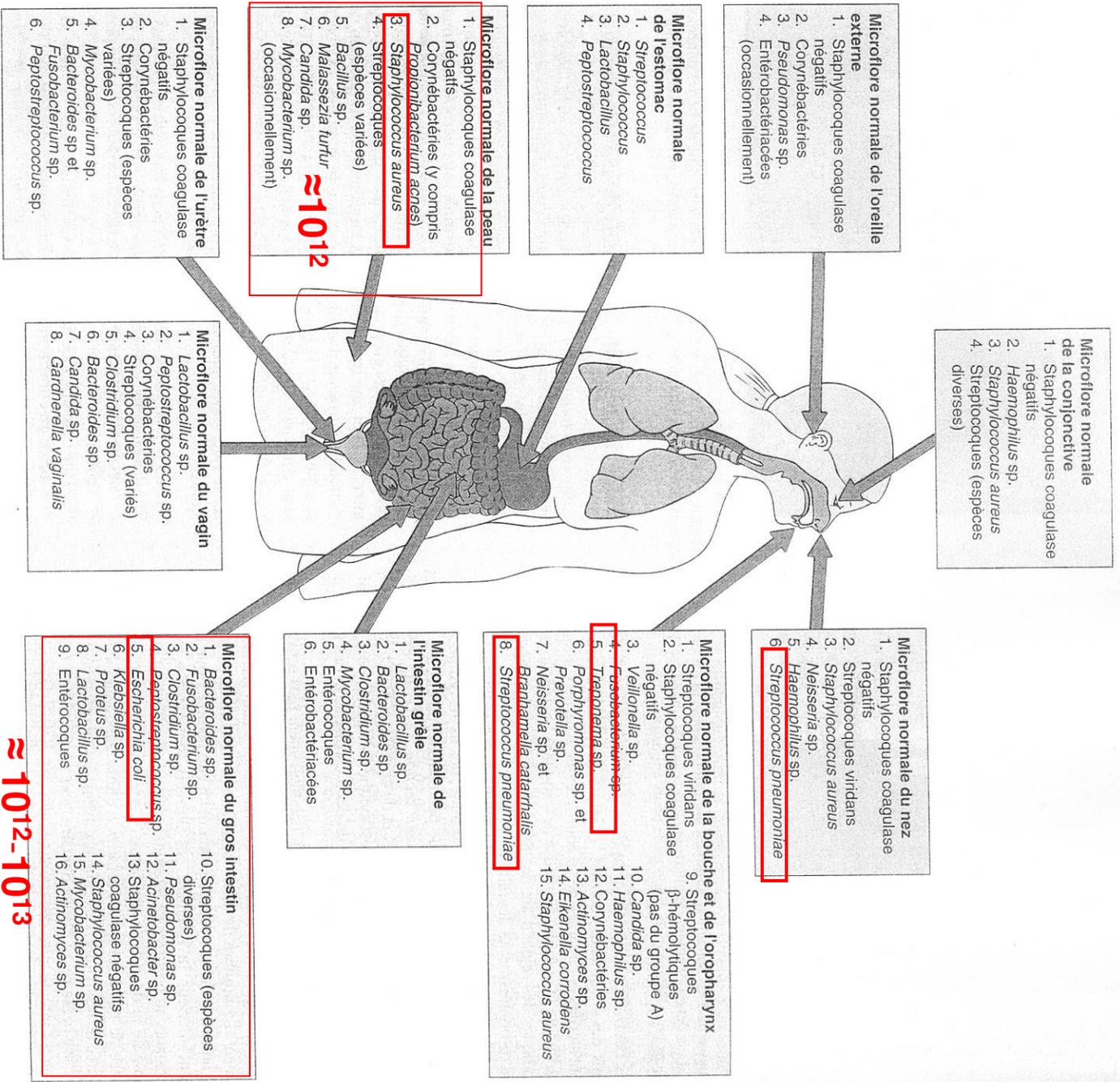
Organisme humain  $\approx 10^{13}$  cellules eucaryotes

Flore de la peau, des muqueuses et du tube digestif  $\approx 10^{14}$  cellules bactériennes

## Établir la significativité de la présence d'une bactérie :

- Facile pour un site stérile (sang, LCR...)
- Difficile pour un site contaminé (gorge, respiratoire...)
- Nombreuses situations intermédiaires

# Flores commensales



# Diagnostic direct

## 1- l'examen macroscopique du prélèvement :

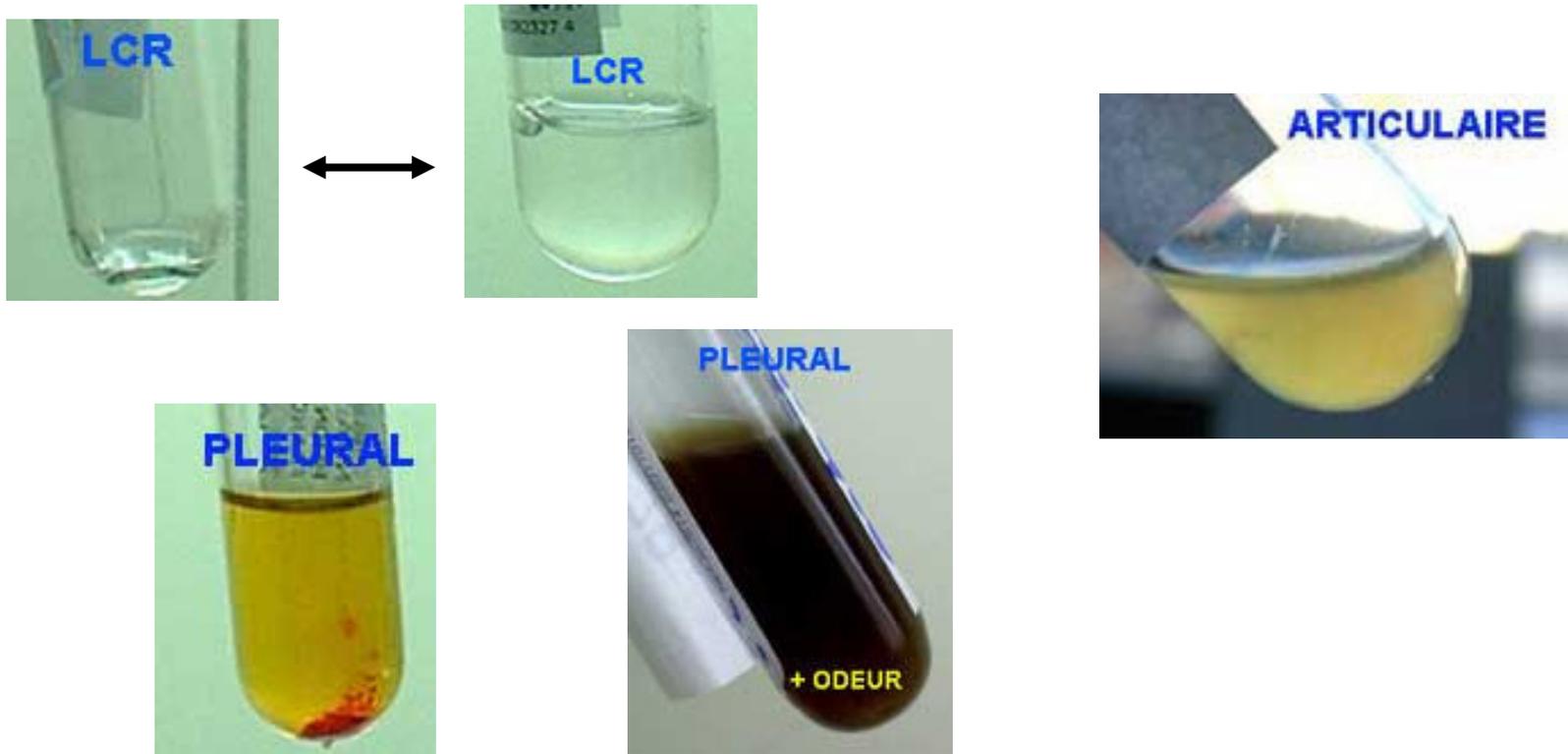
la présence d'un **trouble**, l'**odeur** (particulièrement pour les anaérobies), la **consistance**, la présence de végétations, de **granulations**... peuvent apporter des premières informations sur l'existence d'une infection ou non.



