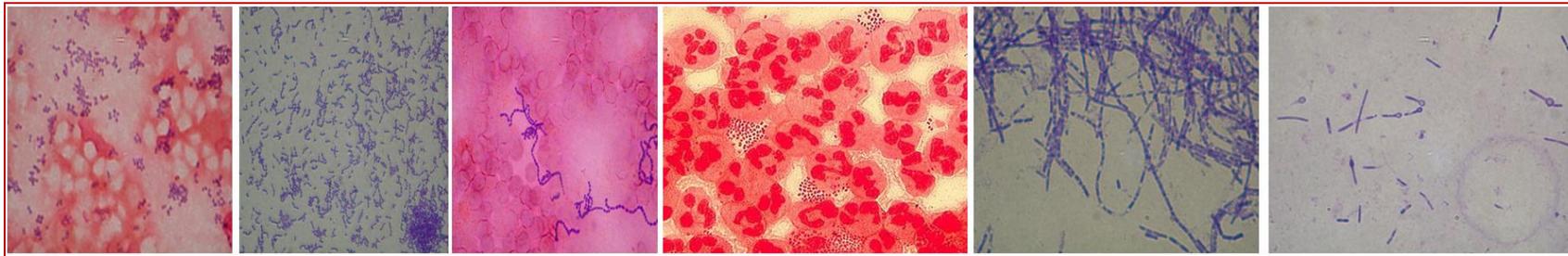


# NOTES TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

à l'usage interne pour les étudiants de la Faculté de Pharmacie



**Auteur: Ass. Dr. DELIA MUNTEAN**

**Coordonner: Prof. Dr. MONICA LICKER**

**Editura „Victor Babeș”**

Piața Eftimie Murgu 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: [evb@umft.ro](mailto:evb@umft.ro)

**[www.umft.ro/editura](http://www.umft.ro/editura)**

**Director general: Prof. univ. dr. Dan V. Poenaru**

**Director: Prof. univ. dr. Andrei Motoc**

**Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR**

**Indicativ CNCIS: 324**

© 2019 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

**ISBN 978-606-786-118-1**

# TABLE DES MATIÈRES

• LE RÔLE DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MÉDICALE	4
• LA STÉRILISATION	7
• ANTISEPTIQUES ET DÉSINFECTANTS	12
• MILIEUX DE CULTURE	16
• PRINCIPES GÉNÉRAUX POUR LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DES INFECTIONS	19
• LE COLLECTEMENT ET LE TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS	21
• L'EXAMEN MICROSCOPIQUE	32
• L'ISOLEMENT DES BACTÉRIES	33
• L'IDENTIFICATION DES BACTÉRIES	34
• L'ANTIBIOGRAMME. TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	38
• RÉACTIONS IMMUNOLOGIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DES INFECTIONS	47
• LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES COQUES GRAM POSITIF	55
• LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION PRODUITE PAR STAPHYLOCOCCUS AUREUS	55
• LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION PRODUITE PAR STREPTOCOCCUS	59
• LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES COQUES GRAM NEGATIF	66
• LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES MENINGOCOQUES	66
• LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES GONOCOQUES	67
• LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES BACILLES A GRAM POSITIF AEROBIE	69
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Corynebacterium diptheriae</i>	69
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Bacillus anthracis</i>	71
• LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES ENTEROBACTERIACEAE	72
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Salmonelle</i>	75
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Shigella</i>	79
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Escherichia coli</i>	80
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Klebsiella</i>	85
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Proteus</i>	88
• LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR DES AUTRE BACILLES A GRAM NEGATIF	90
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Pseudomonas</i>	90
• LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES BACILLES A GRAM POSITIF ANAEROBIE	93
• LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR MYCOBACTERIUM	95
• LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR SPIROCHETA	98
• Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par <i>Treponema pallidum</i>	98
• LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DES INFECTIONS PRODUITES PAR DES CHAMPIGNONS	101
• BIBLIOGRAPHIE	104

# LE RÔLE DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MÉDICALE

## RÈGLES À SUIVRE DURANT LES TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

**Le rôle du laboratoire de Microbiologie** consiste à :

- établir l'existence de microorganismes pathogènes ou saprophytes dans les produits pathologiques,
- l'isolation,
- l'identification
- et l'études de leur biologie qui se fait dans des laboratoires spéciaux

En fonction de groupe microbienne étudié (des bactéries, des virus, des champignons) a été déterminé le profil des laboratoires de bacteriologie, virologie, parasitologie, sérologie.

En fonction de la zone d'enquête il y a des laboratoires spécialisés en microbiologie de l'environnement, microbiologie alimentaires, industries

## **Le laboratoire de microbiologie médicale a le rôle de déterminer:**

- le diagnostic d'infection,
- le plus approprié chimiothérapie antibiotique,
- efficacité des traitements appliquées,
- détection des porteurs sains d'agents pathogènes microbiens

## **L'organisation et le fonctionnement du laboratoire de microbiologie**

Salles de laboratoire adéquates:

- salle pour la collection des produits biologiques
- salle de réception et d'enregistrement des preuves
- salle de travail
- chambre de stérilisation
- salle de stockage des matériaux, des réactifs et des milieux de culture
- salle de bain

## Équipement nécessaire:

- Des installations adéquates: l'eau courant chaud et froid, combustible gazeux, électricité
- Mobilier nécessaire: tables de travail, chaises, armoires
- Microscopes: microscope à lumière, microscope à fond noir, microscope à contraste de phase, microscope à lumière UV
- Instruments et consommables de laboratoire: lames et lamelles, kit de coloration et le bain, tubes, pipettes, des boîtes de Pétri, anse bactériologique, loupes
- Equipement de laboratoire de microbiologie: thermostat, réfrigérateurs, congélateurs, analyseurs pour l'identification bactérienne et la sensibilité aux antibiotiques, ordinateurs –centrifugeuse, autoclaves, four Pasteurs

## LA STÉRILISATION

La stérilisation est l'opération qui consiste à débarrasser un objet ou une substance quelconque, des toutes les formes de vie. Le matériel ainsi traité devient exempt des toutes les germes ou les micro-organismes vivant (bactéries, spores, champignons, virus, etc).

Dans le laboratoire médical, la stérilisation vise essentiellement trois objectifs:

- Préparer le matériel de prélèvement (aiguilles, seringues, tubes, etc., qui doivent être stériles)
- Désinfecter le matériel souillé
- Préparer le matériel nécessaire aux cultures bactériologiques (boîtes de Pétri, pipettes Pasteur, tubes, etc.)

La stérilisation se réalise par les méthodes suivantes:

### **Méthodes physiques**

- Chaleur
  - ✓ chaleur sèche: stérilisation par flambage, chauffage à flamme rouge pour les objets, stérilisation au four Pasteur
  - ✓ chaleur humide: stérilisation au autoclave, stérilisation par ébullition, pasteurisation, vapeur filante
- Filtration – filtre ou membrane filtrante
- Radiation ultraviolet et gamma

### **Méthodes chimiques**

- stérilisation à l'oxide d'etylen
- stérilisation à formaldéhyde

Au laboratoire médical, on stérilise soit par chaleur humide (autoclave, ébullition), soit par chaleur sèche (four Pasteur, flambage).

## Méthodes physiques

**Chauffage à flamme rouge pour les objets:** les anses de platine doivent être chauffées à la flamme d'un brûleur à gaz ou d'une lampe à alcool, jusqu'à ce qu'elles soient portées au rouge.

### **Stérilisation au four Pasteur**

La stérilisation à 180°C pendant 1 heure, assurant ainsi la carbonisation des formes végétatives et les spores de toutes les micro-organismes. La température de 180 °C est requise car la chaleur sèche a un pouvoir de pénétration plus faible.

Préparation du matériel à stériliser à four Pasteur: désinfection, lavage, séchage puis préparé pour ne pas recontamination après stérilisation. Les instruments sont placés dans des boîtes métalliques.

Le contrôle de la stérilisation se fait à l'aide de bandelettes d'analyse physico-chimiques.

Par cette méthode, nous pouvons stériliser, si nécessaire: verrerie de laboratoire, articles en porcelaine, l'instrumentation métallique, quelques poudres: talc, huiles (paraffine).

## Stérilisation au autoclave

Principe: Par un chauffage de 30 minutes à 121°C on détruit tous les germes dans cette vapeur d'eau sous pression.

L'emballage des matériaux stérilisés à l'autoclave est effectué dans des sacs résistants à la température et scellés hermétiquement.

Contrôle de la stérilisation:

1. Essais physico-chimiques avec des agents thermochimiques,
2. Essais biologiques - "Stearotest 120" contenant des spores de *Bacillus stearothermophilus*. Il évalue l'efficacité de la stérilisation en effectuant un contrôle bactériologique en vérifiant la viabilité des spores après les avoir semées dans des tubes de bouillon. La stérilisation était efficace si la culture restait stérile.

Indications de stérilisation: matériel infectieux de laboratoire, instrumentation en métal, articles en caoutchouc, tissus de coton.

Les autoclaves "Flash" sont des autoclaves qui sont principalement utilisés dans les salles d'opération car la stérilisation est effectuée à 134 ° C pendant 4 minutes.

## L'autoclave



## Le four Pasteur



## ANTISEPTIQUES ET DÉSINFECTANTS

Le terme désinfectant comprend à la fois les désinfectants au sens strict et les antiseptiques. Les deux termes désignent les produits qui ont en commun la capacité d'inhiber ou de tuer les micro-organismes indésirables. Les désinfectants au sens strict sont destinés aux milieux inertes (instruments, surfaces); les antiseptiques sont destinés aux tissus vivants (peau, muqueuse).

Ces produits agissent de façon momentanée, ils ne protègent pas contre une nouvelle contamination ni la prolifération naturelle (mitose, réplication). Ils doivent donc être réappliqués régulièrement.

Les antiseptiques et désinfectants sont capables d'inhiber la croissance des micro-organismes (action bactériostatique, fongistatique, virostatique) ou de les éliminer (action bactéricide, fongicide, virucide, sporicide). Certains produits possèdent les deux actions en fonction de la concentration utilisée. Généralement, plus la concentration est élevée, plus l'effet est de type létal (exception ex: éthanol 70% plus actif qu'à 96%).

On distingue différentes familles d'antiseptiques et de désinfectants en fonction de leur mode d'action sur la cellule des microorganismes: atteinte membranaire, coagulation de constituants intracellulaires, blocage d'enzymes protéiques. Hormis la concentration, différents facteurs peuvent influencer l'activité des produits:

- Temps de contact (activité avec augmentation du temps de contact)
- Température (activité avec augmentation de la température), pH (baisse ou augmentation d'activité selon les familles)
- Liposolubilité (pénétration de la couche cornée)
- Présence de fluides ou autres matières biologiques (sang, pus) (activité pour toutes les familles à l'exception des phénols)
- Présence de savon (activité des ammoniums quaternaires, de la chlorhexidine et des produits chlorés).

## Principales familles d'antiseptiques et désinfectants

Familles	Exemples	Cible et mode d'action	Remarques
<b>ALCOOLS</b>	Ethanol, Isopropanol	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines	présence d'eau nécessaire à l'activité (utilisation d'alcool 70%) activité par matières biologiques
<b>ALDEHYDES</b>	Formaldehyde	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines	activité par matières biologiques
<b>AMMONIUMS QUATERNAIRES</b>	Benzalkonium	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire —► fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule	activité par matières biologiques, savons et oxydants
<b>BIGUANIDES</b>	Chlorhexidine	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire Æ fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol	activité par matières biologiques et savons
<b>HALOGENES CHLORES ET IODES</b>	Hypochlorite de sodium PVP-iodé	Destruction des protéines membranaires et chromosomiques (halogénéation)	activité par matières biologiques et savons / dégradation par rayons UV
<b>OXYDANTS</b>	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)	Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN	activité par matières biologiques

## Spectre d'activité des antiseptiques et désinfectants

Familles	Spectre d'activité							
	Gram+	Gram -	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Viruses	Virus enveloppés	Spores
ALCOOLS	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
ALDEHYDES	+	+	+	+	+	+	+	+
AMMONIUMS QUATERNAIRES	+	+/-		+	+	+/-	+	
BIGUANIDES	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	-
HALOGENES CHLORES ET IODES	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDANTS: DESINFECTION	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDANTS: ANTISEPSIE	+	+	-	+	+	+/-	+	-

**+ produits actifs**

**+/- produits inconstamment actifs - produits inactifs**

**-produits inactifs**

**Remarques :**

**Aldéhydes: utilisation pour la désinfection uniquement**

**Halogénés iodés: utilisation pour l'antiseptie uniquement**

## MILIEUX DE CULTURE

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié ce qui implique :

- couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance,
- apporter la source de carbone et d'énergie,
- présenter un pH voisin du pH optimal,
- présenter une force ionique optimale (le milieu peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire).

Un milieu de culture est composé d'un mélange de **substrats nutritifs** (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucre, etc.), d'un **système tampon** évitant les variations trop importantes de pH, de **sels minéraux** et de **vitamines**.

Diverses adjonctions peuvent être faites pour favoriser ou permettre la croissance de bactéries exigeant des "**facteurs de croissance**" (**vitamines, protéines, hémoglobines, etc.**).

Les milieux de culture doivent assurer des conditions d'aérobiose ou anaérobiose.

Le pH optimum d'un milieu de culture est de 7,2-7,4 (pH neutre) mais il y a quelques exceptions. *Brucella* qui se développe à un pH de 6,8 et *Vibrio cholerae* qui se développe à un pH de 9.

## Classification

Les milieux de culture sont classifiés par:

- l'état physique: m. liquides, m. semi-solides (5% agar), m. solides (10%)
- la complexité: m. simples, m. enrichis
- le but: m. de diagnostic, m. spéciaux, m. sélectifs

### Exemples de milieux de culture:

- M. liquides: eau peptoné, bouillon.
  - M. solides: gélose-simple, gélose Columbia au sang de muoton, gélose au sang + ANC (acide nalidixique et colistine), etc.
  - M. sélectifs:
    - milieu de Chapman (pour *Staphylococcus*),
    - milieu de Sabouraud (pour les levures et champignons),
    - milieu lactosé (milieu de Mac Conkey , m. CLED – pour enterobactéries)
  - M. spéciales: Lówenstein –Jensen pour *Mycobacterium tuberculosis* (bacille du Koch), etc.
- !!! Les milieux complémentés les plus utilisés sont les **milieux au sang** (mouton ou cheval).

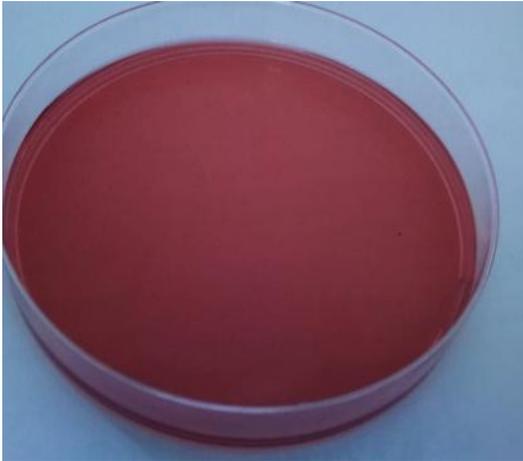
# Les milieux de culture

## Le milieux liquides

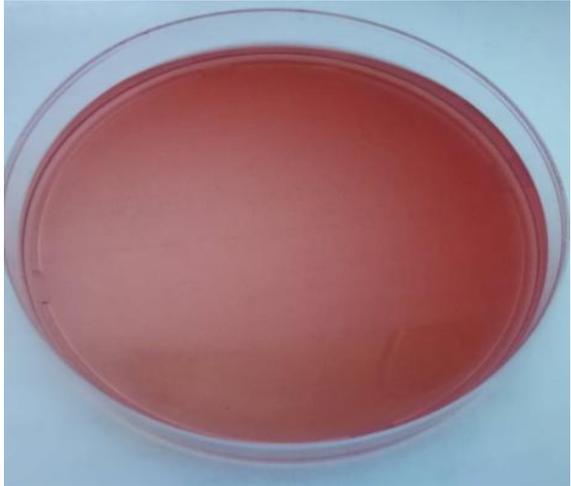


## Le milieux solides

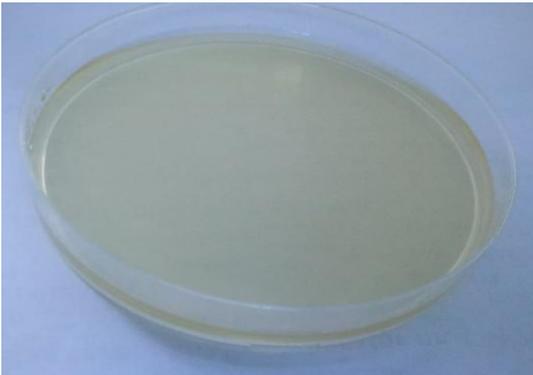
gélose Columbia au sang de muoton



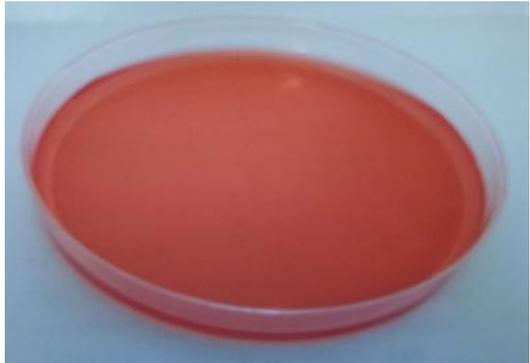
milieu de Mac Conkey



milieu de Sabouraud



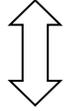
milieu de Chapman



# PRINCIPES GÉNÉRAUX POUR LE DIAGNOSTIQUE DE LABORATOIRE DES INFECTIONS

## DIAGNOSTIQUE DE LABORATOIRE DES INFECTIONS

### DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE



Identification des bactéries

Sensibilité de la culture à plusieurs antibiotiques

### DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE



Identification d'anticorps spécifiques en sérum

jour 1

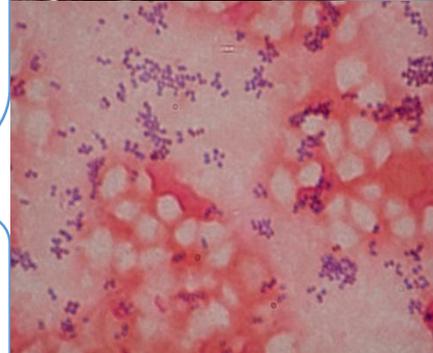
- Prélèvement du produit pathologique
- Le transport des prélèvements
- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Isolement des bactéries en milieu de culture

jour 2

- **Identification des bactéries**
  - caractères morphologiques
  - caractères de culture
  - propriétés biochimiques
  - Identifier l'antigène
  - identifier les constituants antigéniques
- **Sensibilité de la culture à plusieurs antibiotiques**

jour 3

- Achèvement du diagnostic
- Publier les résultats



# DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

**Les étapes** de diagnostic bactériologique:

- Prélèvement du produit pathologique
- Le transport des prélèvements
- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Isolement des bactéries
- Identification des bactéries par des caractères morphologiques, caractères de culture, propriétés biochimiques, pouvoir pathogène
- Sensibilité de la culture à plusieurs antibiotiques

## Le collectement et le transport des échantillons



## Sécrétions nasales (exsudât nasal)

- Le prélèvement se fait avec un tampon nasal stérile (un tampon pour chaque narine).
- **Technique de prélèvement:** On immobilise la tête du patient en extension, on introduit délicatement le tampon dans le nez, le long du plancher nasal jusqu'à atteindre la paroi postérieure du nasopharynx. On le laisse quelques secondes, puis on le tourne doucement pour qu'il soit imprégné d'exsudat, après quoi, on le retire doucement. La quantité du prélèvement est plus grande si on retire et réinsère le tampon au même endroit, le premier tamponnement stimulant les sécrétions muqueuses naso-pharyngées. On réintroduit le tampon dans son tube protecteur et on l'envoie immédiatement au laboratoire ou bien on l'introduit dans un liquide conservateur pour le conserver jusqu'à son analyse.