# Diagnostic direct : examen macroscopique

## 1- l'examen macroscopique du prélèvement :

la présence d'un **trouble**, l'**odeur** (particulièrement pour les anaérobies), la **consistance**, la présence de végétations, de **granulations**... peuvent apporter des premières informations sur l'existence d'une infection ou non.



# Examen direct : examen microscopique

## 2- l'examen microscopique du prélèvement :

Réalisé le jour-même

Dans tous les cas, la sensibilité de la détection de l'examen microscopique sera limitée par la quantité de micro-organismes présents dans le prélèvement ( $\approx 10^3 - 10^5$  / ml).

### **Etat frais :**

Etalé entre lame et lamelle d'une goutte du prélèvement  
Permet de visualiser la présence éventuelle de bactéries et leur mobilité

### **Etat frais avec encre de Chine**

Visualisation des cryptocoques  
et de leur capsule



# Examen direct : examen microscopique

2- l'examen microscopique du prélèvement :

## **Numération cytologique (hématies, leucocytes)**

Dans des cellules calibrées

La présence ou non de leucocytes  
permet d'orienter le diagnostic



# Examen direct après coloration

## Examen après coloration

### Coloration de Gram : coloration de la paroi bactérienne

#### Etapes

Gram +

Gram -

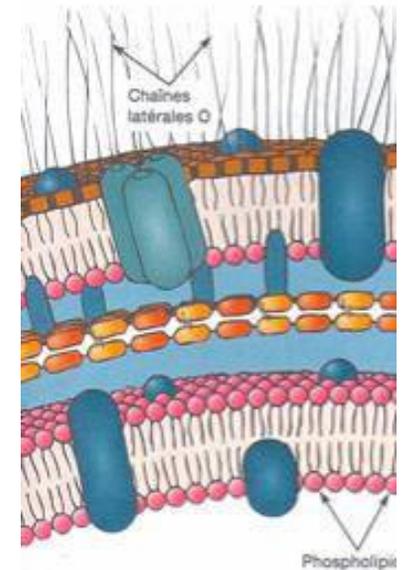
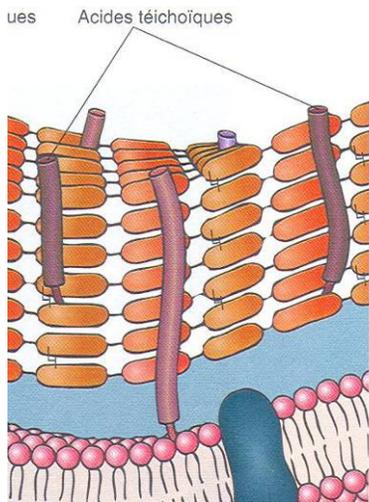
FIXATION

Violet de gentiane

LUGOL

DECOLORATION

Fuchsine

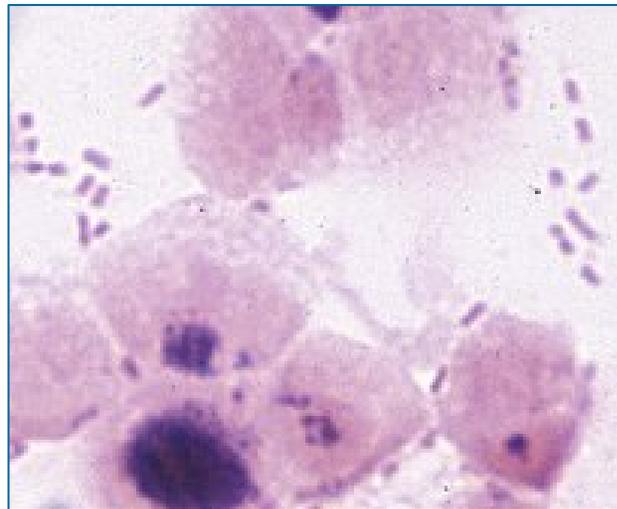


Donne une orientation sur le type de bactérie en fonction de sa couleur (Gram+/-) et de sa forme (coque, bacille)

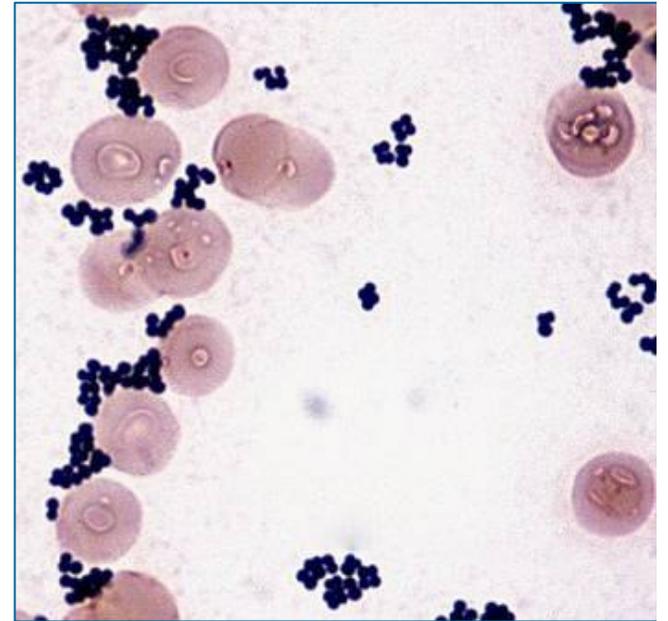
# Coloration de Gram



Cocci à Gram négatif  
(méningocoque)  
dans un LCR



Bacilles à Gram négatif  
dans une urine



Cocci à Gram positif  
(staphylocoque)  
dans un liquide pleural

# Examen direct après coloration

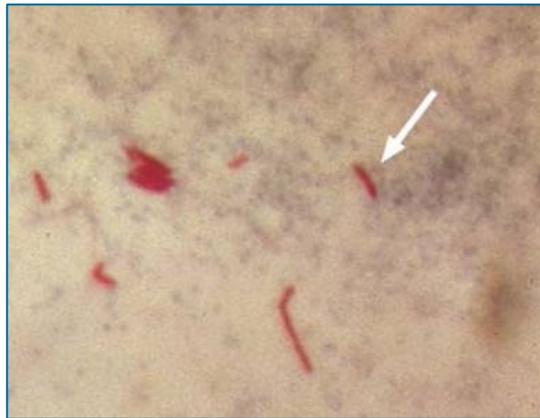
Coloration particulières

**Auramine** : coloration de la paroi  
des mycobactéries



**Ziehl-Neelsen**

pour les bacilles acido-alcool-résistants (BAAR)  
≈ mycobactéries.