## Sécrétions pharyngiennes (exsudat pharyngien)

- Le prélèvement se fait avec un tampon pharyngien. Il est préférable de réaliser le prélèvement le matin, à jeun, avant la toilette de la cavité buccale, afin de ne pas diminuer la flore bactérienne en actionnant le nettoyage mécanique muqueux par le biais de la toilette buccale ou de la mastication. Sinon il se réalise 3-4 heures tout après nettoyage de la cavité buccale, gargarisme avec un antiseptique, ou ingestion d'aliments.
- **Technique de prélèvement** : Le patient est assis le cou en légère extension, la bouche grande ouverte, le pharynx bien éclairé, la base de la langue (face dorsale) maintenue avec une spatule stérile (abaissement de la langue). On demande au malade de faire « Ah ».
- On introduit le tampon sans toucher la langue, ni la spatule (pour ne pas contaminer l'échantillon avec la flore buccale) et encore moins la luette (pour ne pas déclencher le réflexe de régurgitation). On tamponne fermement par un mouvement circulaire et on frotte la surface des amygdales, de la paroi postérieure de pharynx ainsi que les zones enflammées, ulcérées, et avec des sécrétions purulentes. On retire le tampon avec précaution, on le réintroduit dans le tubes protecteur et on l'envoie immédiatement au laboratoire ou bien on l'introduit dans un liquide conservateur pour le conserver jusqu'à son analyse.

## Crachats

Le prélèvement se fait le matin par la toilette des bronches, parce qu'au cour de la nuit, le dépôt de sécrétions est plus abondant. On peut faire deux types de prélèvement :

- indirecte: on demande au patient d'effectuer un rinçage énergique de la cavité buccale avec du sérum physiologique (ne pas utiliser de solution antiseptique), puis de tousser et d'expectorer dans un récipient stérile,
- directe: par bronchoscopie ou pas ponction trachéale
- chez les enfants on réalise le prélèvement par lavement gastrique ou sondage gastrique car ils ont tendance à avaler le produit de prélèvement.

## Pus

- Le pus est un liquide visqueux formé de leucocytes intacts ou altérés, de micro-organismes, de restes cellulaires et de fibrine.
- Le pus des collections purulentes fermées est récolté par un chirurgien par incision de la collection purulente. On ne prélève pas le pus de la surface des collections car il contient des bactéries mortes. Après nettoyage de la plaie, on prélève le liquide situé en profondeur de la plaie.
- Le pus des collections purulentes ouvertes peut être prélevé en laboratoire. On désinfecte les téguments avec une solution iodée autour des collections purulentes. Le prélèvement se fait à l'aide d'un tampon stérile (le même que pour les sécrétions nasales), ou avec une anse bactériologique après avoir retiré et éliminé la couche superficielle de pus.
- Collections purulentes fistulisées: on désinfecte les téguments avec une solution iodée. On introduit une pipette Pasteur dans le trajet de la fistule et on aspire.

## Matières fécales

- Immédiatement avec la défécation, on prélève avec la languette stérile fixée au bouchon du récipient de coproculture, le produit pathologique suivant :
  - ✓ fragments muqueux
  - ✓ fragments sanguinolents
  - ✓ fragments riziformes
  - ✓ fragments purulents (quand ils existent)
  - ✓ ou fragments de matière fécale prélevée à différents endroits si les selles sont homogènes.
- Après le prélèvement on met en suspension 1g de produit pathologique dans le milieu de transport contenu dans le récipient de coproculture. L'échantillon ainsi prélevé est immédiatement envoyé au laboratoire pour traitement.
- Pour dépister la présence d'entérobactéries pathogènes, on examine l'échantillon de selles provoquées par lavement.

## Urine

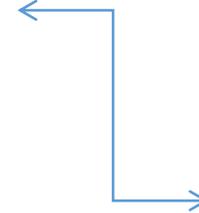
- Échantillon « recueilli à la volé » du jet intermédiaire, indiqué pour les infections du tractus urinaire (ITU) avec des bactéries pathogènes, On réalisa la toilette totale de l'organe génital externe qui consiste à laver avec de l'eau et du savon la vulve chez la femme, et le gland chez l'homme. Il est déconseillé d'essuyer ensuite avec une serviette car cela peut recontaminer l'organe génital avec les micro-organismes présents sur la serviette. Il est préférable de récolter les premières urines du matin ou minimum 3h après la dernière miction.
- Le patient urine :
  - ✓ environ 10 mL pour le dépistage quantitatif des micro-organismes pathogènes
  - ✓ environ 30-50mL pour le dépistage des micro-organismes pathogènes particuliers (par exemple : Bacille de Koch).
- On élimine le premier jet d'urine qui a pour rôle de débarrasser l'urètre de la flore saprophyte qui existe à ce niveau après quoi, sans interruption du jet d'urine, on prélève dans un récipient stérile le volume nécessaire d'urine (jet intermédiaire).
- L'échantillon récolté est envoyé immédiatement au laboratoire ou est conservé à 4°C jusqu'au moment de son analyse.

## Sécrétions urétrales

- Chez les hommes, le prélèvement se fait le matin avant la miction. Dans les urétrites aiguës, on récolte les fuites urétrales spontanées. Aussi, il est obligatoire de récolter la sécrétion de l'intérieur de l'urètre. Pour cela on introduit dans l'urètre, à une distance de 1-2cm, un tampon mince que l'on fait tourner quelques secondes en prévenant le patient que la manœuvre est un petit peu douloureuse. Par cette manœuvre, on obtient les cellules épithéliales urétrales dans lesquelles se multiplient les *chlamydiae*, cause fréquente des urétrites. Le tampon de prélèvement peut-être remplacé par une boucle de platine, stérilisée et refroidie, introduite dans l'urètre en suivant les mêmes indications que pour le tampon. L'échantillon ainsi récolté se traite immédiatement. Chez les patients avec urétrite chronique la sécrétion est réduite et apparaît sous forme de gouttes matinales.
- Pour récolter une plus grande quantité de sécrétion, on demande au patient de boire la veille au soir deux verres de bière et de ne pas uriner avant 2h du matin.

## Sang

- En conditions normales, le sang est stérile puisqu'il possède la capacité d'éliminer les microbes. En tant que produit pathologique il peut être prélevé pour examen bactériologique ou sérologique. Pour l'examen bactériologique, on réalise une hémoculture qui révèle la présence de bactéries dans le sang en enseménçant un échantillon de sang dans un milieu de culture adéquat.
- Le prélèvement se fait de préférence dès la survenue des premiers frissons (les frissons et la fièvre apparaissent 1-2 heures après l'arrivée des bactéries dans le sang, moment à partir duquel elles ont commencé à se multiplier).
- On extrait 10-20mL de sang (en moyenne 15mL), en phase aigue de la maladie; en phase chronique, on en prélève plus, en moyenne 30mL.
- Chez les nourrisson on récolte 1-3mL de sang.
- On ensemence immédiatement le sang dans un milieu de culture liquide.



- **Les méthodes de prélèvement** varient selon le siège de l'infection et selon le germe que l'on compte découvrir. Nous rappellerons la nécessité d'utiliser un matériel convenablement stérilisé, de préférence du matériel stérile à usage unique. Le moment le plus opportun où il faut pratiquer le prélèvement varie parfois avec le context clinique. En général, un prélèvement précoce augmente les chances de découvrir le micro-organisme responsable (gonocoque).
- **Le transport** des prélèvements doit être fait selon des règles précises. Quelques germes strictement inféodés à l'organisme humain ne peuvent survivre à l'exposition même courte à une température inférieure à celle de l'hôte. D'autres supportent très mal la dessiccation ou le contact avec l'oxygène libre.
- **Examen macroscopique:** toute les infection bactérienne s'accompagne, outre la présence de bactéries, de signes biologiques liés à l'inflammation avec l'éventuelle présence de leucocytes, notamment de polynucléaires. Ces éléments peuvent entraîner au delà d'un seuil, une modification visuelle, clairement perceptible à l'oeil nu, qui signe une anomalie patente.

# Examen microscopique

## Réalisation des lames:

- À partir d'un liquide (de ponction, d'écoulement) : si ce liquide est pauvre en cellules on le centrifuge et on manipule le culot cellulaire. À l'aide de la pipette, prélever une goutte, la poser sur la lame et l'étaler soit avec le plat de la pipette soit avec une autre lame. Faire sécher sur une platine chauffante et fixer.
- À partir de colonies une suspension bactérienne est faite et déposer sur une lame une goutte d'eau (peu volumineuse) et l'émulsionner doucement. Sécher et fixer.
- **La coloration de Gram** découverte par Hans Christian GRAM en 1884 permet de distinguer les bactéries colorées en **violet** (Gram positif) de celles en **rose** (Gram négatif). La différence de couleur est due à des différences de structure, plus exactement de perméabilité de la paroi cellulaire.
- Le principe de coloration consiste à colorer les bactéries avec un colorant acridine comme le cristal violet et en réalisant une fixation avec une solution de Lugol (solution iodé de potassium). Il se forme ainsi un complexe insoluble avec l'acide ribonucléique cellulaire, de couleur violette.
- La différence entre les bactéries Gram positives et Gram négatives consiste à une différence de perméabilité de la paroi cellulaire pour ce complexe, après décoloration avec de l'alcool-acétone ou de l'alcool pur.
- Les bactéries Gram positives gardent le complexe violet alors que celles Gram négatives le perdent et deviennent incolore. Celles-ci se coloreront à nouveau en rouge soit avec la fuschine, soit avec le safranine.
- **Il faut souligner que les bactéries à Gram positif retiennent le complexe violet uniquement si la structure de la paroi est intacte.** Si la cellule bactérienne a la paroi cellulaire altérée elle va perdre ce complexe.

# L'examen microscopique

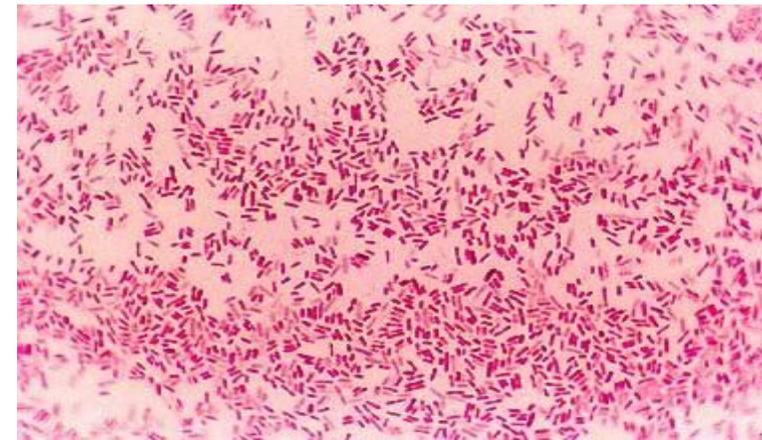
## La coloration de Gram

### *Technique de coloration :*

- le frottis fixé au flacon est mis en contact avec une solution de cristal violet pendant une minute
- on lave la lame avec du Lugol et on recouvre avec du Lugol pendant 2 minutes (l'iode sert à fixer la coloration)
- on retire le Lugol et on décolore quelques secondes avec de l'alcool-acétone ou deux minutes avec de l'alcool pur
- on lave avec de l'eau
- on couvre la lame avec une solution de fuschine dilué à un 1/10, pendant une minute
- on lave avec de l'eau, on sèche et on examine au microscope avec l'objectif à immersion.



*Gram positif = violet*



*Gram négatif = rouge*

## L'isolement des bactéries

- Le produit pathologique estensemencé dans des milieux favorables, simples ou enrichis, en aéro-ou anaérobiose, éventuellement milieux sélectifs lorsqu'on soupçonne un germe particulier. On utilise principalement des milieux solides qui permettent d'isoler les bactéries et de reconnaître l'existence éventuelle d'une flore microbienne mixte.
- Le plus souvent, l'isolement est obtenu en étalant l'inoculum au moyen d'une anse de platine, en stries serrées à la surface d'une boîte de Pétri ainsi séparés les uns des autres donneront naissance chacun à une colonie dans un milieu neuf on obtiendra une culture pure.
- Il est fréquemment fait appel à des milieux sélectifs. On peut alors utiliser des milieux enrichis de substances diverses connues pour favoriser la croissance d'un germe (facteurs X et V pour *H. influenzae*), ou pour inhiber les bactéries non recherchées (milieu de Chapman pour les staphylocoques, milieu SS pour les *Salmonella* et *Shigella*, etc.).

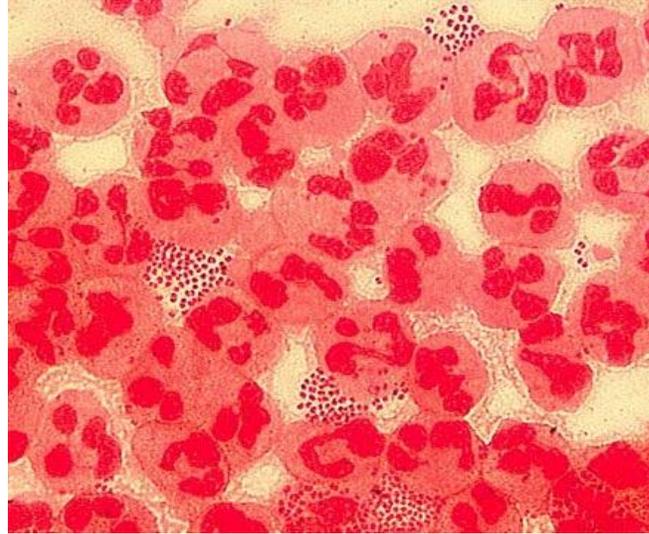
## L'IDENTIFICATION DES BACTÉRIES

Cette identification doit obligatoirement être faite à partir d'une culture pure. Rappelons en brièvement les différentes étapes:

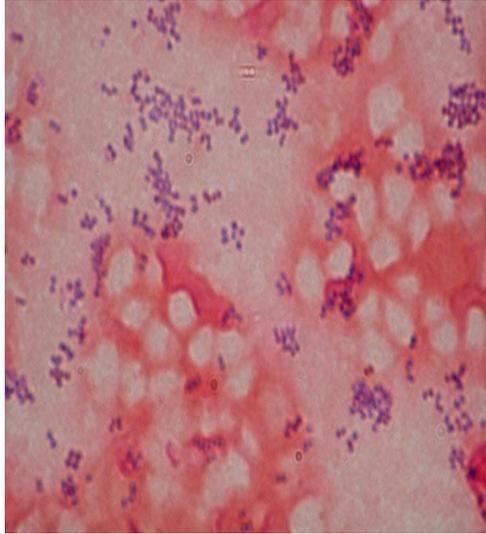
- **caractères morphologiques du germe:** forme, groupement, mobilité, type de ciliature, spore, capsule, affinité tinctoriale;
- **caractères de culture:** rapport avec l'oxygène atmosphérique, exigences nutritives, aspect des colonies, pigmentation, hémolyse sur gélose au sang, odeur particulière;
- **propriétés biochimiques** qui consistent à définir l'équipement enzymatique de la bactérie; métabolisme glucidique, lipidique, protéique;
- si pour certaines bactéries l'identification s'arrête à ce stade, pour d'autres il est important de préciser **les constituants antigéniques** au moyen de sérums spécifiques agglutinants ou précipitants (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* entéropathogènes, streptocoques);
- éventuellement le **pouvoir pathogène**, mettant alors en évidence la virulence de la souche (bacille tuberculeux) ou ses caractères toxigènes (bacille diphtérique).

# Caractères morphologiques du germe

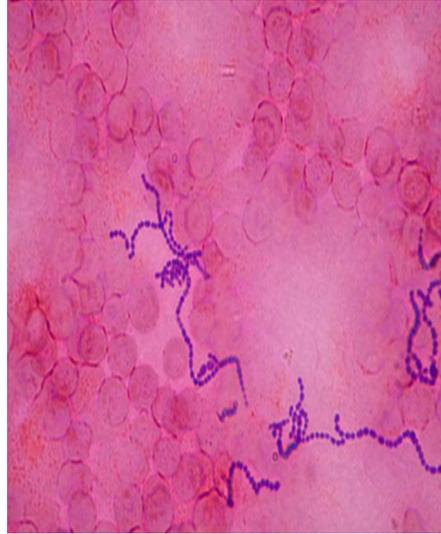
Neisseria



Bacillus

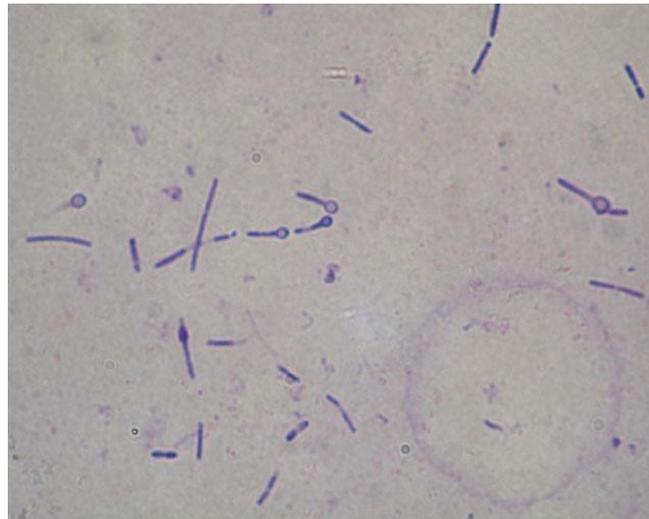


*Staphylococcus*

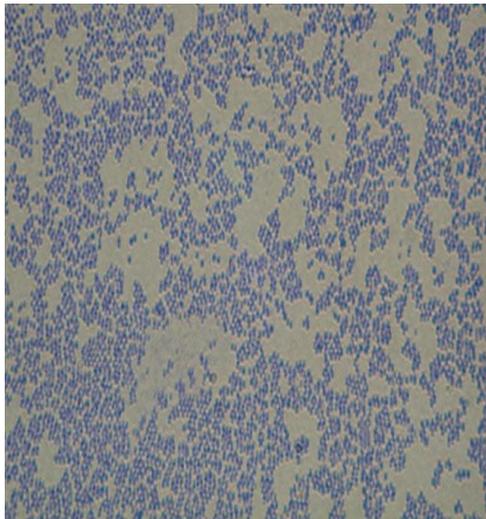
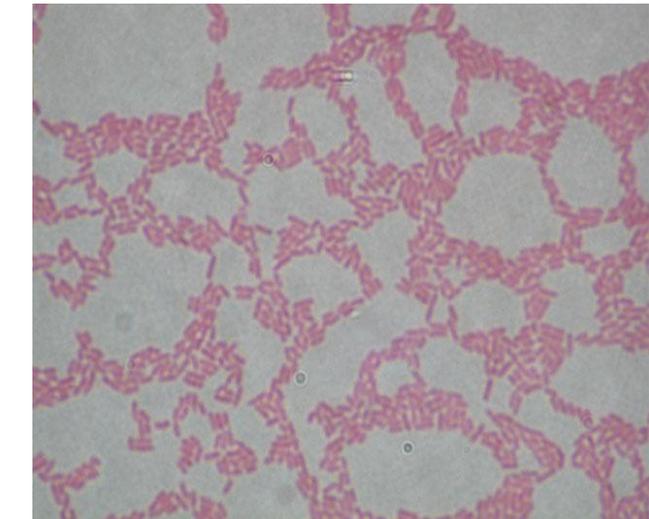