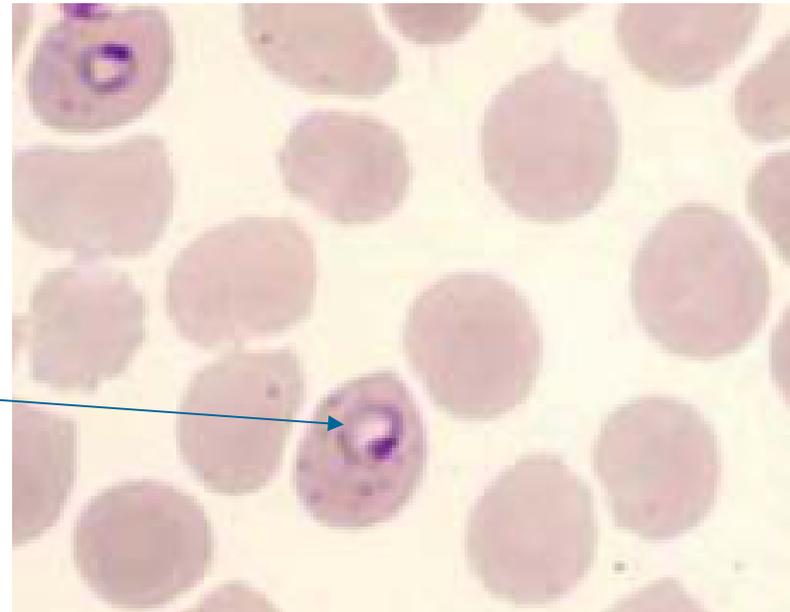
# Examen direct après coloration

Coloration particulières

## May-Grunwald-Giemsa (MGG)

recherche de paludisme

Hématie parasitée par  
*Plasmodium falciparum*



Frottis sanguin coloré au MGG

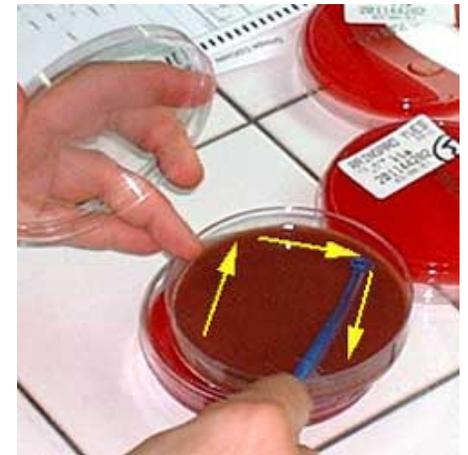
# Diagnostic direct : culture

Choix du **milieu de culture** en fonction du site anatomique du prélèvement :

flore, type d'infection, espèces pathogènes courantes

Utilisation de milieux sélectifs spécifiques de certaines bactéries (+/- antibiotiques, bile...)

ex: milieu au cétrimide pour *Pseudomonas aeruginosa*



Choix des **conditions d'incubation** :

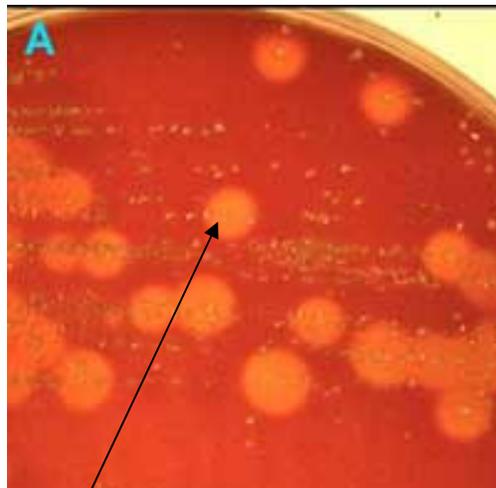
- aérobiose
- anaérobiose
- température (37°C pour les bactéries, 30°C pour la mycologie...)
- durée d'incubation adaptée (ex : mycobactéries, Nocardia...)

# Diagnostic direct : culture

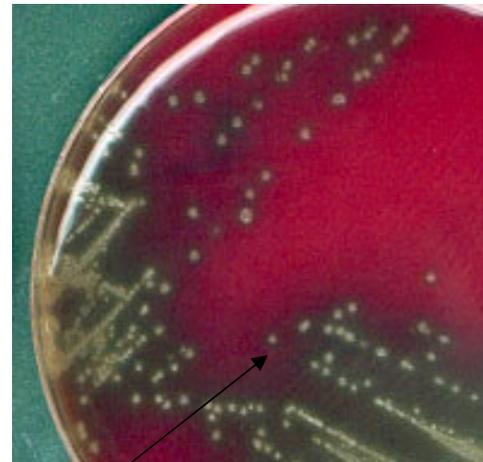
Aspect des colonies obtenues après incubation :

Intérêt +++ de la morphologie et des caractères biochimiques ou physiologiques observés

- aspect muqueux
- Hémolyse sur la gélose (streptocoque du groupe A)



Colonie  $\beta$ -hémolytique  
(hémolyse complète)



Colonie  $\alpha$ -hémolytique  
(hémolyse partielle)

# Diagnostic direct : culture

Aspect des colonies obtenues après incubation :

Intérêt +++ de la morphologie et des caractères biochimiques ou physiologiques observés

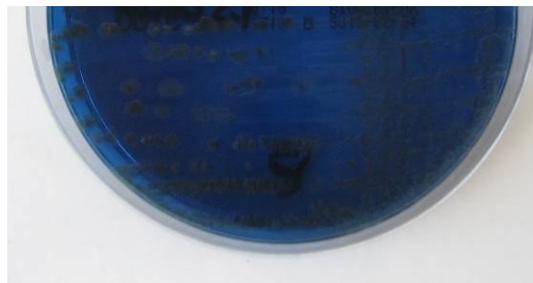
- Acidification du lactose ou autre sucre (Entérobactéries)