*Streptococcus*

Clostridium



Enterobacteriaceae



## Aspect des colonies à la surface du milieu de culture

### Gélose au sang

- Entérobactéries: colonies rondes, gris, opaques, lisses, diamètre de 3 à 4 mm
- Pseudomonas: colonies rondes, lisses, transparentes, brillant, diamètre de 1 à 3 mm
- Staphylococcus aureus: colonies rondes, blanc-jaunâtre, opaques, lisses, diamètre de 1 à 2 mm, avec hémolyse
- Streptococcus: colonies fines, diamètre de 0,5 à 1 mm, avec hémolyse d'aspect variable
- Enterococcus: colonies rondes, blanches, lisses, diamètre de 0,5 à 1 mm

### Milieu de Mac Conkey

- Les germes lactose positif donnent des colonies roses ou rouges (précipité du colorant lors du changement du pH): *Escherichia coli*, *Klebsiella*
- Les germes lactose négatif donnent des colonies incolore: *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*

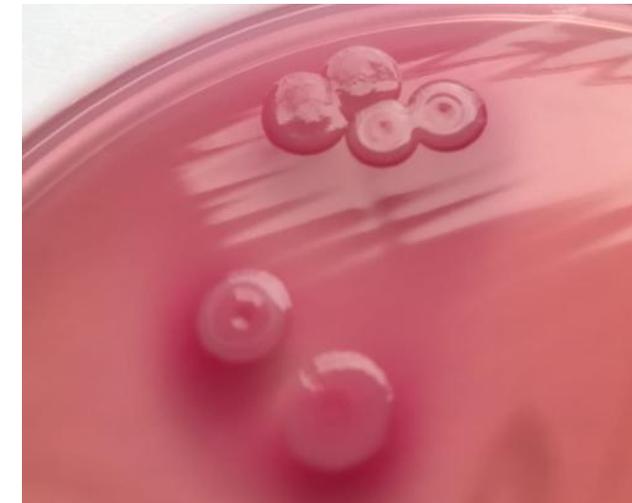
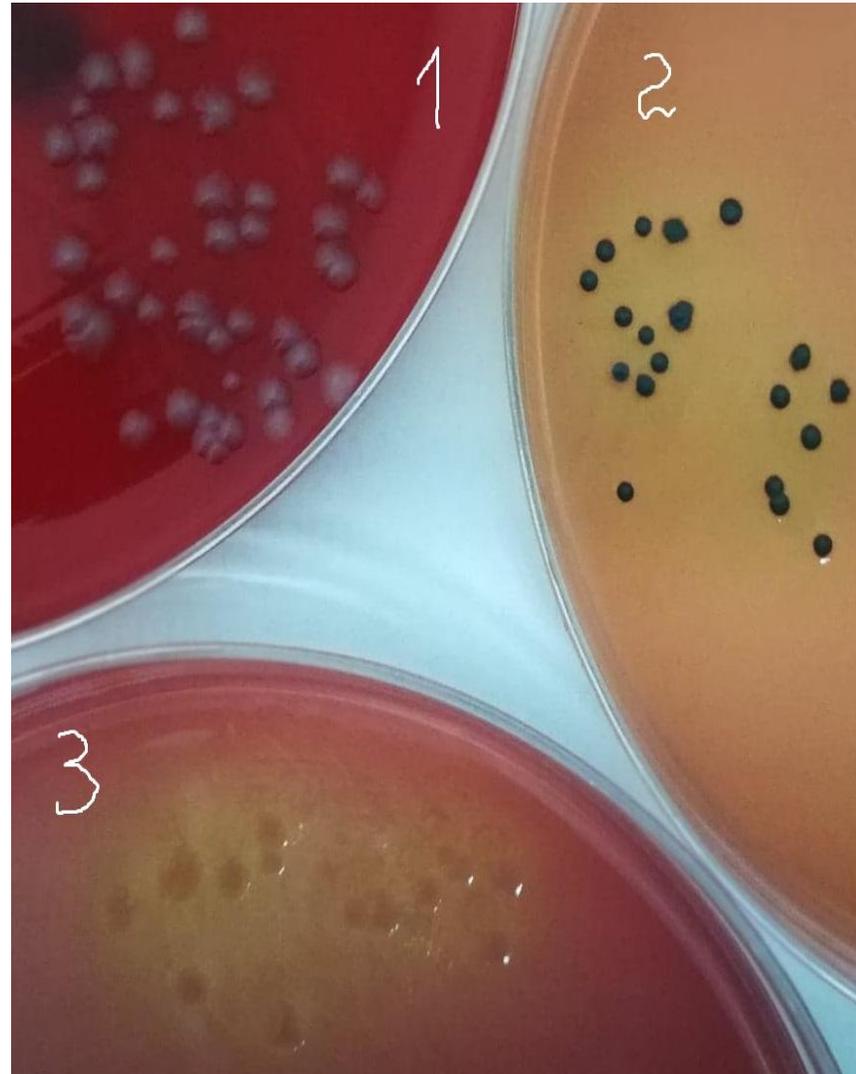
### Milieu de Chapman

- *Staphylococcus aureus* forment des colonies oranges

### Milieu de Sabouraud

- Levures: colonies de 1 à 2 mm de diamètre au bout de 24 heures, blanches mates

## Caractères de culture



## L'ANTIBIOGRAMME. TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION

- Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus.
- En Roumanie, et pas seulement, deux normes d'antibiogramme sont utilisées: European-**EUCAST** (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testinng) et l'American-**CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute).

### L'antibiogramme par diffusion

#### Principe de la technique:

Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé préalablementensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester. Après incubation, les boîtes de Petri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (résistant, intermédiaire, sensible). Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée.

Le contrôle de technique avec les souches de référence devant être obligatoirement testées sont : *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

# L'antibiogramme par diffusion

## Paramètres importants

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

- ❖ Le milieu de culture doit permettre la croissance de nombreuses bactéries et il ne doit pas contenir d'inhibiteurs des antibiotiques. Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton (plus 5% de sang pour les germes exigeants). Il doit être coulé en boîtes de Petri.
- ❖ Les disques d'antibiotiques sont fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure imprégnés d'agents antimicrobiens à des concentrations précises.
- ❖ La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial. La suspension cellulaire doit être préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune et pure sur milieu d'isolement approprié. L'antibiogramme par diffusion est réalisé avec une suspension calibrée à 0,5 Mac Farland, o contenant environ  $10^8$  bactéries par ml.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par écouvillonnage ou par inondation de telle façon à avoir après incubation des colonies distinctes mais jointives.

# L'antibiogramme par diffusion

## Lecture des résultats

Après incubation à la température et sous atmosphère recommandées, les diamètres des zones d'inhibition seront mesurés avec précision. Les diamètres des zones d'inhibition mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par les instances en vigueur (EUCAST et CLSI) afin de classer la bactérie dans l'une des catégories **Résistant**, **Intermédiaire**, **Sensible**.

## Les catégories cliniques

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

- ❖ Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.
- ❖ Les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
- ❖ Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. En effet, ces souches :
  - peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression in vitro est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie S. Cependant, in vivo, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement
  - peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R, mais suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues).

## L'antibiogramme par diffusion



## Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La **CMI** est définie comme la concentration minimale d'un antibiotique qui inhibe la croissance in vitro de 99% de la population bactérienne testée.

En pratique, la CMI est la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible.

**Techniques de la détermination de la CMI:** méthodes de dilution et E-test

**Les méthodes de dilution** sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2.

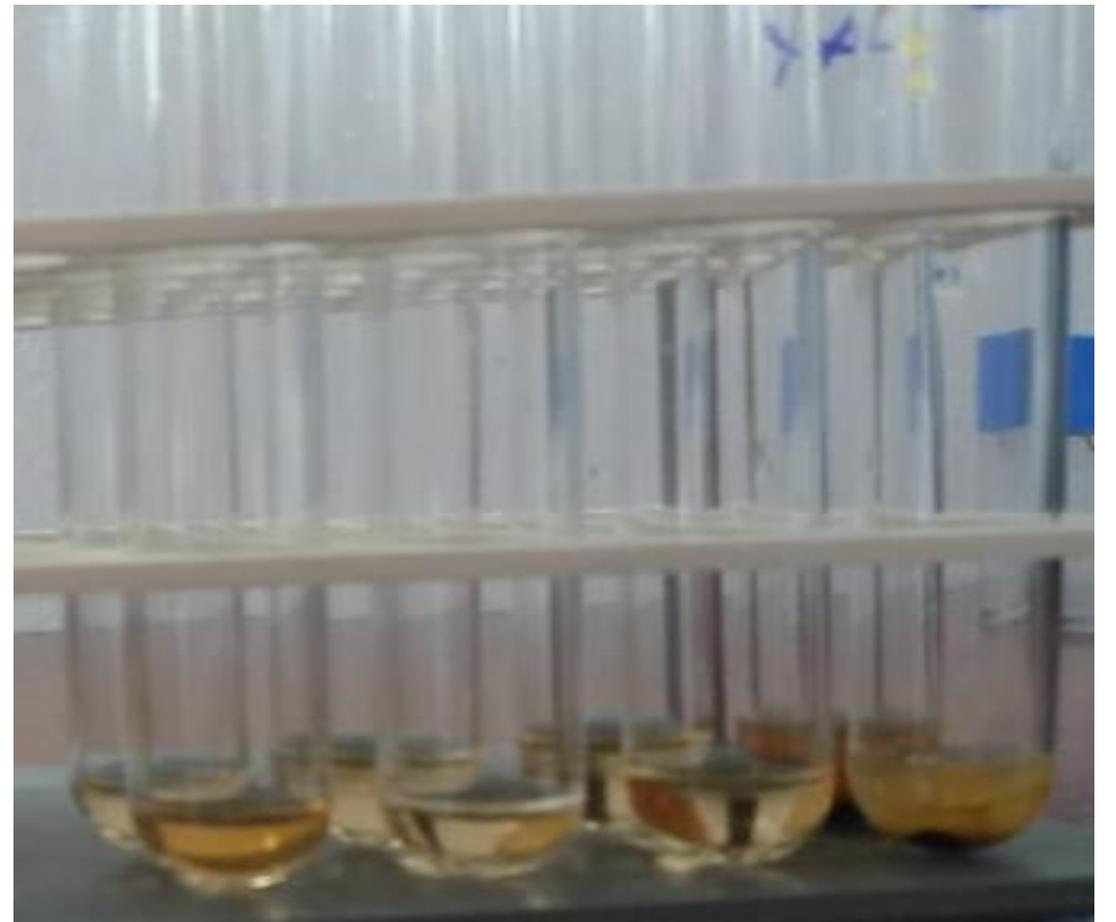
- ❖ En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.
- ❖ En milieu solide, l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Petri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.
- ❖ La méthode de dilution en milieu gélosé, réalisée avec une gamme de concentrations en progression géométrique de raison 2 est la méthode de référence. Elle permet également de mesurer la concentration inhibitrice 99% (concentration qui inhibe la croissance de 99% des cellules d'une souche bactérienne) ou la concentration inhibitrice 50% (concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules d'une souche bactérienne).

## Les méthodes de dilution

méthode de microdilution



méthode de macrodilution



# CMI

**Le E-test**, technique en milieu gélosé, permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester.

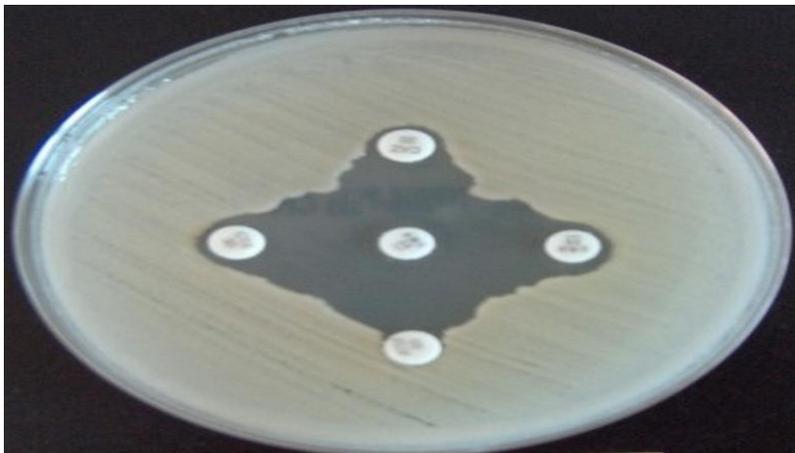
Le principe est basé sur l'association des caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.



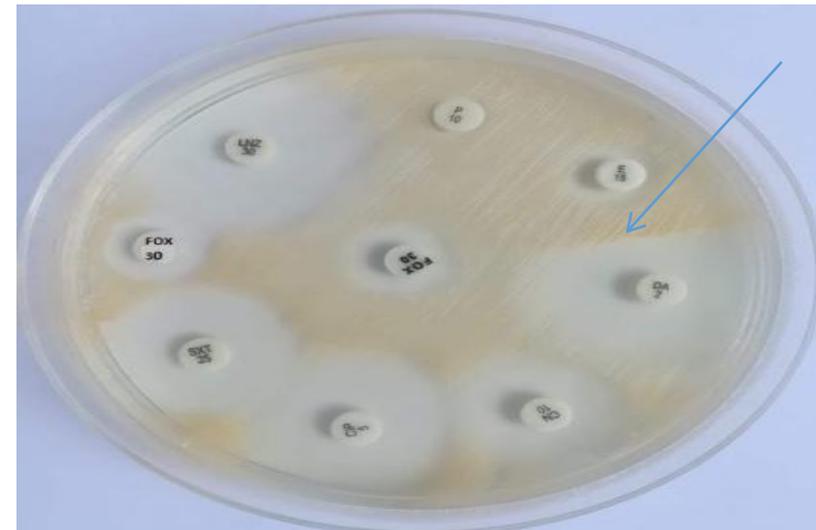
## L'association d'antibiotiques

L'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre principaux effets:

- ❖ effet synergique: l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément
- ❖ effet additif: l'effet de l'association est légèrement supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément
- ❖ effet indifférent: l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre
- ❖ effet antagoniste: l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.



effet synergique



effet antagoniste

## Limites dans l'interprétation des résultats

### **Incertitude sur l'étiologie de l'infection**

L'antibiogramme ne peut apporter une aide que dans la mesure où il est effectué sur la bactérie véritablement responsable de l'infection. Parmi les bactéries isolées d'un prélèvement, le laboratoire doit faire un choix et n'effectuer l'antibiogramme que sur l'espèce ou les espèces susceptibles de jouer un rôle étiologique.

### **Absence de parallélisme entre les situations in vitro et in vivo.**

L'antibiogramme ne peut prédire le comportement d'un antibiotique in vivo. Celui-ci est fonction de multiples facteurs :

- ✓ Choix d'un schéma posologique
- ✓ Diffusion au site de l'infection
- ✓ Pénétration dans les cellules ce qui est important à considérer pour les infections dues aux bactéries intracellulaires (les antibiotiques pénétrant bien dans les cellules sont les tétracyclines)
- ✓ Influence des facteurs physiologiques ou pathologiques sur la pharmacocinétique de l'antibiotique
- ✓ Transformation de la molécule in vivo
- ✓ Etat physiologique de la bactérie au sein du foyer infectieux (les bactéries au repos sont insensibles aux antibiotiques qui interfèrent avec la biosynthèse du peptidoglycane)
- ✓ Émergence d'une résistance au cours du traitement.

# RÉACTIONS IMMUNOLOGIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DES INFECTIONS

Les réactions immunologiques sont basées sur la spécificité des réponses des anticorps aux antigènes:

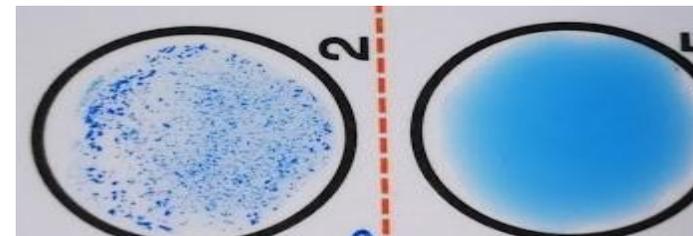


L'agglutination:

- une agglutination bactérienne directe en tubes

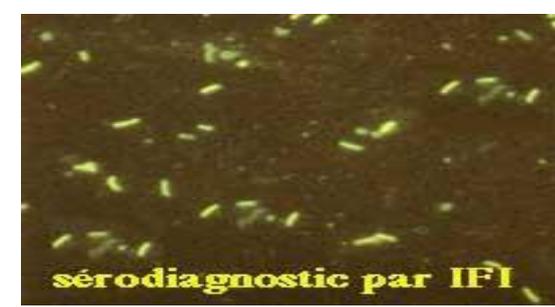


- une agglutination utilisant des Ag fixés sur un support de particules inertes



Les molécules d'Ac peuvent-être marquées avec des substances **radioactives**, **fluorescentes**, ou avec des **enzymes** et s'utilisent respectivement dans les **radio-immunodosage**, les **réactions d'immuno-fluorescences** et dans les tests **ELISA**.

# IMMUNOFLUORESCENCE



L'immunofluorescence est une méthode qui permet, grâce à la conjugaison d'Ac avec une substance fluorescence, la mise en évidence par microscopie UV, des complexes Ag-Ac. La substance fluorescente la plus fréquemment utilisée est l'isothiocyanate de fluorescéine avec une **fluorescence verte**, suivie par la rhodamine B avec une **fluorescence orange**.

- L'**immunofluorescence directe** est l'une des méthodes les plus rapides, sensibles et spécifiques de diagnostic utilisée pour le diagnostic microbiologique. Par cette méthode, on peut identifier les micro-organismes (ou leur Ag) directement à partir du produit biologique, ou de la culture. De plus, on peut mettre en évidence divers Ag présents dans les tissus. Le frottis sur lequel on effectue la recherche d'Ag est coloré avec un mélange fluorescent d'Ac spécifique pendant environ 30 min. Après cet intervalle de temps, pendant lequel les Ac se fixent aux Ag spécifiques, on lave la lame pour enlever l'excès d'Ac fluorescents non-fixés. La lame est examinée au microscope à UV. Si l'Ag cherché est présent, on observera sur la lame les complexes Ag-Ac fluorescents sur le fond sombre du microscope. Dans le cas contraire, si l'Ag est absent, il y a absence de fluorescence.
- **Immunofluorescence en sandwich** on l'utilise pour mettre en évidence des Ac anti-tissulaires. On applique, sur la préparation de tissus à étudier, une solution qui contient l'Ag correspondant. Une fois que celui-ci s'est uni avec l'Ac, on recouvre la préparation avec des Ac fluorescents complémentaires des Ag appliqués précédemment.