Gélose lactosée



Bactérie fermentant le lactose



Bactérie ne fermentant pas le lactose

# Diagnostic direct : culture

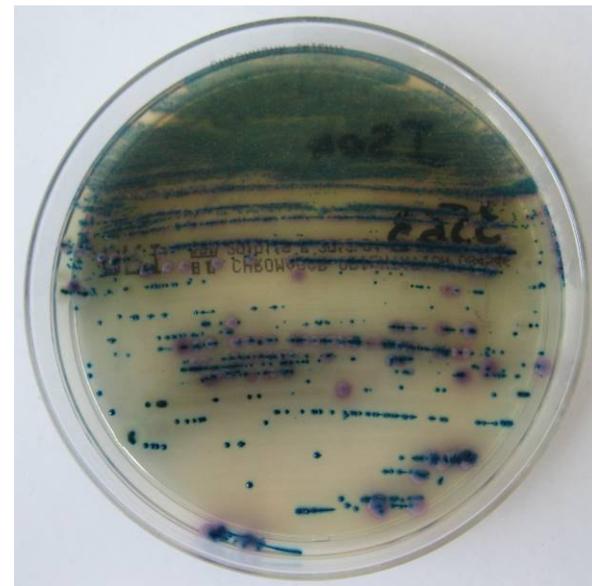
Aspect des colonies obtenues après incubation :

Intérêt +++ de la morphologie et des caractères biochimiques ou physiologiques observés

- Milieu chromogène: orientation rapide directement sur le milieu de culture



*E. coli* sur gélose chromogène pour urines



*E. coli* (rose), entérocoque (bleu) et *P. aeruginosa* (vert) sur gélose chromogène pour urines

# Bactériologie quantitative

- Risque infectieux associé à un seuil
- Sites infectés en liaison avec la peau ou une muqueuse
  - Colonisation des cathéters:
    - 15 Unités Formant Colonies pour technique selon Maki
    - 1000 UFC/ml pour Cleri-Brun Buisson
  - Infections urinaires:
    - Bactériurie à  $10^4$  /ml → infections basses aiguës, pyélonéphrites
    - $10^3$ /ml pour *E. coli* et *S. saprophyticus*
  - Infections pulmonaires:
    - Brossage distale protégé =  $10^3$ /ml de sécrétions
    - Lavage broncho-alvéolaire =  $10^4$  / ml
    - Expectorations =  $10^7$  /ml
- Bactériologie semi-quantitative:
  - Systématique pour suppurations profondes, lésions superficielles
  - Image de la flore obtenue en culture avec proportions des différentes espèces

# Diagnostic direct : identification

**Objectif:** donner le nom de genre et d'espèce de la bactérie en présence  
Réalisée sur une population bactérienne « pure » c'est-à-dire clonale

## Critères d'identification :

- Physiologiques
- Biochimiques
- Sensibilité/ résistance à ≠ inhibiteurs
- Structures de surfaces, protéines
- ...

## Nombreuses méthodes

- Traditionnelles
- Automatisées
- Moléculaires



Galerie d'identification pour BGN



Sensibilité du pneumocoque à l'optochine



Test d'identification rapide par agglutination

# Diagnostic direct : antibiogramme

Détermination de la sensibilité aux agents anti-infectieux  
- antibiogramme par diffusion en milieu gélosé



# Diagnostic direct : antibiogramme

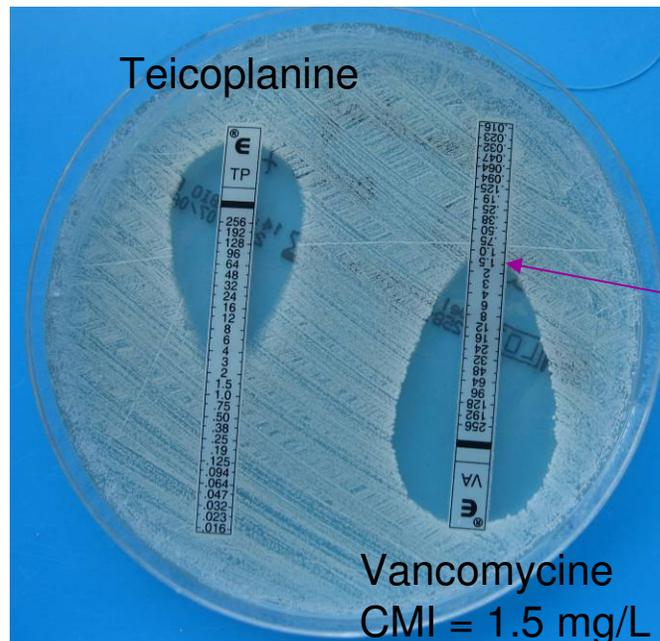
Détermination de la sensibilité aux agents anti-infectieux

- antibiogramme par diffusion en milieu gélosé
- antibiogramme en milieu liquide (automatisé ou non)

# Diagnostic direct : antibiogramme

## Détermination de la sensibilité aux agents anti-infectieux

- antibiogramme par diffusion en milieu gélosé
- antibiogramme en milieu liquide (automatisé ou non)
- détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en cas de besoin (technique E-test: bandelette imprégnée d'un gradient d'antibiotique)



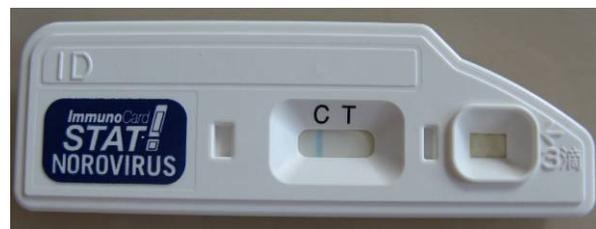
Lecture de la CMI à l'intersection de la zone d'inhibition

# Diagnostic direct : recherche rapide d'antigènes

- Antigènes saccharidiques relargués par les bactéries :
  - Solubles dans les liquides biologiques:
    - Sang, LCR, épanchement séreux
  - Se concentrant dans les urines

Avantage : rapidité

- Antigénurie
  - Légionelle
  - Pneumocoque
- Recherche de *Clostridium difficile*, Rotavirus, Adenovirus, VRS...