## IMMUNOFLUORESCENCE

- Immunofluorescence indirecte

Cette variante d'immunofluorescence est utilisée, en général, pour mettre en évidence les Ac au sein d'un milieu biologique, comme par exemple les Ac anti-*treponemo pallidum* du sérum.

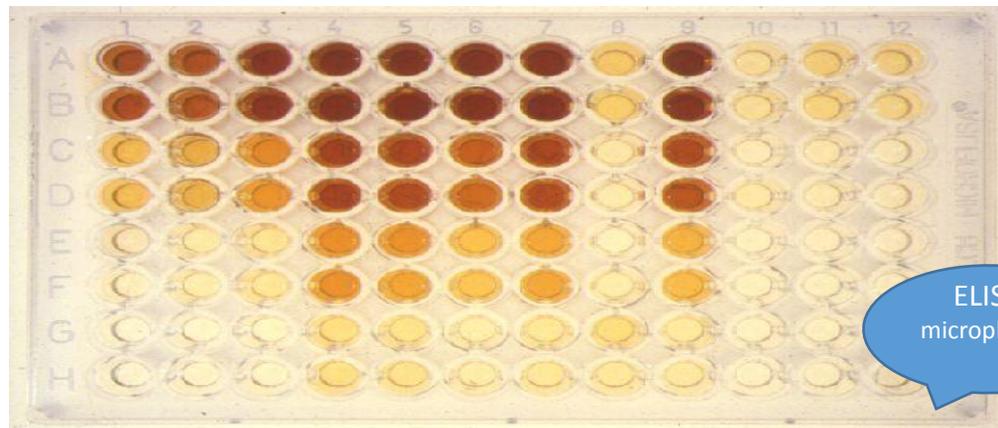
Sur la lame qui va être utilisée est fixé l'Ag spécifique pour l'Ig recherché dans le sérum du patient. On recouvre la lame avec du sérum de recherche et on incube pendant une période de temps dépendant de la technique.

Pendant ce temps les AC spécifiques du sérum vont se fixer sur les Ag qui se trouvent sur la lame. Après le lavage, de la préparation pour retirer l'excès d'Ac, on la recouvre avec des Ac anti-immunoglobuline fluorescents. Dans le cas où il y a présence des Ac cherchés dans le sérum de recherche, les AC anti-immunoglobuline humaine vont se fixer sur ces derniers en formant un complexe Ag-Ac fluorescent visible en microscopie UV.

Avec cette méthode, on peut aussi mettre en évidence divers Ag, avec des sérums immuns et des AC fluorescents dirigés contre les Ac du sérum immun. L'immunofluorescence indirecte est plus sensible que la directe.

## Réaction immunologique avec des Ac marqués par enzyme-ELISA

- ✓ Ag bactérien fixé au fond des puits d'une microplaque
  - ✓ on dépose chaque dilution du sérum de malade dans un puits
  - ✓ après incubation et lavages, on dépose dans chaque puits une anti-Ig (Anti-IgG , ou anti-IgM) couplée à une enzyme
  - ✓ après une 2ème période d'incubation et des lavages, on rajoute un substrat dans chaque puits
  - ✓ si présence d'Ac sériques spécifiques, l'enzyme agit sur le substrat qui est hydrolysé et change de couleur.
- Ces techniques très sensibles, automatisées et permettent de différencier les classes d'Ig (IgA, IgM, IgG).

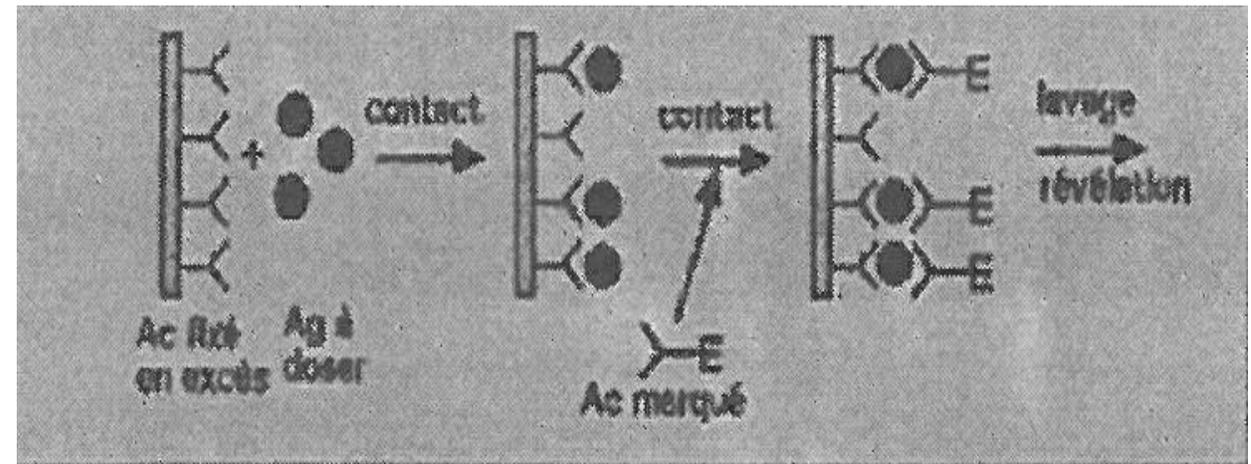
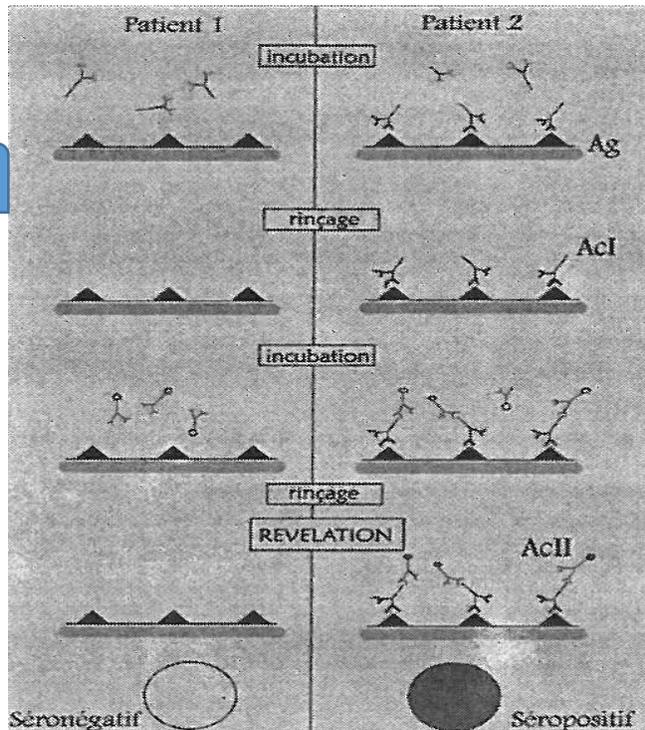


# ELISA-SANDWICH

## Recherche des Ag bactériens

- ✓ les puits d'une microplaque sont sensibilisés avec un Ac spécifique de la bactérie recherchée
- ✓ un échantillon de prélèvement est ajouté dans les puits
- ✓ le complexe Ag-Ac formé est révélé par addition d'un Ac monoclonal marqué à une enzyme , puis du substrat spécifique à l'enzyme
- ✓ la densité optique, mesurée au niveau des puits, permet d'incriminer la bactérie correspondante.

ELISA



ELISA-SANDWICH

## Techniques Radio-Immunologiques

La mise en évidence des Ag avec RIA est basée sur le principe de compétition. Ainsi, sur un support solide, sont fixés les Ac dirigés contre l'Ag que Ton veut mettre en évidence dans le sérum du patient. On ajoute le sérum du patient. Si celui contient l'Ag cherché, donc dans une réaction positive, celui ci va se fixer sur l'Ac correspondant sur le support. Après la réaction on ajoute l'Ag marqué radioactif qui ne trouvera plus de sites de fixation libres. La radioactivité va être très faible. Dans le cas contraire, la réaction est négative, et les Ag du sérum ne vont pas se fixer et les sites de combinaisons vont rester libres pour l'Ag marqué radioactif. Dans cette situations la radiactivité sera grande.

### Méthode Western Blot

C'est la méthode de référence dans le diagnostique sérologique du SIDA grâce à sa sensibilité exceptionnelle. Elle combine l'électrophorèse avec un réaction à Ac marqués radioactifs, mais le plus souvent avec des Ac fixés à une enzyme. Dans le principe on réalise la séparation des molécules de l'Ag infectieux sur un gel de polyacrylamide, en fonction de leurs dimensions.

La séparation par électrophorèse est suivie par un électrotransfert sur un support solide de nitrocellulose. Celui ci est incubé avec le sérum du patient.

Les Ac vont réagir avec les fractions antigéniques spécifiques du support. Les complexes Ag-Ac formés sont mis en évidences par des Ac marqués avec une enzyme (plus rarement radioactifs).

## Les techniques de biologie moléculaire

La PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne, est une technique qui permet d'amplifier une région bien précise du génome.

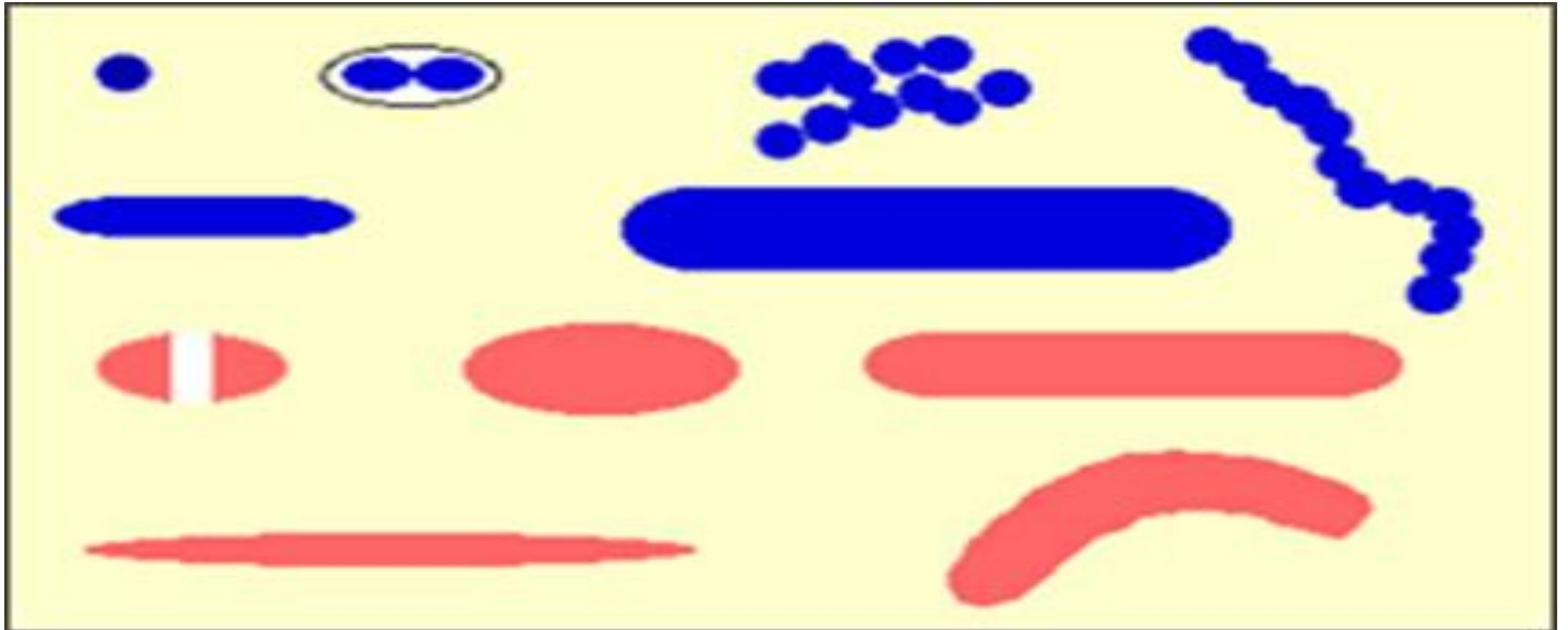
### Utilisation

- Infections dues à des bactéries à croissance difficile ou très lente. Même si le germe est présent dans le prélèvement à de très faibles concentrations, on peut ainsi détecter sa présence.
- Détection des gènes de résistance aux antibiotiques.

**Avantages de la PCR:** rapidité, sensibilité et spécificité.

**Inconvénient:** prix de revient élevé, réservée à certains laboratoires équipés.

# MICROBIOLOGIE SPÉCIALE



# LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES COCQUES GRAM POSITIF

## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Staphylococcus aureus*

### Signification clinique

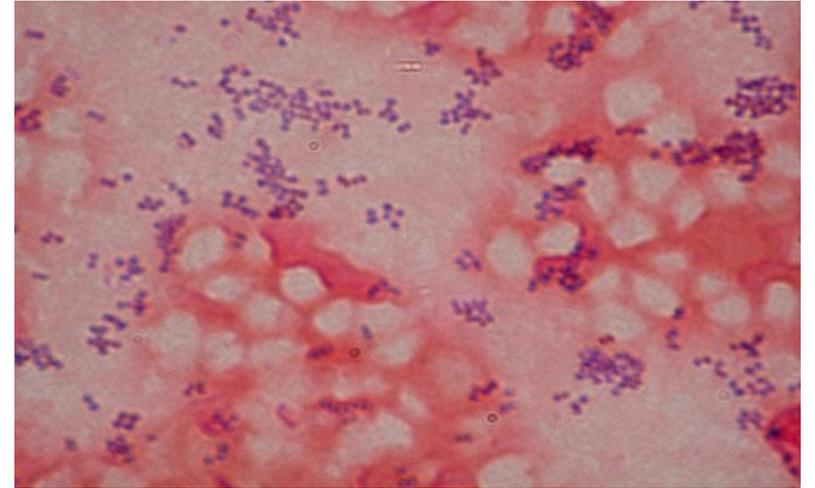
- **Impétigo:** infection superficielle de la face et des membres, avec des macules, vésicules, pustules, fond érythémateux
- **Folliculites:** infections purulente dans les follicules pileux
- **L'orgelet** – chez les paupière
- **Furoncles:** étendre d'infection dans les glandes sébacées avec une collection considérable de pus, accompagnée de douleurs
- **Les Carbuncules:** propagation de l'infection à plusieurs glandes pilo-sébacé et les tissus sous-cutané profonde
- **Hidrosadenite:** Infection localisée des glandes sudoripares à axillaire, périnée, ou les parties génitales
- **Mastite:** infection de la glande mammaire chez les femmes pendant lactation
- **Infection de la plaie:** post-traumatique ou post- chirurgial, avec œdème et un érythème local, la douleur et l'accumulation de pus
- **Bactériémie et l'endocardite:** 50% acquise à l'hôpital, après des interventions chirurgicales, utilisation d'un cathéter intraveineux contaminés; souvent associée à la diffusion secondaire septique habituellement dans l'endocarde.
- **Pneumonie et empyème pulmonaire:** fréquentes chez les âges extrêmes
- **Ostéomyélite et arthrite septique:** résultats de diffusion secondaire septique des infections staphylococcique à d'autres sites, ou post-traumatique
- **Suppuration des séreuses:** pleurésie, méningite, péritonite, phlegmon périnéphrétique
- **Septicémies** avec possibilité de localisations secondaires (septico-pyhémies) atteignant électivement l'os, le rein, le poumon
- **Les infections associées à la diffusion de toxines spécifiques:**
  - ✓ Intoxications alimentaires (causées par l'ingestion d'entérotoxines), entérocolite staphylococcique (maintenant exceptionnelle)
  - ✓ Lésions bulleuses généralisées (les exfoliatines): syndrome de la peau ébouillantée chez les jeunes enfants, de la maladie de Ritter
  - ✓ Le syndrome de choc toxique staphylococcique: fièvre avec hypotension artérielle, érythrodermie desquamative observé sous forme épidémique chez des femmes en période menstruelle utilisant des tampons ayant un fort pouvoir d'absorption
- **Infections nosocomiales**

## Diagnostic bactériologique

### Prélèvement:

On peut pratiquement isoler *S aureus* de tous les prélèvements cliniques. En fonction du type de l'infection :

- pus pour un abcès, furoncle, panaris, phlegmon, pustules
- prélèvement de gorge pour une angine
- prélèvement au niveau des lésions cutané-muqueuses
- liquides d'épanchements
- Hémocultures
- Urine



### Examen microscopique direct:

- L'examen microscopique de frottis colorés à Gram peut se révéler utile dans l'analyse des prélèvements normalement stériles, tels que le liquide céphalo-rachidien ou le liquide synovial, mais aussi pour les prélèvements non stériles. On prend le temps d'évaluer le spécimen en rapport avec la quantité relative de polynucléaires neutrophiles et des cellules épithéliales.
- L'examen direct donne une indication importante en mettant en évidence des **cocci à Gram positif regroupés en amas**.

## *Staphylococcus aureus*

### Diagnostic bactériologique

#### Culture:

- Les staphylocoques croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif.
- Sur la gélose au sang, les colonies sont rondes, blanc-jaunâtre (pigment doré), opaques, lisses, diamètre de 1 à 2 mm, bombées, avec hémolyse.
- Les spécimens qui sont très contaminés par les bactéries de la flore normale doivent être ensemencés sur un milieu sélectif, milieu de Chapman. Hydrolyse du mannitol en milieu de Chapman: *S aureus* qui fermente le mannitol fait virer ce milieu du rouge au jaune.



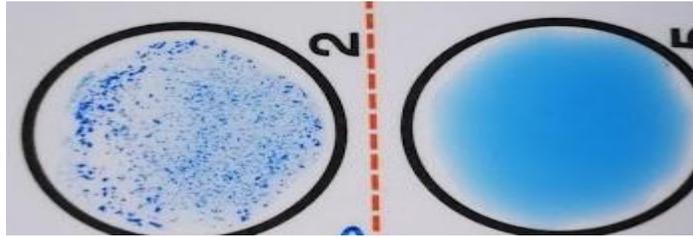
gélose au sang



milieu de Chapman

## *Staphylococcus aureus* Diagnostic bactériologique

Le caractère qui permettent d'affirmer le pouvoir pathogène est: la présence d'une **coagulase**



détection de la coagulase liée  
la coagulase sur lame

### Antibiogramme:

- *S. aureus* est un germe qui devient facilement résistant à la Pénicilline en produisant de la pénicillinase (ou beta-lactamase). Au cours des années 50 et 60, l'utilisation excessive de la pénicilline a eu pour effet de favoriser les souches résistantes, les souches sensibles ayant été détruites. A la fin des années 50 et au début des années 60, beaucoup de problèmes sont apparus (infections nosocomiales) à cause des staphylocoques qui sont devenus résistants.
- La détermination des staphylocoques producteurs de **beta-lactamase** se fait par une détection des souches **résistant à la Pénicilline**.
- Pour les souches qui résistent à la Méricilline (**SARM**) on va déterminer la résistance a la Cefoxitine. Le SARM est caractérisé par une **résistance à toutes les bêta-lactamines, à l'exception des céphalosporines de la 5ème génération**.
- D'autres antibiotiques actifs sont: aminosides, macrolides, lincosamides, streptogramines, fluoroquinolones, **glycopeptides**.