## Diagnostic direct : biologie moléculaire

Repose sur la **PCR** : réaction de polymérisation en chaîne

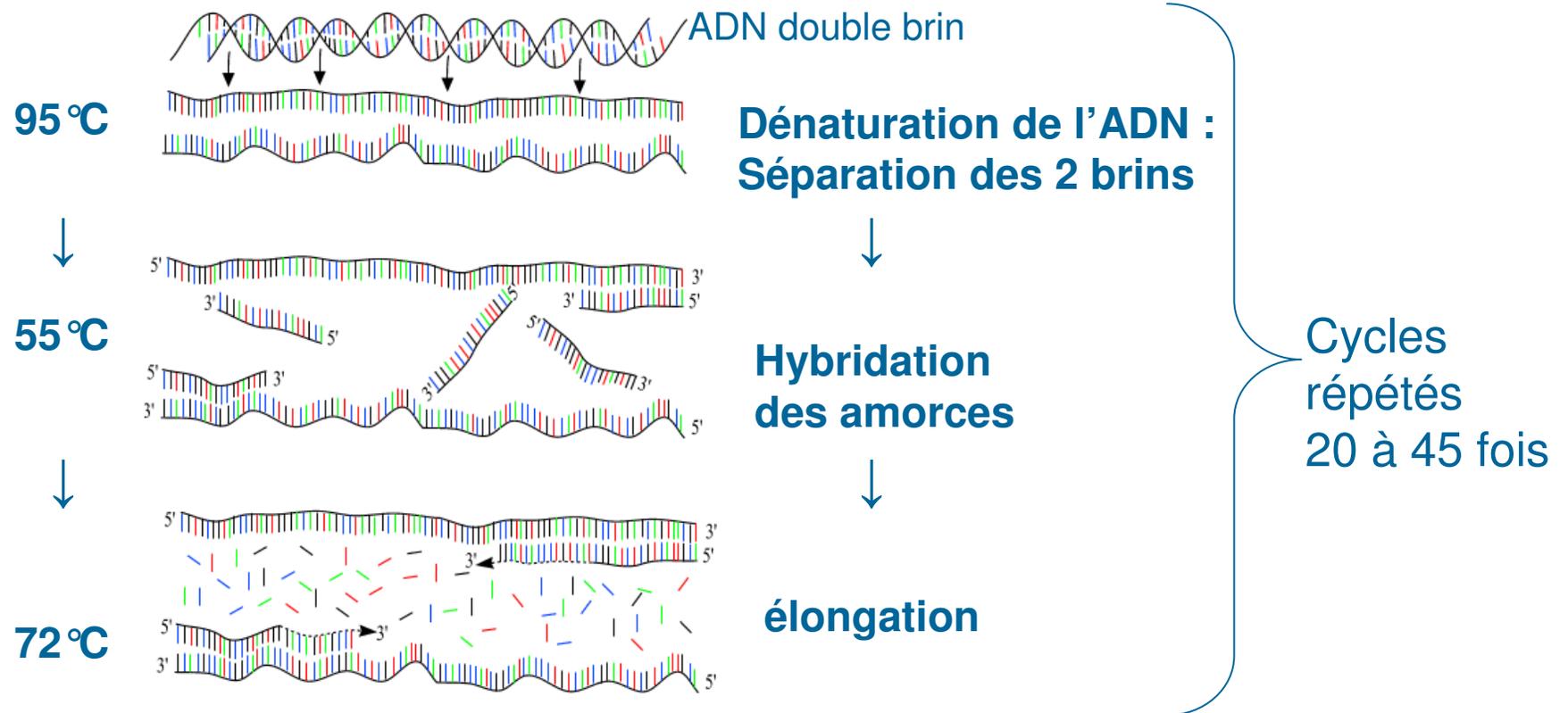
Après extraction de l'ADN

Amplification de régions de gène grâce à :

- des amorces spécifiques
- une enzyme capable de synthétiser le brin complémentaire d'ADN, la Taq polymérase

# Diagnostic direct : biologie moléculaire

Repose sur la **PCR** : réaction de polymérisation en chaîne



Cycles de la réaction de polymérisation en chaîne

# Diagnostic direct : biologie moléculaire

Repose sur la **PCR** : réaction de polymérisation en chaîne

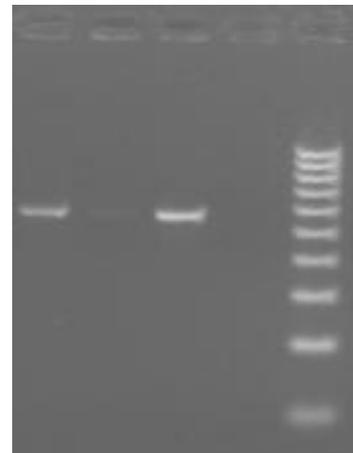
Réalisée dans un thermocycleur

Visualisation de l'amplification :

- à la fin de la réaction (PCR conventionnelle)  
(avec un agent intercalant visible sous UV)



Visualisation



# Diagnostic direct : biologie moléculaire

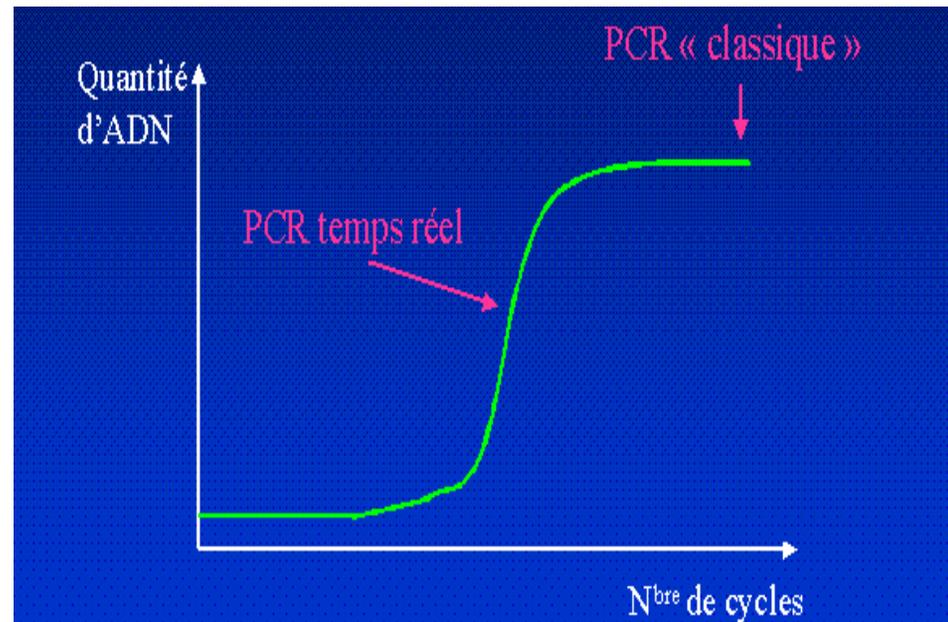
Repose sur la **PCR** : réaction de polymérisation en chaîne

Réalisée dans un thermocycleur

Visualisation de l'amplification :