# Le diagnostic de l'infection produite par *Streptococcus pyogenes* (streptocoque du groupe A)

## Signification clinique

- ✓ Les pharyngites, angines érythémateuses ou érythématopultacées
- ✓ Les autres infections des voies aériennes supérieures: les sinusites et les otites moyennes aiguës
- ✓ La scarlatine (une angine streptococcique accompagnée d'une éruption cutanée due à la sécrétion de toxine, suivie de desquamation). Le streptocoque reste localisé dans l'amygdale ou le pharynx et les manifestations générales sont dues à la dissémination de la toxine érythrogène et des enzymes véhiculées par voie hématogène (maladie à déclaration obligatoire)
- ✓ L'impétigo (peut être streptococcique ou staphylococcique)
- ✓ Les surinfections de plaies, de brûlures, d'eczéma ou d'ulcères
- ✓ L'érysipèle (une dermoépidermite aiguë récidivante ) avec une point de départ est orificiel (narine, lèvre, plaie) à partir duquel se développe une intense réaction inflammatoire par un mécanisme infectieux et allergique
- ✓ La cellulite (fasciite nécrosante): une infection cutanée et sous-cutanée, avec une extension rapide - nécrose tissulaire streptococcique
- ✓ Pyodermites, suppurations fermées (panaris, arthrite) ou ouvertes (ulcères cutanés) pouvant entraîner une septicémie
- ✓ Les pneumopathies et abcès du poumon, les salpingites et infections puerpérales
- ✓ Maladies dites post-streptococciques: le rhumatisme articulaire aigu (RAA) - suite à une infection pharyngée (rare en raison d'un traitement antibiotique correct des angines); la glomérulonéphrite aiguë (GNA) suite à une infection cutanée ou pharyngée; la chorée de Sydenham; l'érythème noueux.

## Prélèvement

Sera pratiqué en fonction du type d'infection :

- Prélèvement de gorge pour une angine
- Prélèvement au niveau des lésions cutanéomuqueuses
- Liquides d'épanchements
- Hémocultures

**Examen direct** : coque à Gram positif en chaînettes. Ce dernier ne présente aucun intérêt pour les prélèvements de gorge, car les streptocoques commensaux sont très nombreux.

**Culture**: isolement sur gélose au sang

**L'identification** du streptocoque du groupe A repose sur:

- L'hémolyse de type **bêta**
- Le groupage antigénique: **A**
- Épreuve de **sensibilité** à la **bacitracine**.

## Antibiogramme

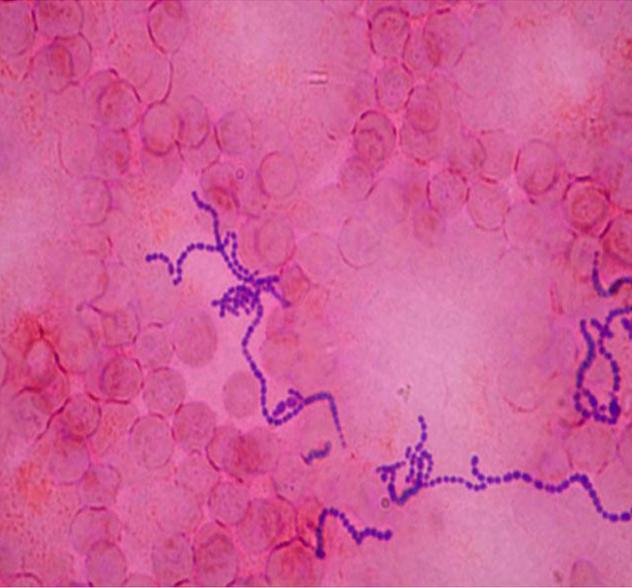
On ne réalise pas d'antibiogramme sur le streptocoque du groupe A isolé de la gorge ou de prélèvement cutané, car ce streptocoque est universellement sensible à la pénicilline. Chez les personnes allergiques à la Pénicilline, on utilise l'érythromycine.

Il permet de porter un diagnostic de complication post-streptococcique.

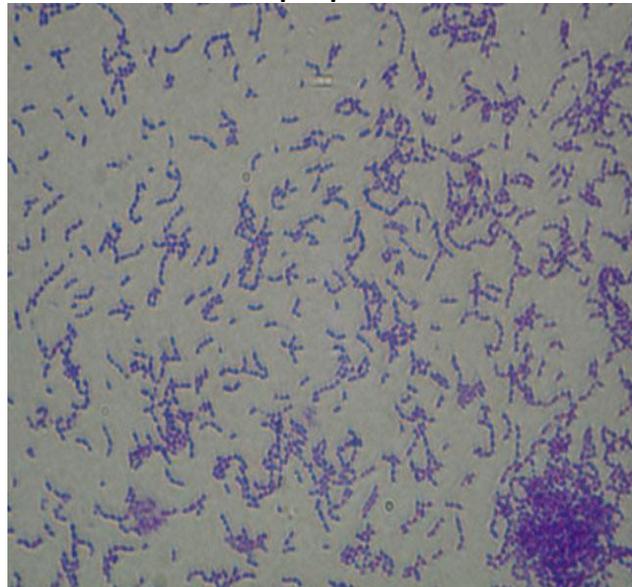
L'infection streptococcique initiale ayant pu être négligée ou inaperçue, on recherchera l'élévation du titre des anticorps.

Les **antistreptolysines O (ASLO)** qui à l'état normal ne dépassent pas **200UI**, atteignent ou dépassent 800UI. Une variation significative du titre entre deux prélèvements effectués à 15-21 jours d'intervalle a une grande valeur diagnostique.

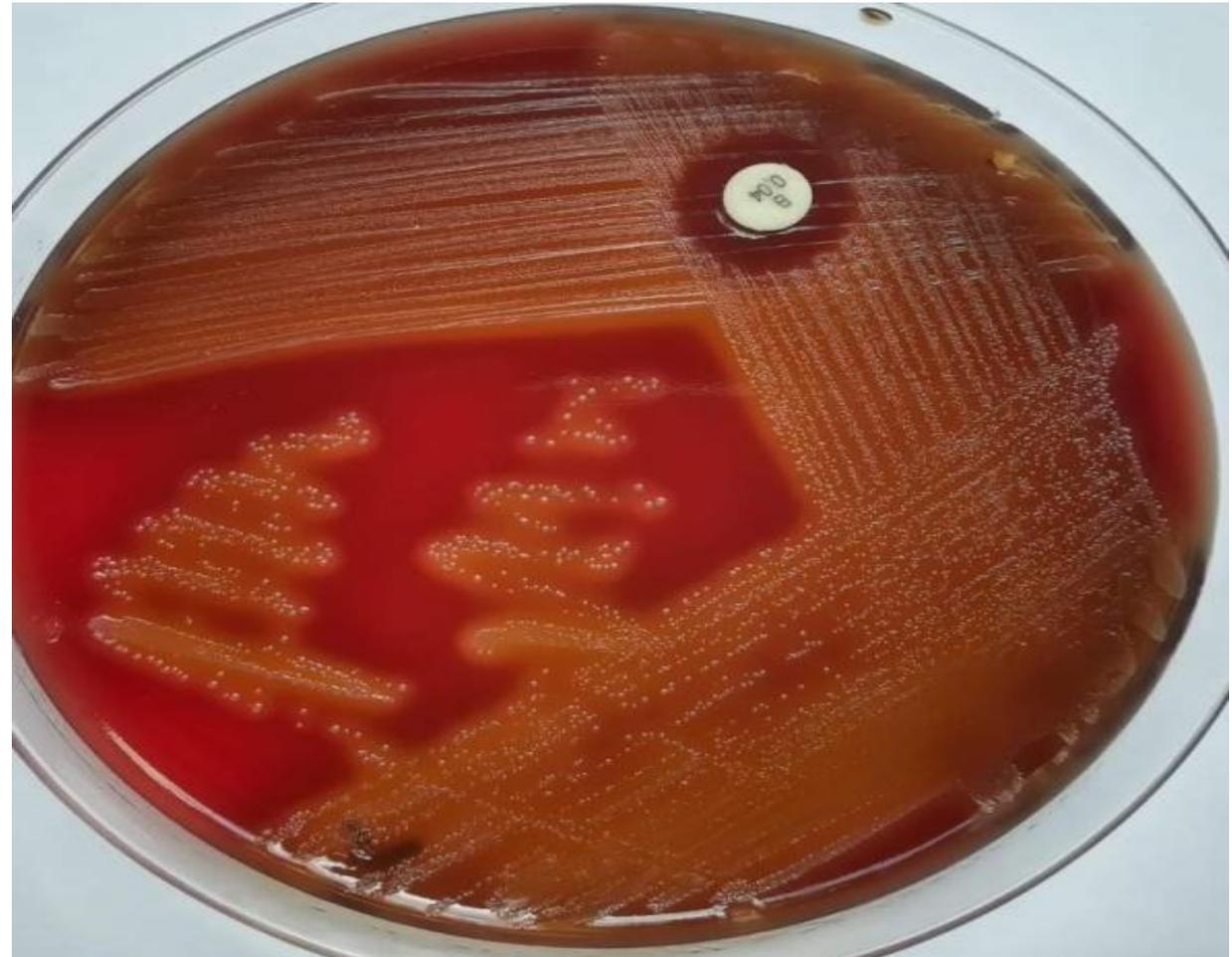
## *Streptococcus pyogenes*



L'examen microscopique de frottis colorés à Gram



Épreuve de sensibilité à la bacitracine et  
l'hémolyse de type bêta



## L'antigène du groupe



# *Streptococcus agalactiae* (streptocoque du groupe B)

## Signification clinique

- ✓ septicémies néonatales avec détresse respiratoire (infections précoces) et/ou méningites (infections tardives),
- ✓ d'infections urinaires,
- ✓ génitales (endométrite)
- ✓ et cutanées parfois compliquées de septicémies.

Le portage vaginal et intestinal est fréquent, notamment chez la femme enceinte. Il peut aussi exister un portage cutané, pharyngé. Une colonisation vaginale est recherchée à partir du III trimestre de grossesse par culture des sécrétions vaginales.

## Diagnostic bactériologique

**Examen direct:** coque à Gram positif en chaînettes

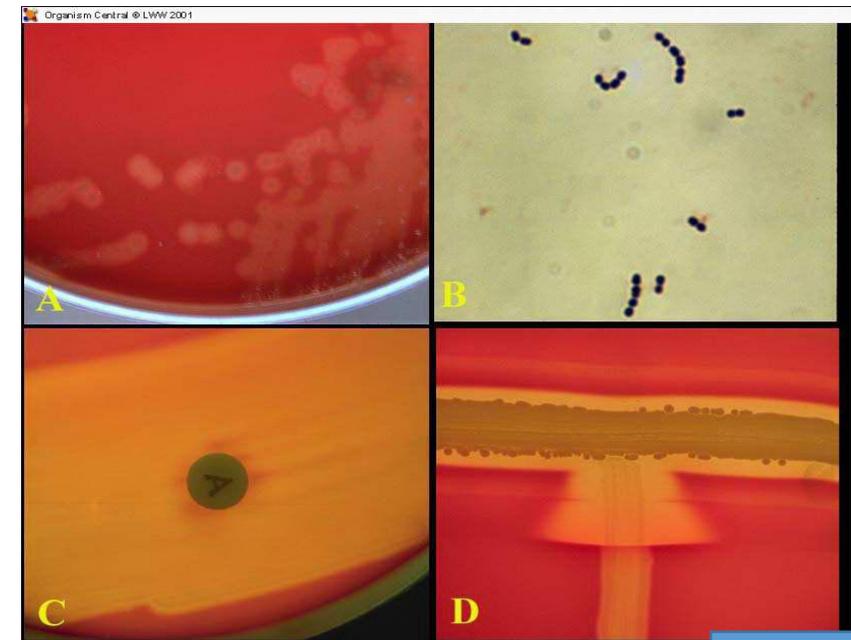
**Culture:** isolement sur gélose au sang

L'identification du streptocoque du groupe B repose sur:

- L'hémolyse de type **bêta**
- Le groupage antigénique: **B**
- Épreuve de **résistance** à la **bacitracine**.

## Antibiogramme

En général, sont sensibles à la pénicilline G et à l'amoxicilline.



# *Streptococcus pneumoniae*

## Signification clinique

Il est responsable des infections broncho-pulmonaires, des infections de la sphère ORL, des méningites.

## Prélèvements

Variet en fonction de la localisation de l'infection:

- Expectorations
- Prélèvement des voies respiratoires basses
- Pus d'otites
- LCR

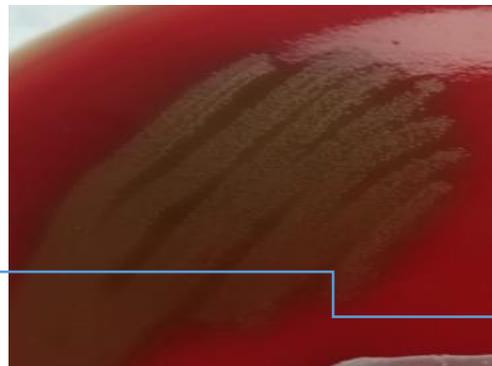
## Examen direct

Le prélèvement après coloration de Gram est primordial vu que la morphologie des **diplocoques à Gram positif capsulés** est caractéristique.

**La culture:** isolement sur gélose au sang

**L'identification** se fait par:

- L'**hémolyse** de type **alpha** →
- L'étude de la **sensibilité** à l'**optochine** →
- dépourvus d'antigène de groupe.



## Diagnostic bactériologique

## Antibiogramme:

Nécessite de réaliser un antibiogramme et de déterminer le sensibilité aux beta-lactamines, aminosides, macrolides, lincosamides, glycopeptides, fluoroquinolones.

## Streptocoques viridans

### Signification clinique

- ✓ commensaux des muqueuses oropharyngées, mais aussi intestinales et génitales
- ✓ sont isolés par hémoculture ou à partir d'un site habituellement stérile, plus de dix espèces de streptocoques oraux sont responsables d'endocardites chez des malades atteints de valvulopathies
- ✓ *S. mutans* - la plus souvent associée aux caries dentaires.

### Diagnostic bactériologique

**Examen direct:** coque à Gram positif en chaînettes

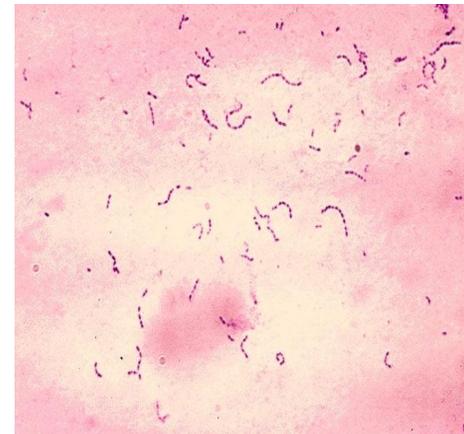
**La culture:** isolement sur gélose au sang

**L'identification** se fait par:

- L'**hémolyse** de type **alpha**
- L'étude de la **résistance** à l'**optochine**
- dépourvus d'antigène de groupe.

**Antibiogramme:**

Les streptocoques oraux sont sensibles à la pénicilline G et macrolides et ont pour la plupart un bas niveau de résistance aux aminosides: les aminosides agissent en synergie avec la pénicilline.



# LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES COQUES GRAM NEGATIF

## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par les *Neisseria meningitidis*

**Habitat:** Rhinopharynx strictement humain

**Voie de transmission:** aérienne à distance courte

**Pouvoir pathogène:**

- Méningite
- Septicémie - Méningococcémie fulminante (syndrome de Waterhouse-Friderichsen ).

**Prélèvement:** On peut prélever le liquide céphalo-rachidien, hémoculture, au niveau de la porte d'entrée (gorge). Le LCR doit rapidement être transporté au laboratoire en évitant tout contact avec le froid.

**Examen macroscopique:** L'aspect du liquide est typiquement trouble.

**Examen microscopique:** Coloration de Gram: présence de petits **diplocoques à Gram négatif**. Leur présence **intracellulaire** est très évocatrice.

**Culture:** gélose chocolat (milieu enrichi)

**Identification:** apparition de colonies transparentes, oxydase +, la fermentation des sucres (glucose, maltose)

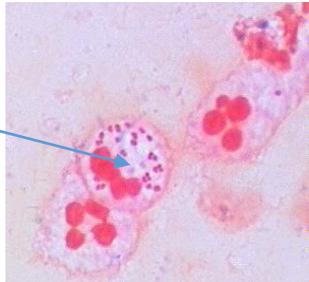
On utilise le sérogroupage par agglutination.

**Sensibilité:**

La plupart des souches isolées en Europe sont sensibles aux bêta-lactamines. Le traitement antibiotique doit tenir compte de la sensibilité du germe et de sa diffusion dans le LCR. Il repose essentiellement sur l'utilisation de Céphalosporine de 3e génération.

**La prophylaxie:**

- Vaccination: Un vaccin efficace extrait des méningocoques a pu être réalisé pour les sérogroupes A et C. En revanche, aucun vaccin n'a été conçu pour le séro groupe B bien qu'il soit le plus fréquent en Europe.
- La chimioprophylaxie repose sur l'administration de rifampicine, durant deux jours, aux sujets contacts.



## LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR **LES COQUES GRAM NEGATIF**

Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par les **Neisseria gonorrhoeae**

**Signification clinique:** Le gonocoque est un parasite humain strict, hôte des muqueuses des voies génitales de l'homme et de la femme. Sa transmission est essentiellement directe (ce germe étant fragile) et presque vénérienne.

**Pouvoir pathogène:**

- Chez l'homme: épididymite, urétrite, prostatite
- Chez la femme: bartholinite, cervicite, salpingite
- Il peut être responsable d'infections extragénitales, une conjonctivite purulente chez le nouveau-né.

**Prélèvement:**

- Chez l'homme: prélèvement de sécrétions urétrales
- Chez la femme: prélèvement au niveau du méat urétral et au niveau du col utérin.
- Éventuellement: Prélèvements de gorge, anal et articulaire.