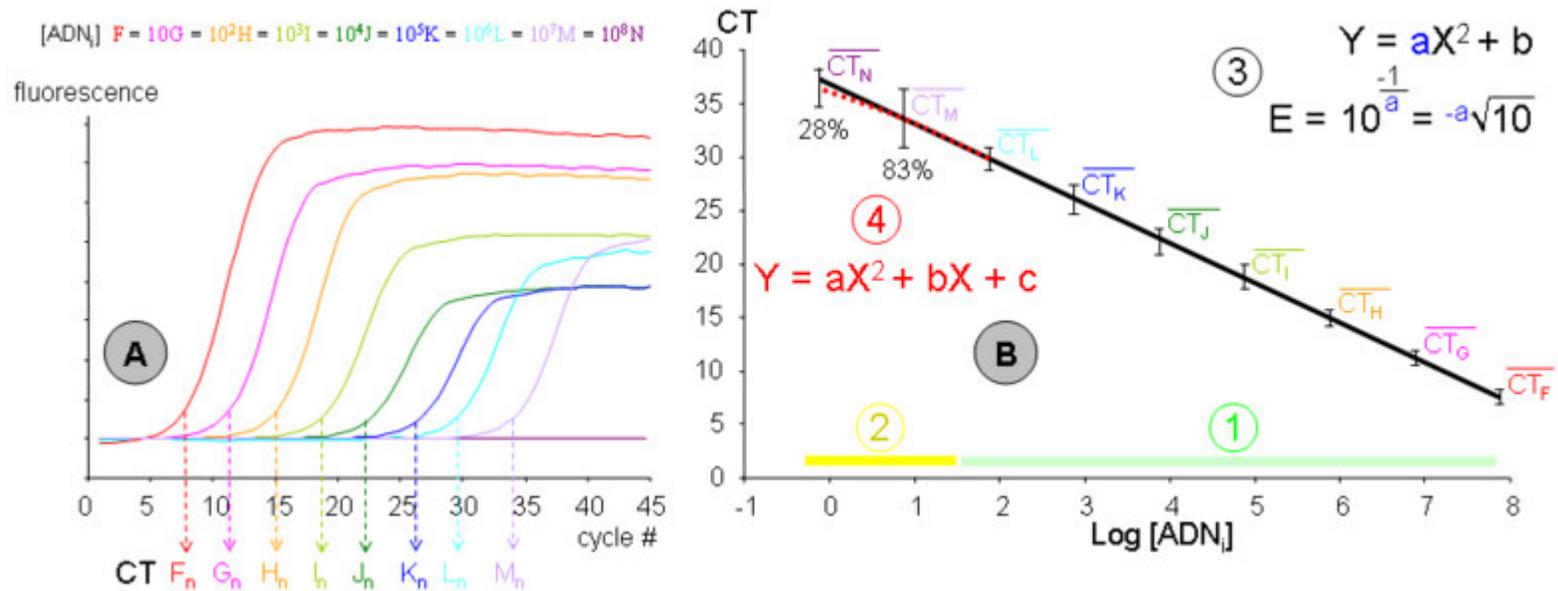
- à la fin de la réaction (PCR conventionnelle)

Ou - au fur et à mesure : PCR en temps réel  
(sondes marquées avec des fluorophores)



# PCR en temps réel

- Possibilité de comparaison de la quantité d'ADN contenue dans des échantillons différents
- Plus la concentration en ADN est importante, plus le signal apparaît vite
- Rapidité +++ par rapport à la PCR classique (1h30-2h)
- Application = quantification de la cible dans un échantillon par comparaison à une gamme d'étalonnage (charge virale VIH, CMV...)



« vous savez quoi chercher »

## Les applications de la PCR spécifique en microbiologie

- Recherche d'une séquence nucléotidique spécifique d'un pathogène donné
- Intérêt +++ pour
  - Les bactéries non ou difficilement cultivables (*Chlamydia*, *Tropheryma whipplei*, *B. henselae*, *M. tuberculosis...*)
  - Les infections décapitées par un traitement antibiotique (la PCR détecte l'ADN bactérien)
  - Les virus

« vous savez quoi chercher »

## Les applications de la PCR spécifique en microbiologie

- Sensibilité +++
- Recherche orientée par la clinique
- Exemple des infections du SNC
  - Méningite purulente :
    - Pneumocoque, méningocoque
    - Entérovirus
  - Encéphalite :
    - Virus herpès
  - Méningoencéphalite :
    - Virus herpès
    - *Listeria*
- PCR classique et surtout PCR en temps réel

« vous ne savez pas quoi chercher »

## PCR «universelle» couplée à la détermination des séquences nucléotidiques

- Cible choisie pour l'amplification: molécules présentes chez toutes les espèces bactériennes → gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S (1 à 12 copies)
- Divergence faible de la composition de cette molécule au cours de l'évolution mais suffisante pour pouvoir identifier l'espèce (ou au moins le genre) à partir de sa séquence nucléotidique



 : régions conservées parmi les procaryotes

 : régions variables ou hypervariables (V1 à V9)



 : régions les plus discriminantes pour l'identification d'espèce

→ : amorces universelles

« vous ne savez pas quoi chercher »

## PCR «universelle» couplée à la détermination des séquences nucléotidiques

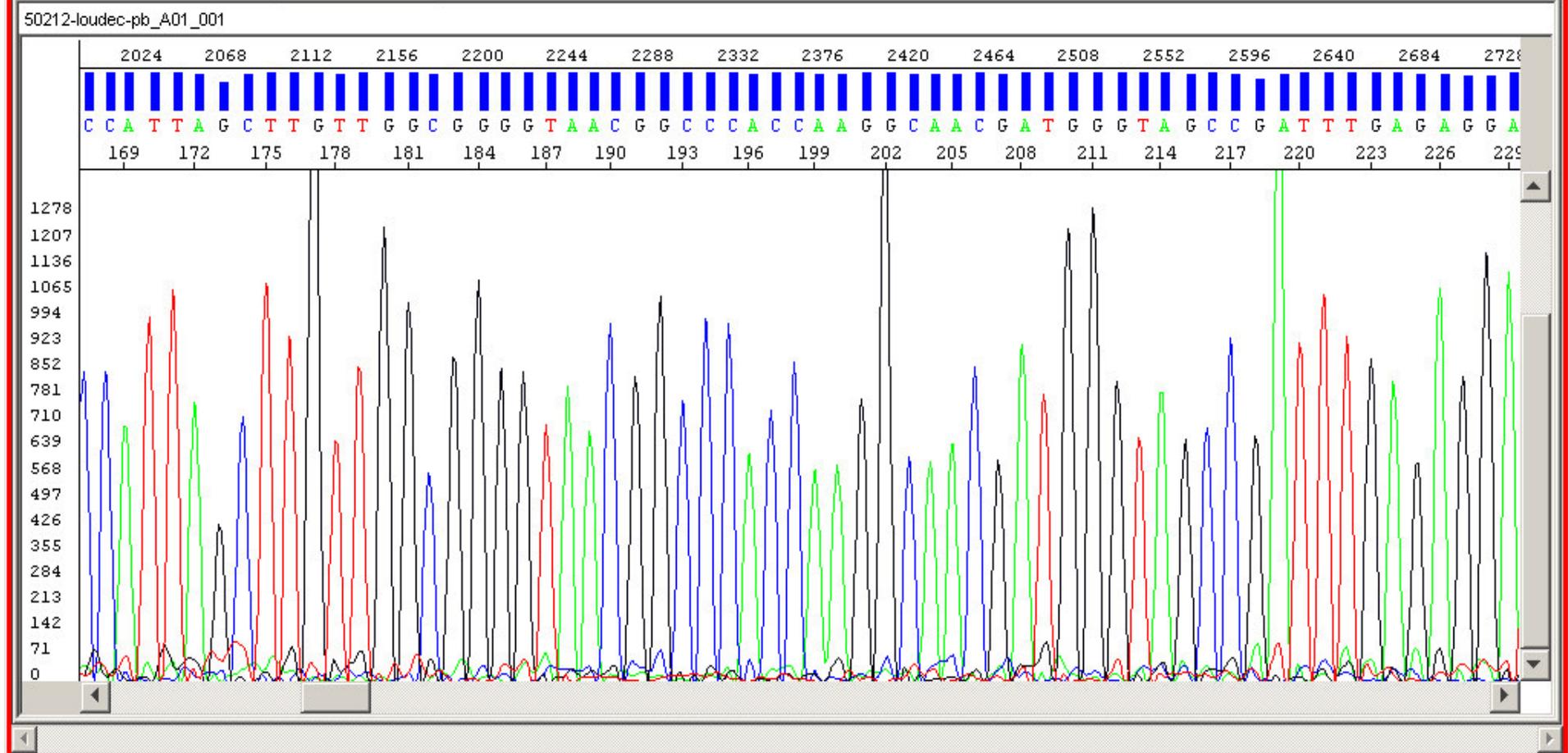
- Cible choisie pour l'amplification: molécules présentes chez toutes les espèces bactériennes → gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S (1 à 12 copies)
- Divergence faible de la composition de cette molécule au cours de l'évolution mais suffisante pour pouvoir identifier l'espèce (ou au moins le genre) à partir de sa séquence nucléotidique
- Apport +++ des progrès techniques en matière de séquençage rapide
- Méthode= PCR classique suivie d'un séquençage des produits amplifiés
- Limites : pas réalisable sur prélèvements plurimicrobiens