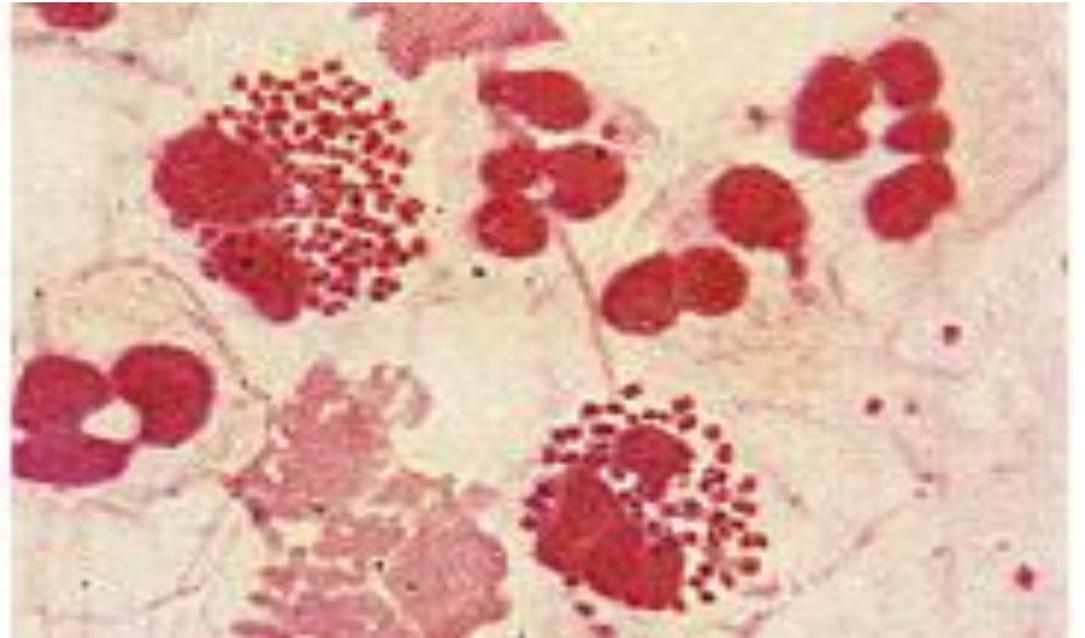
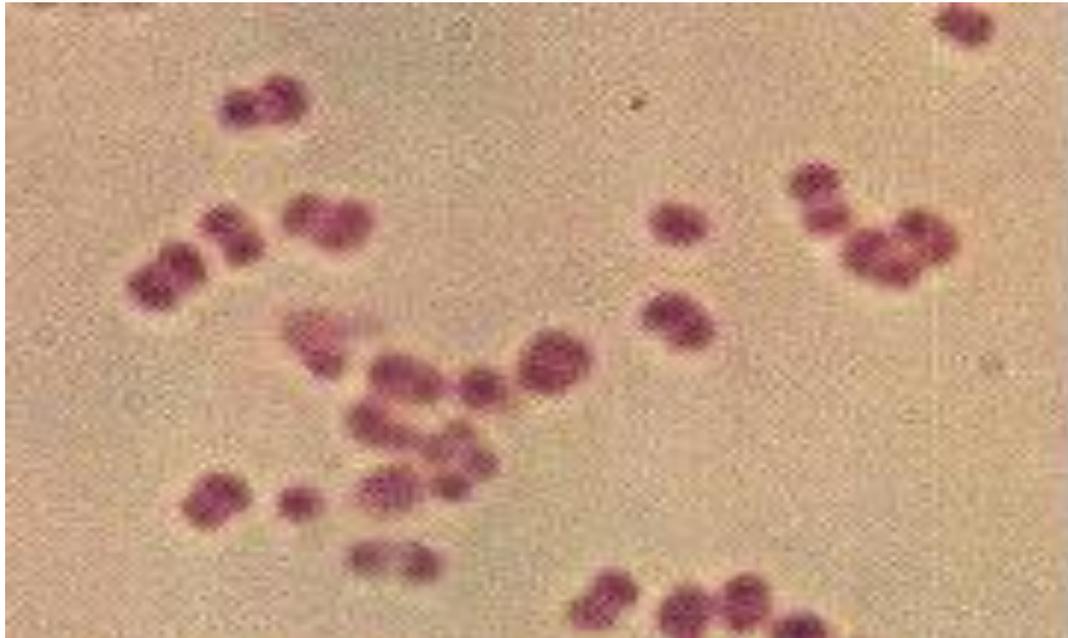
**Examen microscopique:** Les frottis seront colorés par la méthode de Gram et au bleu de méthylène, il sera possible d'observer des **coques Gram-négatif (diplocoques)** et des polynucléaires altérés. Les germes peuvent être intracellulaires ou extracellulaires. La présence de germes **intracellulaires** est très évocatrice.

**Culture:** L'isolement se fait sur une gélose chocolat avec des facteurs de croissance et des antibiotiques (Vancomycine, Colistine, Nystatine) pour empêcher le développement d'autres germes.

**Identification:** apparition de colonies transparentes, oxydase +, la fermentation des sucres (glucose)

**Sensibilité:** Pénicilline, aminosides (**Spectinomycine**), fluoroquinolones et les céphalosporines de 3e génération.

## Coques Gram-négatif (diplocoques) intracellulaires



# LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES BACILLES A GRAM POSITIF AEROBIE

## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Corynebacterium diphtheriae*

**Habitat:** *C. diphtheriae*, parasite strict de l'homme. Transmission directe par voie respiratoire, d'homme à homme.

**Pouvoir pathogène:** L'angine diphtérique commune se présente sous forme d'une angine à fausses membranes située habituellement sur les piliers du voile. L'envahissement de la trachée et du larynx est une complication redoutée du fait du risque d'étouffement (c'est le croup). En dehors du croup, les complications cardiaques (myocardite) et nerveuses (dysphagie et paralysies) dominent le pronostic.

Il existe aussi des formes cutanées de diphtérie où le germe colonise des lésions cutanées.

### Diagnostic bactériologique

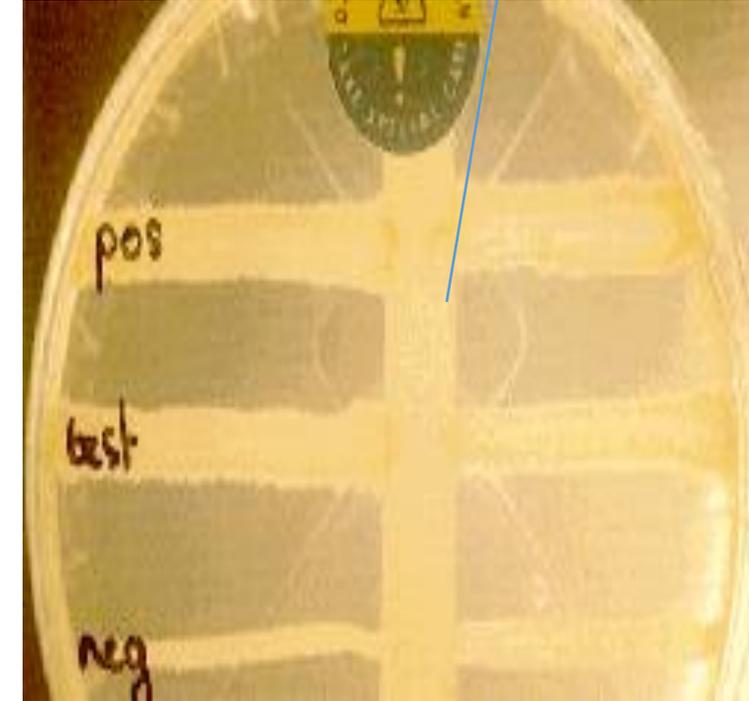
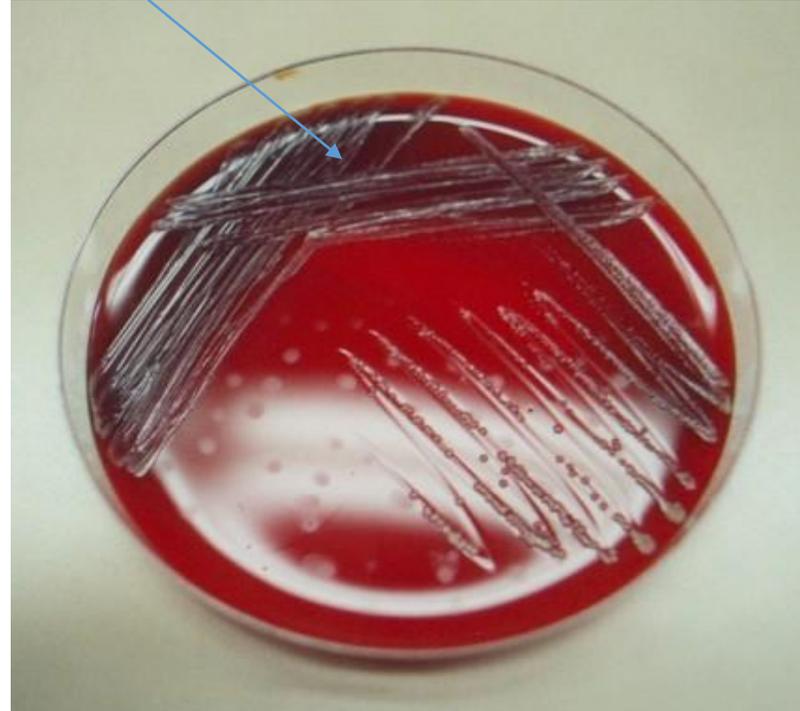
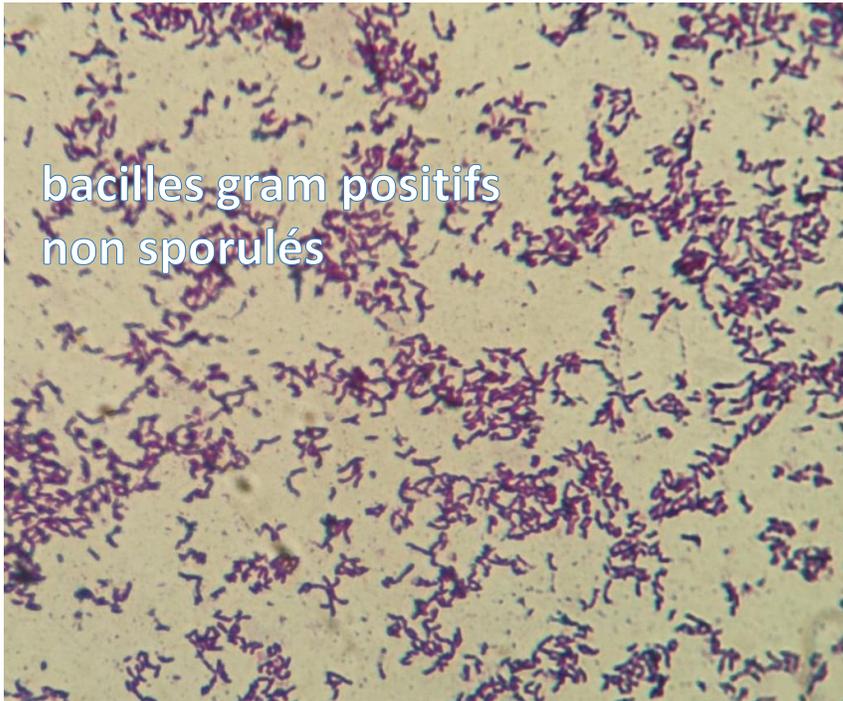
**Prélèvement:** on prélève les fausses membranes

**Examen microscopique:** on observe des **bacilles gram positifs non sporulés**, non capsulés et groupés en lettres majuscules

**Culture:** la culture se fait sur milieu sélectif au tellurite de potassium afin d'éviter la croissance de la flore oropharyngée

## *Corynebacterium diphtheriae*

**Identification:** apparition de colonies noires en taches de bougie. Pour la toxine, nous utilisons le **test d'Elek**. La précipitation en arc affirme le diagnostic.



### **Traitement:**

Ont deux types de traitements:

- **Curatif:** Par une injection de sérum antidiphthérique + antibiotique ( $\beta$ -lactamine ou macrolide) afin d'arrêter la synthèse de toxine.
- **Prophylactique:** vaccination obligatoire avec une anatoxine brute (DT Coq): 2 et 6 mois: DTC, 12 mois DTC, 30-35 mois DTC, à 7 ans avec DT, 14 ans avec DT, après les rappels avec DT à 10 ans intervalle.

# Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Bacillus anthracis*

**Habitat:** Germe ubiquitaire très répandu dans la nature (sol, eau) et les animaux (surtout les herbivores). Cette bactérie est fréquente dans les produits laitiers et carnés.

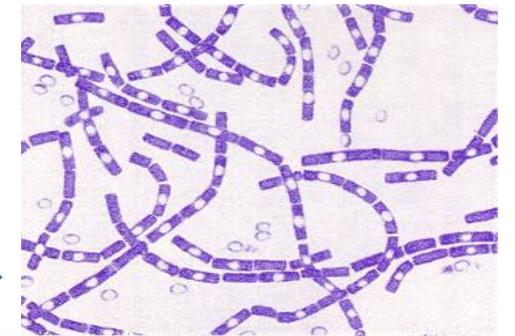
**Pouvoir pathogène:** Maladies développer - charbon ou anthrax

- Pathogène obligatoire (il ne fait partie de la flore normale de l'organisme)
- Transmission: Par blessures cutanées (95%), par inhalation ou par consommation de viande d'un animal charbonneux
- Symptômes: petite vésicule "pustule maligne" (forme cutanée), septicémie, méningite pour la forme respiratoire et pour la forme gastro-intestinale (rare).
- Personnes à risque: Les personnes en contact avec les animaux atteints ou leurs produits

## Diagnostic bactériologique

**Prélèvement:** expectoration, vomissement, et biopsie cutanée

**Examen direct:** bacille Gram + de grande taille, sporulé



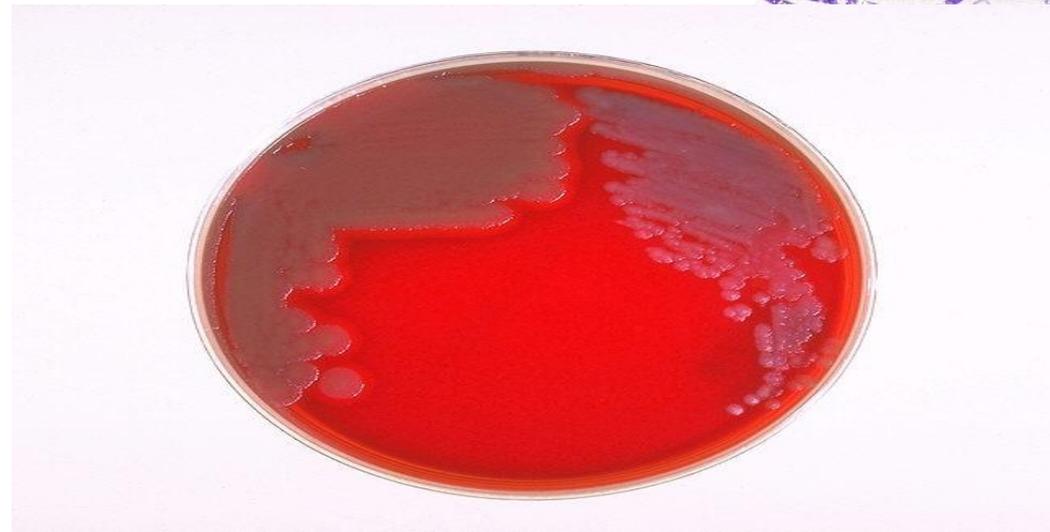
**Isolement et culture:** Gélose au sang

**Identification:** Sur le milieu de culture,



on peut observer des grandes colonies de type R, avec des bords irréguliers.

**Traitement:** Pénicilline G, Érythromycine, Tétracycline.

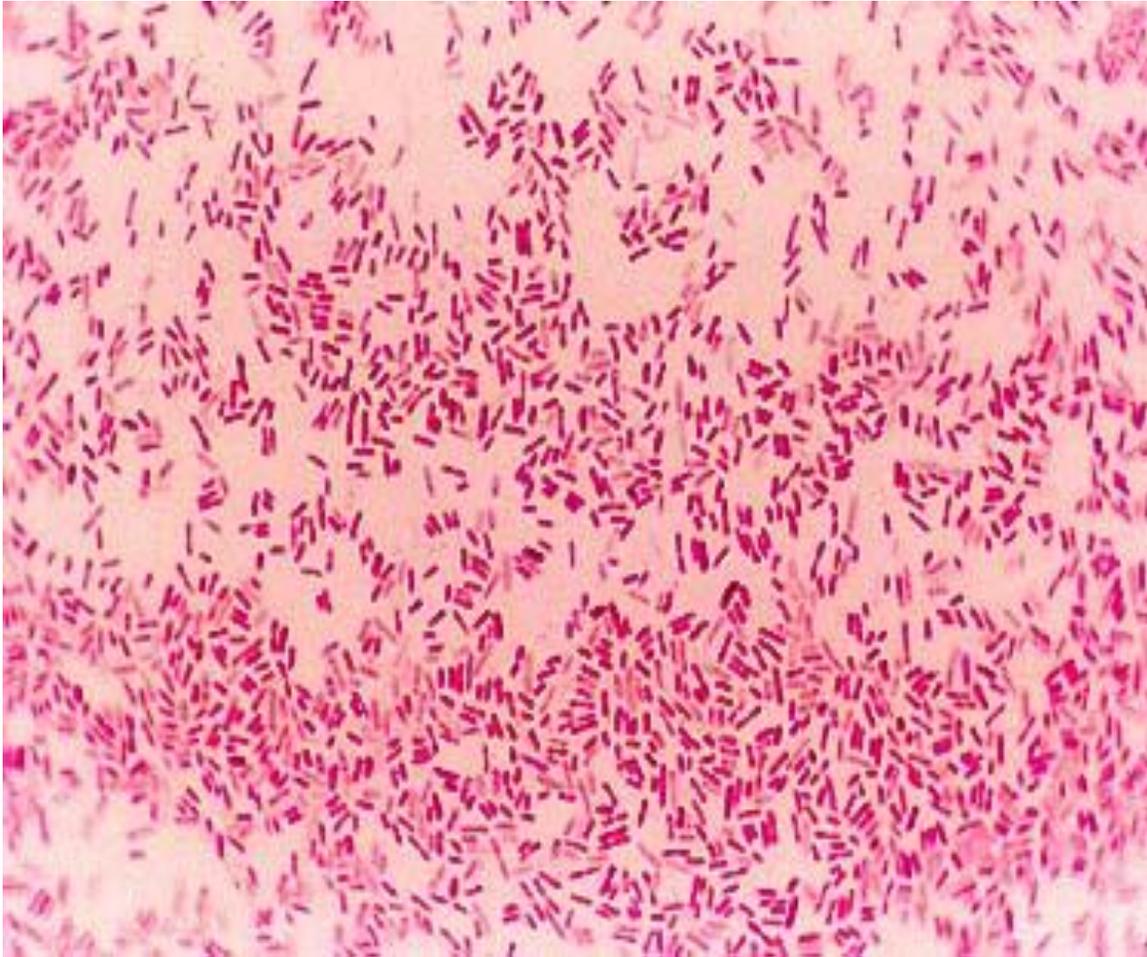


# Le diagnostic de laboratoire des infections causées par les *Enterobacteriaceae*

## CARACTERES GENERAUX ET CLASSIFICATION

- hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux
- **bacilles à Gram négatif**
- poussant sur milieux de culture ordinaires
- fermentant le glucose
- réduisant les nitrates en nitrites
- oxydase négatif
- Famille hétérogène, distinction en genres selon les caractères biochimiques. On distingue:
- entérobactéries commensales du tube digestif (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsellia*) ou saprophytes (*Serratia*, *Enterobacter*), occasionnellement pathogène par déséquilibre de la flore intestinale ou pénétration puis multiplication au niveau des organes normalement stériles.
- entérobactéries pathogènes spécifiques:
  - ✓ Salmonelles, agents des fièvres typhoïdes, toxi-infections alimentaires, septicémie à *Salmonella* «mineures»
  - ✓ Shigelles, agents de la dysenteries bacillaires
  - ✓ *E. coli* dits «pathogène»
  - ✓ *Yersinia*

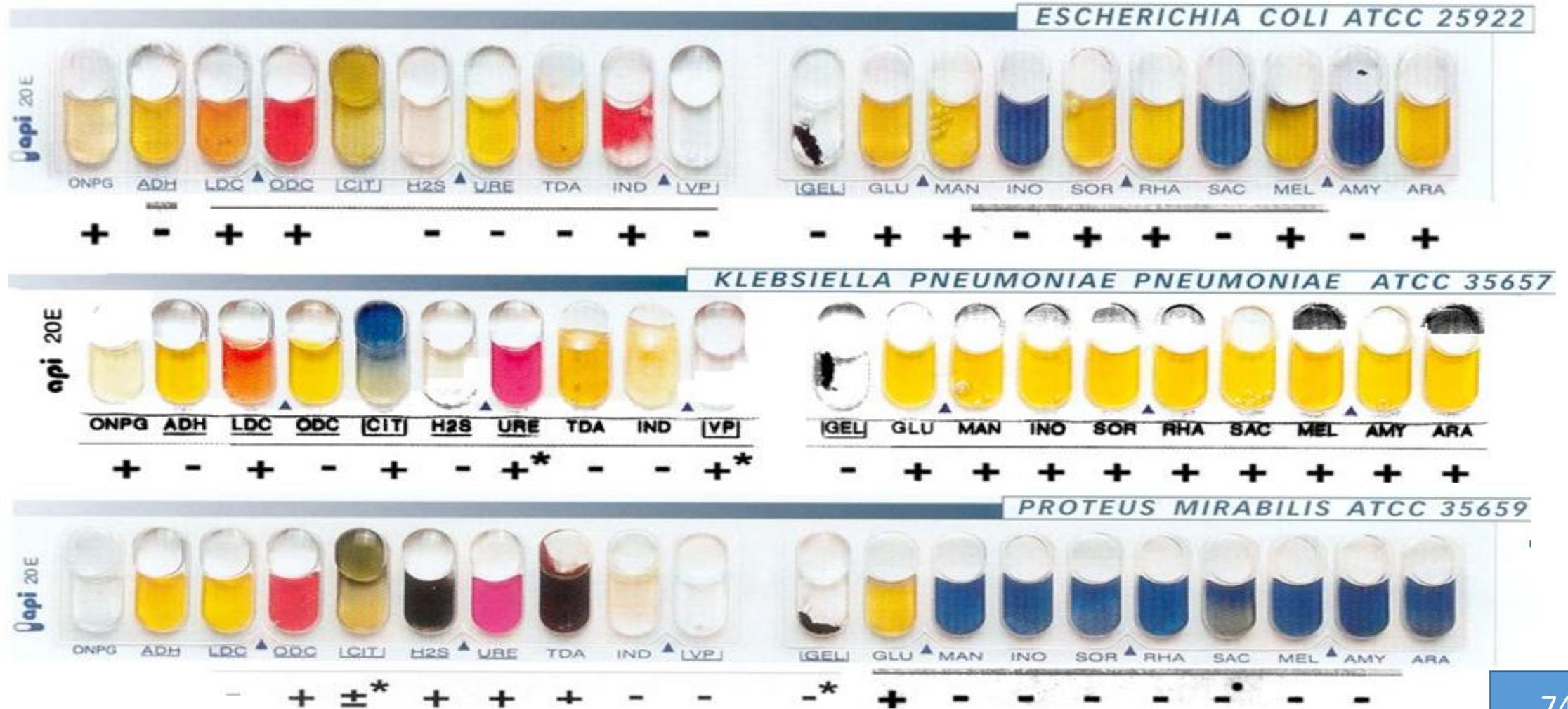
## Les bacilles à Gram négatif



milieu Mac Conkey



## *Enterobacteriaceae* : propriétés biochimiques



## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Salmonelle*

### !!! Grand pathogène

**Genre:** On trouve tous les types sérologiques des *Salmonelle* dans le catalogue de Kaufmann White Leminor. Il existe 5 groupes de *Salmonelle*:

- Groupe A : *S. paratyphi A*
- Groupe B : *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*
- Groupe C : *S. paratyphi C*
- Groupe D : *S. typhi*, *S. enteritidis*
- Groupe E : *S. anatum*

**Habitat:** Les *Salmonelles* dites « *Salmonelles majeures* » sont strictes à l'Homme.

- *S. typhi*
- *S. paratyphi A*
- *S. paratyphi B*
- *S. paratyphi C*

Les *Salmonelles* ubiquistes se trouvent principalement chez les animaux et peuvent contaminer l'Homme. Elles sont responsables des toxi-infections alimentaires (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*)

## **Pouvoir pathogène:**

Le mode de transmission est dans la majorité des cas, oral. Elle affecte d'abord le **tube digestif** entraînant un gonflement intestinal qui après complication provoquera une infection par voie sanguine (**septicémie**) ou par voie lymphatique (**fièvre typhoïde**).

Les salmonelles sont responsables de différentes formes cliniques :

- **Les formes digestives:** les toxi-infections alimentaires suite à la consommation des aliments contaminés par Salmonelle, chose qui peut être mortelle chez les sujets immunodéprimés.
- **La fièvre typhoïde:** seuls les typhique, paratyphique A B C peuvent provoquer la fièvre typhoïde.

La fièvre typhoïde commence par une contamination orale. Après 14 jours d'incubation, l'infection commence par une température ascendante et des diarrhées. A la phase d'état apparaît une septicémie avec une fièvre élevée. Il peut y avoir des complications du genre: cardio-vasculaire, digestives.

- **Les septicémies:** tous les salmonelles peuvent entraîner des septicémies.

## Diagnostic bacteriologique

**Prélèvement:** La nature du prélèvement dépend de la localisation de l'infection:

- **La coproculture:** est la méthode utilisée lors de toutes les infections digestives de salmonellose et dans la fièvre typhoïde. C'est la seule méthodes permettant de rechercher les porteurs de germes
- **L'hémoculture:** est positive dans 90% des fièvres typhoïdes débutantes non traitées

**Transport:** les échantillons doivent être transportés au laboratoire afin de détecter précocement les matières premières contaminées par la salmonelle

**L'identification** sera faite sur :

- isolement sur milieux de culture sélectifs (SS) et apparition de colonies transparentes avec centre noir (lactose –, et production de H<sub>2</sub>S)
- oxydase –
- par la fermentation des sucres (glucose +, lactose –)

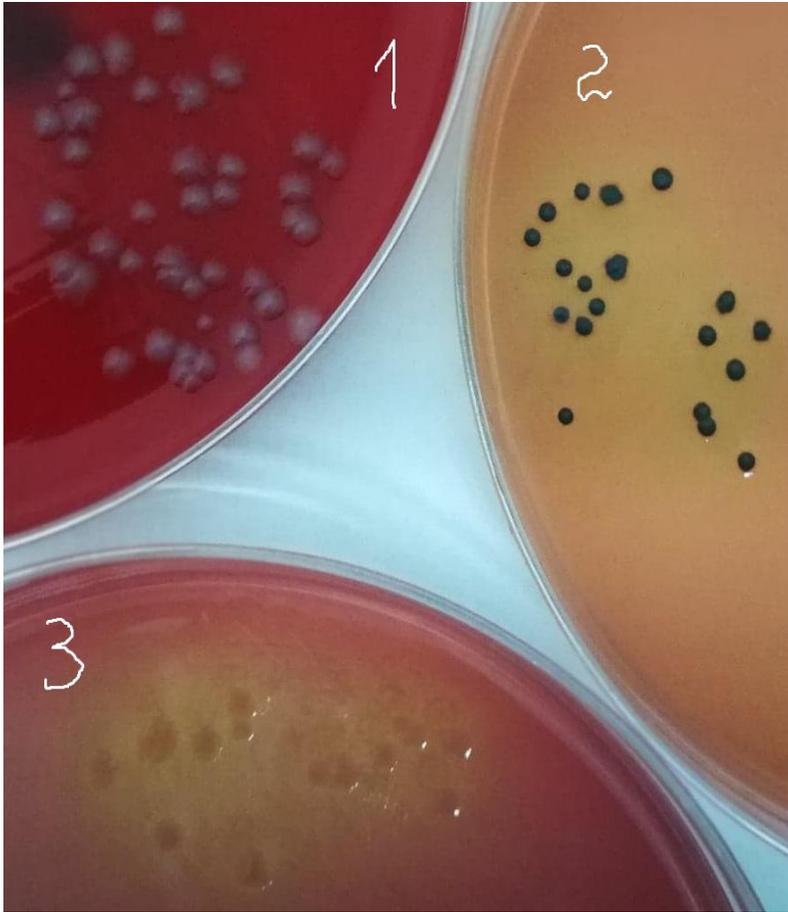
**Sensibilité:**

- Il est essentiel de procéder a un antibiogramme pour déterminer le type d'antibiotique à utiliser en raison des diverses résistances (par exemple la production de bêta-lactamases) de cette bactérie.
- Les antibiotiques les plus efficaces actuellement sont les fluoroquinolones, les céphalosporines de 3ème génération.

**Diagnostic sérologique:**

La recherche des anticorps anti-typho-paratyphique (Sérodiagnostic de Widal et Félix) se fait par agglutination.

***Salmonella***  
sur milieux de culture



## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Shigella*

### !!! Grand pathogène

**Genre:** Il existe 4 groupes de *Shigella*:

- Groupe A : *S. dysenteriae*
- Groupe B: *S. flexneri*
- Groupe C: *S. boydii*
- Groupe D: *S. sonnei*

**Habitat:** Les *Shigella* sont des germes strictes à l'homme. Par une transmission féco-oral à partir des malades ou des porteurs sains.

**Pouvoir pathogène:** Les infections à *Shigella* ont de nombreux facteurs de pathogenite (endotoxine) causant des diarrhées purulentes et sanglantes (**la dysenterie bacillaire**).

### Diagnostic bactériologique:

**Prélèvement:** il se fait par une coproculture où on recherche les hématies, les leucocytes qui sont caractéristiques d'un processus invasif.

**L'isolement et l'identification:** sur milieux de culture sélectifs (SS) - apparition de colonies transparentes (lactose –)

- oxydase –
- par la fermentation des sucres (glucose +, lactose –)

**Sensibilité:** le phénotype sauvage est sensible à tous les antibiotiques actifs sur les entérobactéries (les fluoroquinolones, les céphalosporines).

## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Escherichia coli*

**Habitat :** flore intestinale et muqueuses de l'Homme et des animaux à sang chaud.

**Voie de transmission:** *Escherichia coli* peuvent se transmettre à l'Homme par contact direct avec des personnes infectées, avec des animaux contaminés ou avec l'environnement contaminé par leurs excréments.

### **Pouvoir pathogène:**

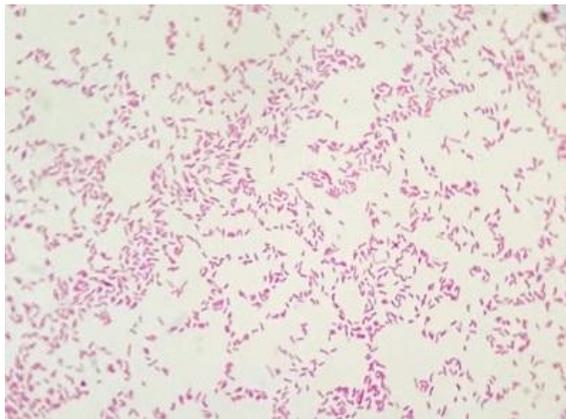
La bactérie *Escherichia coli* est inoffensive, mais dès lors que l'organisme est immunodéprimé, elle devient un redoutable agent pathogène donnant lieu à divers types d'infections :

- Infections urinaires autrement nommées “colibacilloses” : Celles-ci touchent surtout les femmes en raison de leur anatomie. En effet, chez la femme, l'anus se trouve à proximité des voies urinaires, qui sont donc facilement colonisables par les bactéries.
- Septicémies et méningites: *Escherichia coli* sont isolées dans 20% des septicémies et représentent 45% des septicémies dues aux bacilles à Gram négatif.
- Les méningites sont rares, mais graves et affectent surtout les nourrissons.
- Infections intestinales: On reconnaît 4 types d'*Escherichia coli* donnant lieu à des infections intestinales: ***E. coli* entéropathogènes (ECEP), *E. coli* entéro-invasives (ECEI), *E. coli* entérotoxigènes (ECET), *E. coli* entérohémorragiques (ECEH).**
- Autres infections: cholécystites, péritonites, prostatites, infections post-chirurgicales

# *Escherichia coli*

## Diagnostic bactériologique

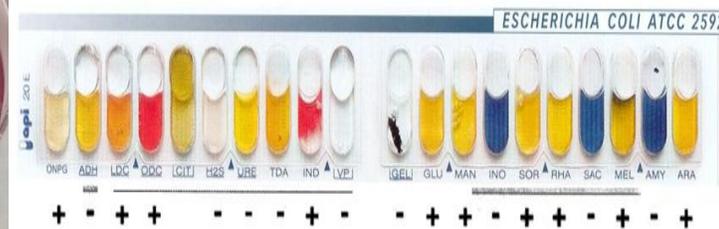
- Dans les infections urinaires, le diagnostic bactériologique repose sur la mise en évidence à l'examen microscopique d'une réaction cellulaire de défense contre l'infection (présence de polynucléaires) et en culture d'un nombre élevé d'*E. coli* ( $\geq 10^5$  UFC/ml).
- Dans les infections locales autres qu'urinaires (péritonites, infections de plaies chirurgicales, etc.), le diagnostic est fait selon les procédés habituels: prélèvements aseptiques, examen microscopique à la recherche d'une réaction inflammatoire et de bacilles à Gram négatif, culture, identification et antibiogramme.



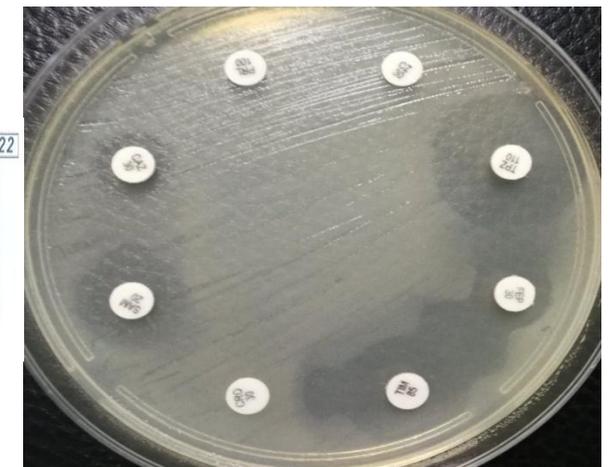
examen microscopique



culture



identification



antibiogramme

## *Escherichia coli*

**Prélèvement:** La nature du prélèvement dépend de la localisation de l'infection: l'urine, la coproculture, l'hémoculture

**L'identification** sera faite sur:

- isolement sur milieux de culture Mac Conkey et apparition de colonies rouge (lactose +)
- oxydase –
- par la fermentation des sucres (glucose +, lactose +)

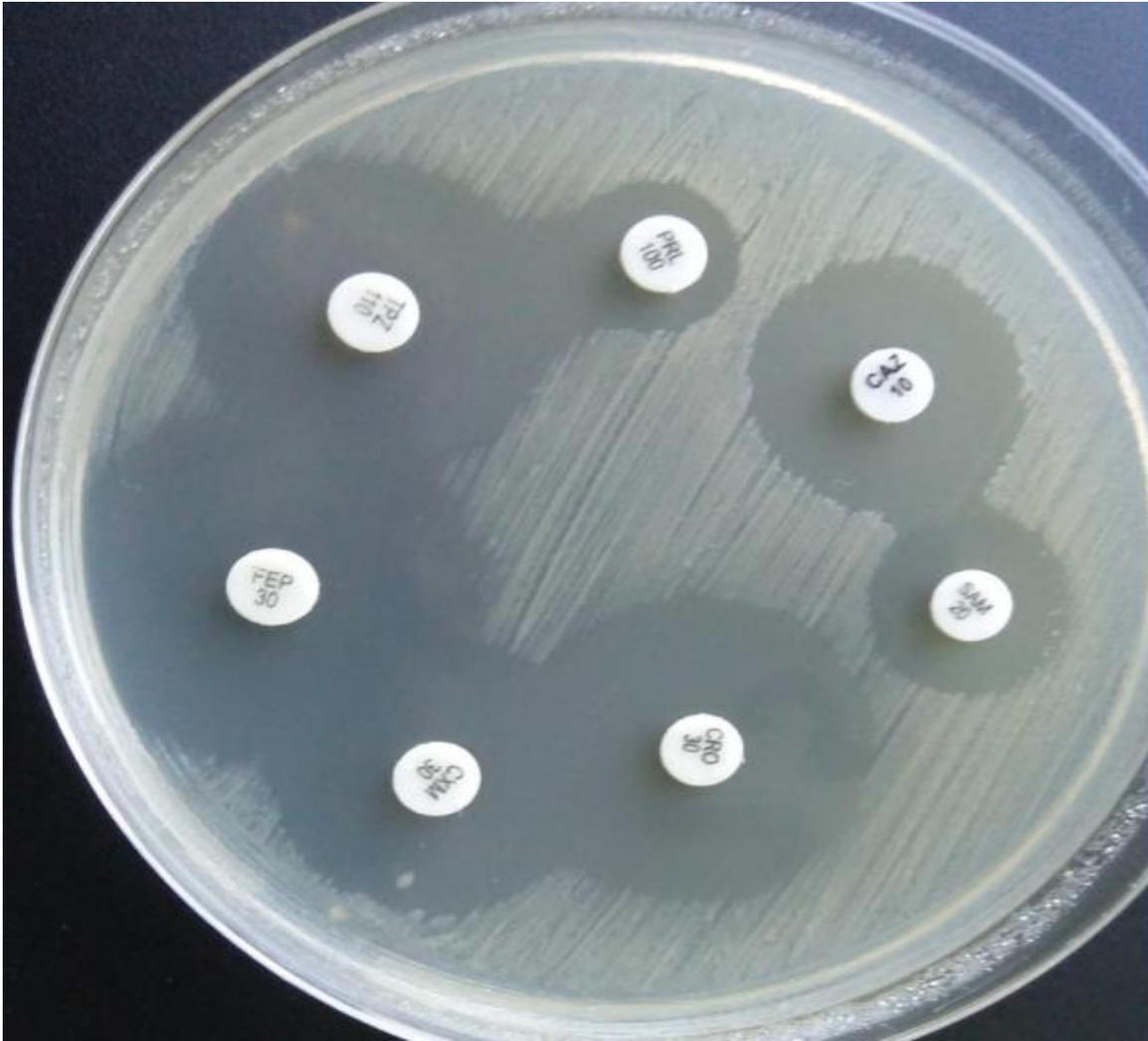
**Sensibilité:**

Les souches sauvages (**le phénotype sauvage**) d'*E.coli* sont sensibles à toutes les bêta-lactamines, aux aminosides, fluoroquinolones, sulfamides, carbapénèmes, et autre antibiotique.