Sample Manager

Row	Show	Sample File Name	Sample Name	BC	PP	P	BaseCaller	DyeSet/Primer	Matrix File	Spacing	Peak 1	Start	Stop
11	<input type="checkbox"/>	50212-loudec-p13b_DU1_UU/	50212-loudec-p13b	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	KB.bcp	KB_3130_POP7_B...	None	U14.	1726	1751	16626
12	<input checked="" type="checkbox"/>	50212-loudec-pb_A01_001	50212-loudec-pb	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	KB.bcp	KB_3130_POP7_B...	None	014.	1736	1759	16626
13	<input type="checkbox"/>	50212-loudec-u14_C01_005	50212-loudec-u14	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	KB.bcp	KB_3130_POP7_B...	None	014.	1739	1762	16626
14	<input type="checkbox"/>	50212-loudec-u21_B01_003	50212-loudec-u21	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	KB.bcp	KB_3130_POP7_B...	None	014.	1732	1755	16626

Annotation Sequence Features Electropherogram Raw EPT Audit Electronic Signature





# le BIBI Bio Informatic Bacteria Identification

This is a Python rewritten apparently lightened version of BIBI, the software environment for sequence based identification of prokaryots (*Bacteria* and *Archaea*). The first version of this bacteria DNA sequence identification webtool was initially written by [Devulder et Al. 2003](#)

**BIBI light edition** uses now python *seqclass* (JP Flandrois) *tree* class (JP Flandrois and Emmanuelle Dantony 2005), Sequence colourist (Stéphane Vellay and JP Flandrois) parts of *T4Bi* (JP Flandrois 2005). The main developpers are now Jean-Pierre Flandrois (database analysis and general scripts) and Manolo Gouy (tree visualisation programs). This is version 0.2. *Please read the improvement section and important advices lower.*

Please send questions, comments, bugs signaling or ask for help by writing to [flandrs at biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:flandrs@biomserv.univ-lyon1.fr) [New How To](#)

## Sending an unknown sequence to BIBI

### Enter the QUERY sequence

*#!/ Fasta only (first line begins with >, other line(s) = sequence) !/*

```
> 44731
GGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCGGATACGCTCTGAATGAACTTTTAGGGG/
GCTGTCGTATGAGGATGAGTCCGCGTCCCATTAGCTGGTTGGCGGGGTAACGGCCCAC(
TCTGAGAGGATGATCGGCCACACTGGAAC TGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC(
ATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAA/
TGCGTGGTGCTAATCAGCCATGTATTGACGGTACCTTCAAAGGAAGCACCGGCTAACTC(
ACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCTGTTGTC
CGGCTCAACCGTGGAAC TGCCCTTGATACTGCATGACTTGAATCCGGGAGAGGGTGGCC
AATCCCTACATATCTCCAGCAGATCAGTCCCGAAGCCCGCCCGACCTCCAGCCCTATTC
```

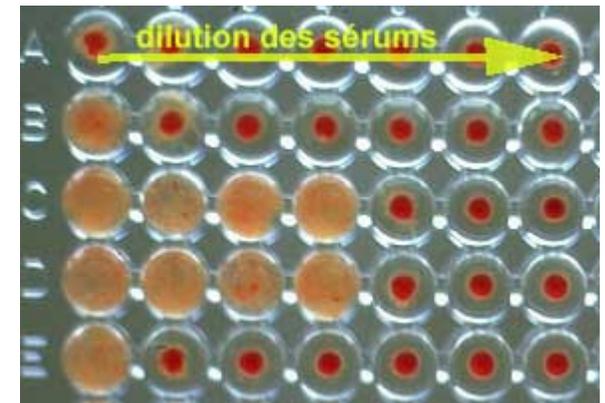
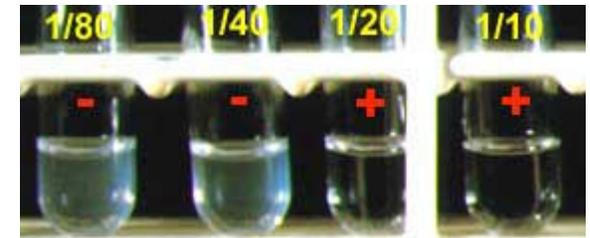
**Run BIBI now**



- Real branch lengths
  - Seq. name ext. nodes
  - Seq. name int. nodes
  - Species ext. nodes
  - Species int. nodes
  - EC ext. nodes
  - EC int. nodes
  - Branch length values
  - Bootstrap values
  - Duplic. vs. spec.
  - Display orthology
  - Display s-orthology
  - Color accord. to log L
  - log L values
  - Editable
- Click on Node to:
- Display/Edit information
  - Collapse/Uncollapse
  - Go to SWISS-PROT
  - Root/Reroot
  - Subtree/Parent tree
  - Swap children
- Zoom in X
- Zoom out X
- Zoom in Y
- Zoom out Y
- Show whole

# Diagnostic indirect : sérologie

- Recherche de la réponse anticorps de l'hôte vis-à-vis des antigènes bactériens
- Méthodes multiples : agglutination, hémolyse, immuno-enzymatique, immunofluorescence
- Analyse quantitative : titre
- Analyse qualitative : classe des IgG ou M
- Diagnostic rétrospectif
- Intérêt pour les bactéries non ou difficilement cultivables, les virus, les parasites.



# Exemple concret avec 2 prélèvements

Hémoculture



ECBU

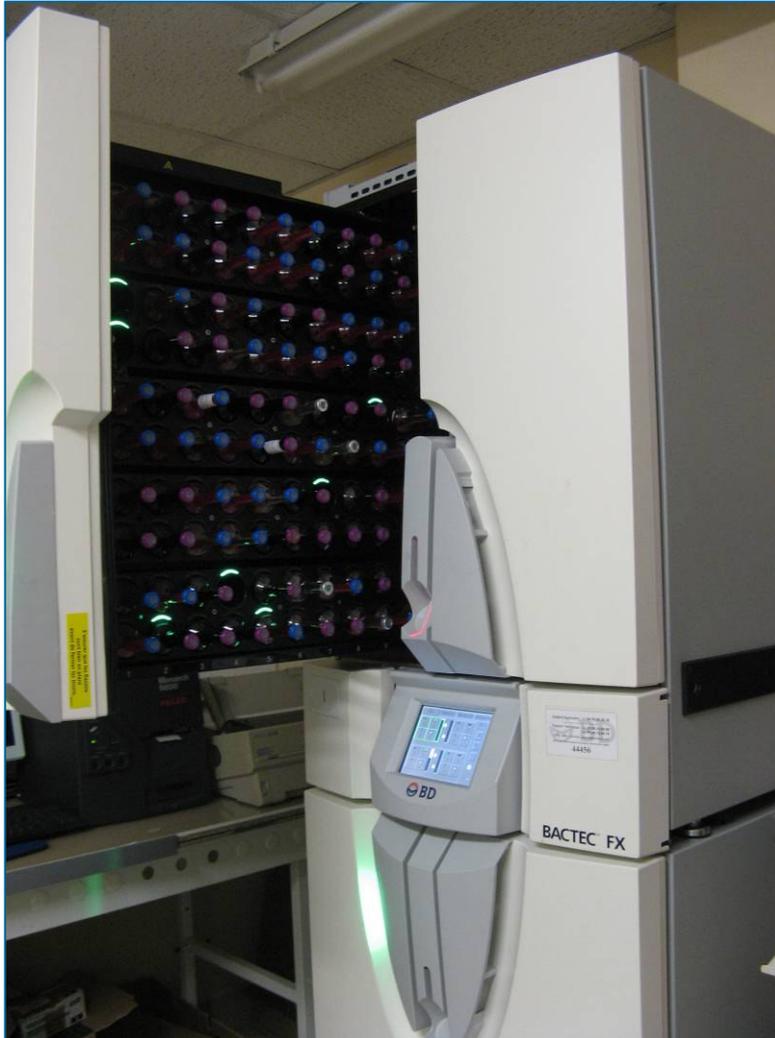


J0

## Hémoculture

J0

Incubation dans automate



Examen direct uniquement sur les flacons détectés positifs car qté de bactérie trop faible pour être visualisée

## ECBU

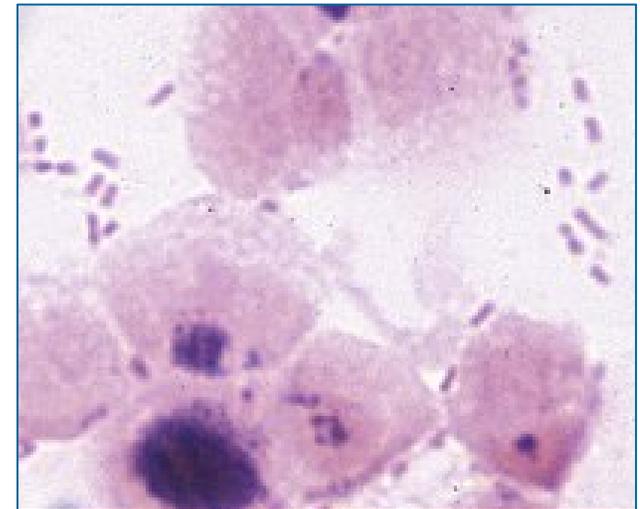
Examen direct

Cytologie:

$10^6$  leucocytes/mL

$<10^4$  hématies/mL

Coloration de Gram



Mise en culture

## Hémoculture

J0

Incubation dans automate

J1

Culture détectée positive  
- examen direct (Gram)



identification  
antibiogramme de BGN

## ECBU

Examen direct  
Mise en culture

## Hémoculture

J0

Incubation dans automate

J1

Culture détectée positive

- examen direct

→ identification  
antibiogramme

## ECBU

Examen direct

Mise en culture

Observation des cultures



- Identification : *E. coli*

- antibiogramme

# Hémoculture

# ECBU

J0

Incubation dans automate

Examen direct  
Mise en culture

J1

Culture détectée positive

Observation des cultures

J2

Rendu de l'identification



→ *Escherichia coli*

# Hémoculture

# ECBU

J0

Incubation dans automate

Examen direct  
Mise en culture

J1

Culture détectée positive

Observation des cultures

J2

Rendu de l'identification *E. coli*  
et de l'antibiogramme

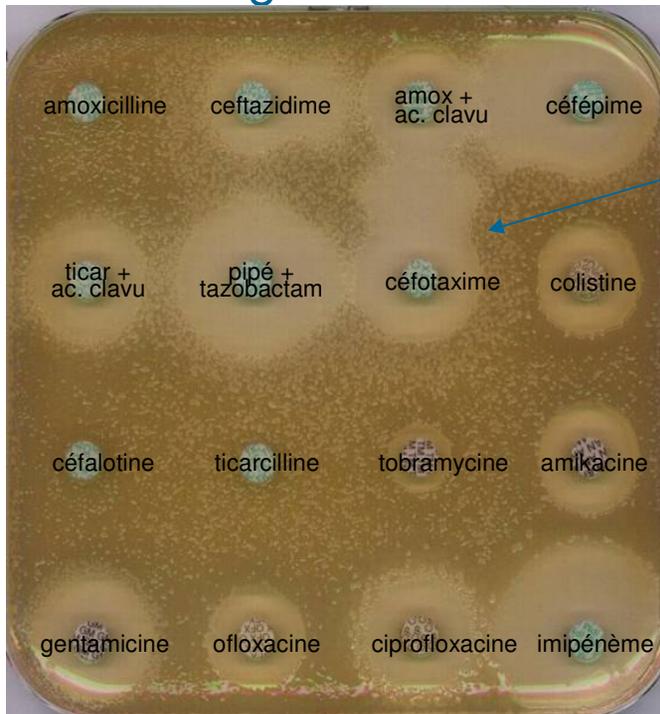


Image en bouchon de champagne évocatrice de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE)

## Hémoculture

J0

Incubation dans automate

J1

Culture détectée positive

J2

Rendu de l'identification *E. coli*  
et de l'antibiogramme: souche  
productrice de BLSE

## ECBU

Examen direct  
Mise en culture

Observation des cultures

## Hémoculture

## ECBU

J0

Incubation dans automate

Examen direct  
Mise en culture

J1

Culture détectée positive  
- examen direct  
- identification  
- antibiogramme

Observation des cultures  
- identification si besoin  
- antibiogramme

J2

Rendu de l'identification  
et de l'antibiogramme

Rendu de l'identification  
et de l'antibiogramme

Merci de votre attention !