- **Le phénotype pénicillinase** entraîne une résistance aux aminopénicillines et carboxypénicillines.
- *E. coli* synthétise une **céphalosporinase** qui donne une résistance à céphalosporines de 1,2,3ème génération, mais aussi à l'ampicilline (même en présence d'acide clavulanique).
- *E. coli* peut être porteur de plasmides de résistance aux beta-lactamines “ **à spectre étendu** “ qui rend aléatoire les succès des thérapeutiques à de très nombreuses beta-lactamines, y compris les céphalosporines de 3 et 4ème génération.
- **Phénotypes de résistance aux carbapénèmes:** sont résistants à toutes les bêta-lactamines.

# Phénotypes de résistance

## Pénicillinase PASE



## Céphalosporinase CASE



# Phénotype beta-lactamase à spectre étendu BLSE

synergie TZP-CIVG et TIM-CIIIG  
bouchon de champagne



## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Klebsiella*

**Habitat :** flore intestinale et muqueuses des voies respiratoires de l'Homme et des animaux.

**Pouvoir pathogène :**

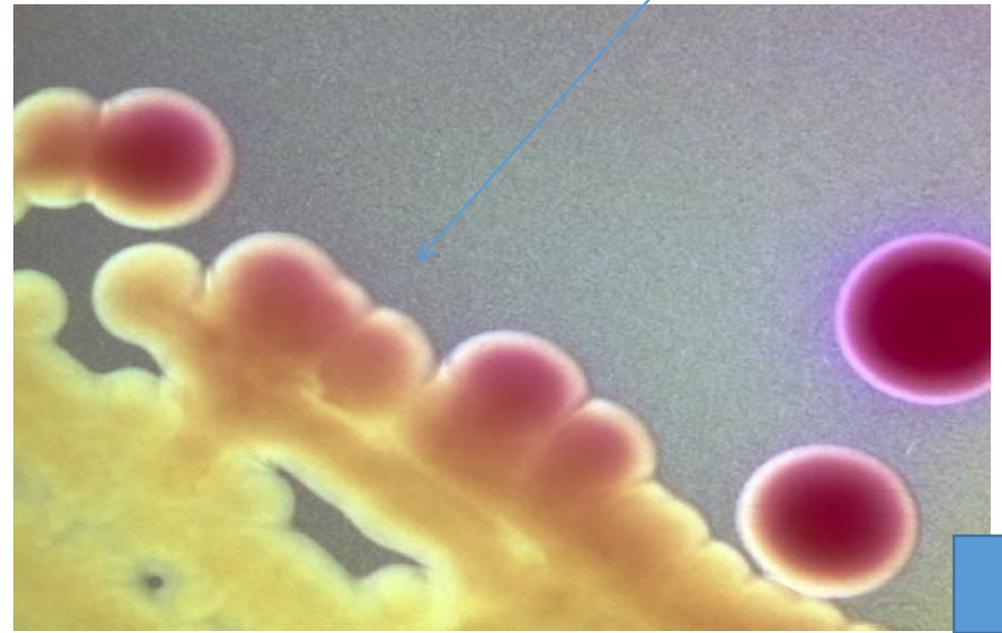
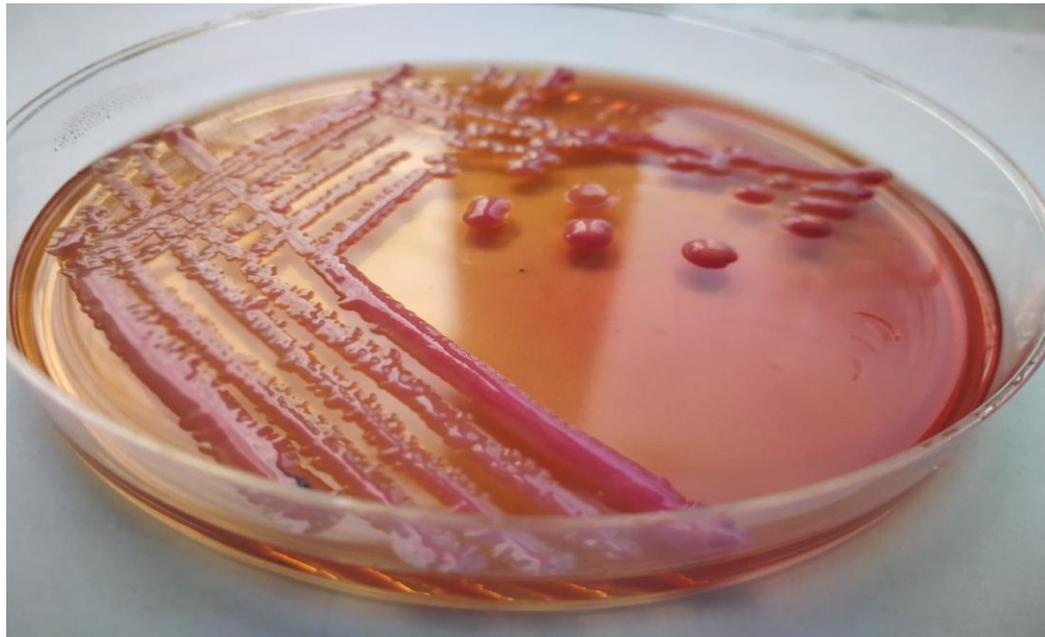
On reconnaît 7 types de *Klebsiella* dont 4 jouent un rôle important dans la pathologie humaine : *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozenae*, *K. rhinoscleromatis*.

- ***K. pneumoniae***: est l'espèce la plus fréquemment isolée du genre, et est souvent la cause d'infections nosocomiales chez les personnes immunodéprimées et âgées, elle cause également des infections respiratoires basses, des plaies chirurgicales, des voies urinaires ou une bactériémie.
- ***K. oxytoca***: diffère de la bactérie précédente seulement par la production d'indole, mais elles sont toutes les deux impliquées dans des infections similaires.
- ***K. rhinoscleromatis***: (associée au rhinosclérome) est caractérisée par une rhinite chronique hypertrophique avec des lésions granulomateuses.
- ***K. ozenae***: (associée à l'ozène) cause des maladies inflammatoires chroniques avec des suppurations muqueuses et fétides accompagnées d'une atrophie de la muqueuse nasale qui peut donner lieu à une perte de l'odorat.

# *Klebsiella*

## Diagnostic bactériologique

- Le prélèvement se fait principalement dans les voies respiratoires (échantillons nasopharyngés) et dans les voies urinaires, mais peut se faire également dans les voies génitales et dans le sang.
- Après isolement de la bactérie, des colonies apparaissent rondes bombées, d'aspect plus ou moins muqueux en 18 heures, à 37°C. Les colonies sont lactose + sur les milieux utilisés pour les entérobactéries qui contiennent du lactose, mais deviennent lactose – après 24 heures (phenomene de cameleonaj).



# *Klebsiella*

## Sensibilité aux antibiotiques

!!! **Le phénotype sauvage** est caractérisé par un faible niveau de résistance à: amino- et carboxi-penicillines (activité restauré par les inhibiteurs de bêta-lactamase).

Autres antibiotiques à tester: aminosides, fluoroquinolones, trimethoprime-sulfaméthoxazole, furanes.

**Le phénotype producteur de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu(BLSE)** montrent une

- résistance augmenté aux :
  - amino-, carboxi-, ureido-penicillines
  - cefalosporines I, II, III, IVème generation
  - aztreonam
- sensibilité à: ceftazidime, ceftioxime, ceftazidime-tazobactam, ceftolozane-tazobactam, ceftazidime-avibactam, ceftazidime-meropenem, ceftazidime-meropenem-tazobactam, ceftazidime-meropenem-tazobactam-avibactam, ceftazidime-meropenem-tazobactam-avibactam-meropenem, ceftazidime-meropenem-tazobactam-avibactam-meropenem-meropenem.



## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Proteus*

**Habitat:** *Proteus* est une bactérie commensale du tube digestif.

### **Pouvoir pathogène:**

Il existe 8 espèces de *Proteus*, mais seulement 3 espèces ont une importance médicale:

- *Proteus vulgaris*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus penneri*

Elles sont toutes les trois responsables d'infections urinaires et de plaies cutanées.

On rencontre également la bactérie *Protéus* dans :

- Les pathologies de l'oreille moyenne.
- La mastoïdite pouvant être dans certains cas à l'origine de surdité.
- La survenue d'abcès cérébral.
- La méningite.
- Des ulcères de la cornée
- Les sépticémies.

***Proteus mirabilis*-invasion**



# *Proteus*

## Diagnostic bactériologique

- On effectue des prélèvements d'urine, d'exsudats de plaies et de sang, mais aussi de liquide céphalo-rachidien.
- Après isolement de la bactérie, celle-ci forme un film de surface et dégage une odeur désagréable de putréfaction.
- Sur le bouillon perturbe uniformément l'environnement, forment un film de surface et dégage une odeur de putréfaction
- Sur gélose et gélose au sang il peut croître aussi sur les sections non-encementé, sous la forme d'ondes concentriques qui envahit toute la surface du milieu de culture
- Sur gélose incliné le phénomène d'escalade est observée
- Sur un milieu sélectif lactosé se développe sous la forme des colonies lactose-négatives avec la couleur de milieu, et avec le centre de couleur noire.
- Les espèces du genre *Proteus* sont généralement sensibles aux bêtalactamines, aminosides, fluoroquinolones. triméthoprime-sulfaméthoxazole et ils sont naturellement résistants à furanes, cyclines et polymyxines.

# LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR DES AUTRE BACILLES A GRAM NEGATIF

## Le diagnostic bactériologique de l'infection produite par *Pseudomonas*

!!! Pathogène “opportuniste” aérobie strict

**L'espèces de type:** *Pseudomonas aeruginosa*

**Habitat:** environnement, dans la flore intestinale humaine, la peau normale et dans l'hôpital “ils préfèrent l'humidité”

**Voie de transmission:** introduction accidentelle dans un organe ou contamination de la peau ou des muqueuses par: mains et objet du personnel soignant, ventilation, produits de nettoyage, éviers, etc.

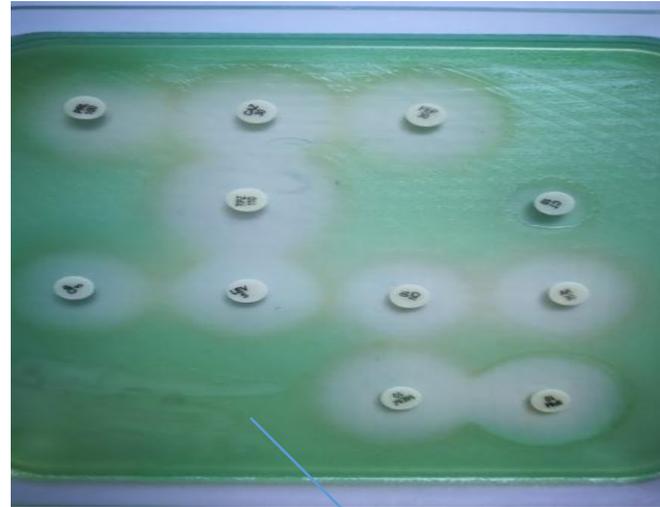
**M.O:** Les bacilles du genre *Pseudomonas* sont des **bacilles à gram négatifs**, non sporulé, non capsulé, mobile à flagell polaire

**Pouvoir pathogène:** *Pseudomonas aeruginosa* est un germe typique des infections nosocomiales.

- infections pulmonaires chez les patients atteints de fibrose kystique pneumonies chroniques qui progresse avec la destruction massive des poumons
- des endocardite - dans le cas de l'abus des drogues par voie intraveineuse
- des infection de l'oreille : infection du canal externe de l'oreille, otite moyenne chronique
- infections des brûlures
- septicémie: ce germe est fréquemment responsable de septicémies mortelles surtout chez le patient immunodéprimé
- autres infections: des voies urinaires, cornées ( chez ceux avec des lentilles de contact), système nerveux, de l'appareil locomoteur

## *Pseudomonas* Diagnostic bactériologique

**Culture:** peut être isolé sur des milieux de culture habituels (gelose-sang) et sur des milieux lactoses (Mac Conckey).

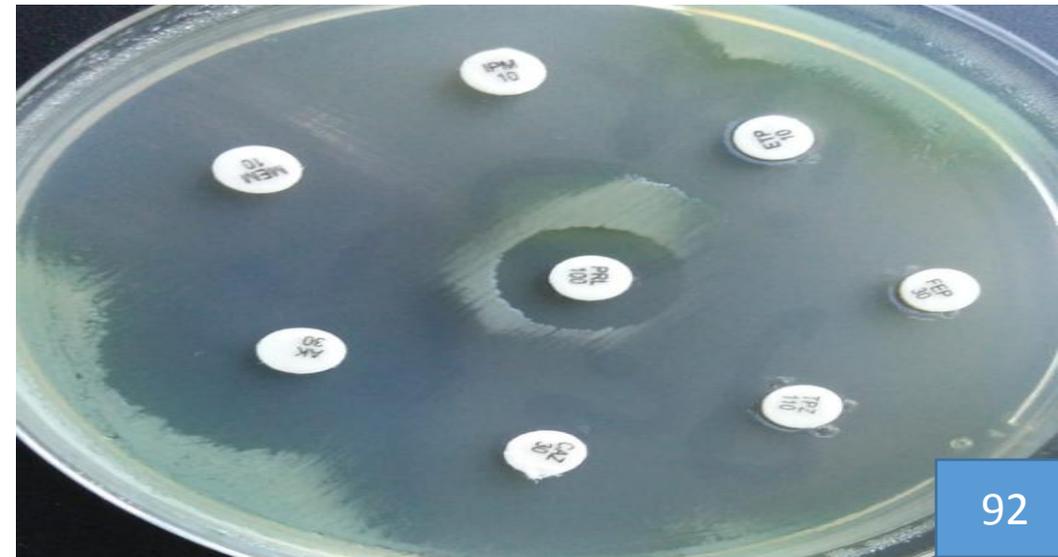


### Identification:

- sur gelose au sang les colonies sont grandes, hémolytique et peut parfois avoir un éclat métallique
- sur les milieu lactosés les colonies sont lactose -
- sur gelose simple tourne le milieu en vert due à la sécrétion d'un pigment non-fluorescent bleu (piocianine); autres souches de *P. aeruginosa* produisent un pigment vert fluorescent (pioverdine), un pigment rouge foncé (piorubine) ou un pigment noire (piomelanine).
- la culture a d'habitude l'odeur des fleurs d'acacia
- la réaction de l'oxydase positive
- la différenciation par rapport à d'autres espèces du genre est basé sur les caractéristiques biochimiques.

## *Pseudomonas* Sensibilité aux antibiotiques

- *Pseudomonas aeruginosa* est redouté pour sa multiresistance.
- La réalisation de l'antibiogramme est indispensable.
- *P. aeruginosa* est naturellement résistant aux aminopénicillines, à l'association amoxicilline-acide clavulanique et aux céphalosporines de première et deuxième génération.
- *P. aeruginosa* peut facilement acquies une résistance aux antibiotiques, les souches les plus dangereuses sont celles de l'hôpital («germes redoutables de l'hôpital»).
- **Les antibiotiques actifs anti-*Pseudomonas*** sont: aminoglycoside, fluoroquinolones, cefalosporines IIIème et IVème génération, carbapenemes.
- **Pénicillines anti-*Pseudomonas***: Pipéracilline, Ticarcilline.
- Dans les infections grave on va associe une aminoglycoside (gentamicine, amikacine, tobramycine) avec une beta-lactamine (Ticarcilline, Pipéracilline ou Mezlocilline).



# LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR LES BACILLES A GRAM POSITIF ANAEROBIE

## *Clostridium botulinum*

!!! Grand pathogène (anaérobie strict)

**Habitat:** Mixte (le sol, les intestins des animaux, fruits, légumes et l'homme)

**Voie de transmission :** Contamination par les aliments infectés.

**M.O :** Des bacilles gram +, avec des extrémités arrondies. Le clostridium est mobile et spore thermorésistant.

**Pouvoir pathogène :**

- La pathogénicité chez l'homme n'est pas due à la bactérie elle-même, mais plutôt à sa toxine.
- L'intoxication survient après 18 heures de l'ingestion, causant des paralysies bilatérales et symétriques des muscles bucco-pharyngés, dysphagie, paralysie de déglutition. Ceci est accompagné de nausées, vomissements, constipation avec une température normale (en cas d'absence de surinfection).

**Diagnostic: CLINIQUE**

- On utilise la recherche et le typage de la toxine dans les aliments et dans le sérum des malades.

**TRAITEMENT**

- **Prophylactique:** la surveillance de la fabrication des conserves - a fait diminuer fortement la fréquence du botulisme. C'est une maladie infectieuse à déclaration obligatoire.
- **Curatif:** le traitement en service de réanimation est surtout symptomatique :
  - ✓ sérothérapie polyvalente puis monovalente
  - ✓ anatoxinothérapie en un point différent de l'organisme.

## ***Clostridium tetani***

!!! Grand pathogène (anaérobie strict)

**Habitat:** Dans le sol: sous forme sporulée. Dans l'hôte: le tube digestif.

**Voie de transmission:** Par les traumatismes cutanés.

**M.O:** Des bacilles Gram +, sporulés, donnant aux bacilles un aspect en clou ou baguette.

**Pouvoir pathogène:** *C.tetani* est germe non invasif, les spores restent au niveau de la porte d'entrée (blessures, brûlures). Après une incubation de 5 à 6 jours de diffusion de toxine surviennent les contractures, fièvres et complications respiratoires voire l'asphyxie.

TOUS LES MAMMIFÈRES SONT SENSIBLES AU TÉTANOS !!!

### **Diagnostic: CLINIQUE**

Nous trouvons rarement les bacilles au niveau du point d'inoculation. La toxine peut être transformée en anatoxine par chauffage ou formalisation

### **TRAITEMENT**

**Curatif:** Utilisation de: Sérum anti-tétanique, Anatoxine, Pénicilline G

**Préventif:** Le vaccin DTP (dyphtro-tetano-pertusis) ou le DT coq le triple vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la toux convulsive. Il doit être administré par 3 injections cutanées à un mois d'intervalle entre elles. Il faut un rappel une année après puis chaque 7ans.

!!! CE VACCIN EST OBLIGATOIRE

## LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR MYCOBACTERIUM

**Habitat:** *Mycobacterium tuberculosis* est une bactérie pathogène stricte à l'homme. Elle est transmise par voie aérienne en résistant au froid.

**Pouvoir pathogène:** *Mycobacterium tuberculosis (BK)* est l'agent de la tuberculose. C'est une maladie qui atteint principalement l'arbre respiratoire, elle peut aussi être extra-respiratoire dans les ganglions, les méninges, les articulations et les zones uro-génitales.

La forme contagieuse de la tuberculose est la forme pulmonaire cavitaire, les autres sont peu ou pas contagieuses.

### Diagnostic bactériologique

#### Prélèvement:

- pour les formes pulmonaires on prélève les crachats par expectoration
- pour les formes non pulmonaires on prélève le LCR, le liquide pleural et le liquide articulaire, urine, fèces, biopsies de la peau, liquide d'aspiration, etc.

**Examen microscopique:** a cause de leur morphologie et leur propriété de bacille acido-alcool résistant (BAAR) ne se colorent pas par la coloration de Gram. On utilise donc la coloration Ziehl Neelsen où on peut voir les bacilles de Koch colorés en rose sur un fond bleu. Les bacilles sont disposés en amas en palissade irrégulière.

Technique de Ziehl Neelsen:

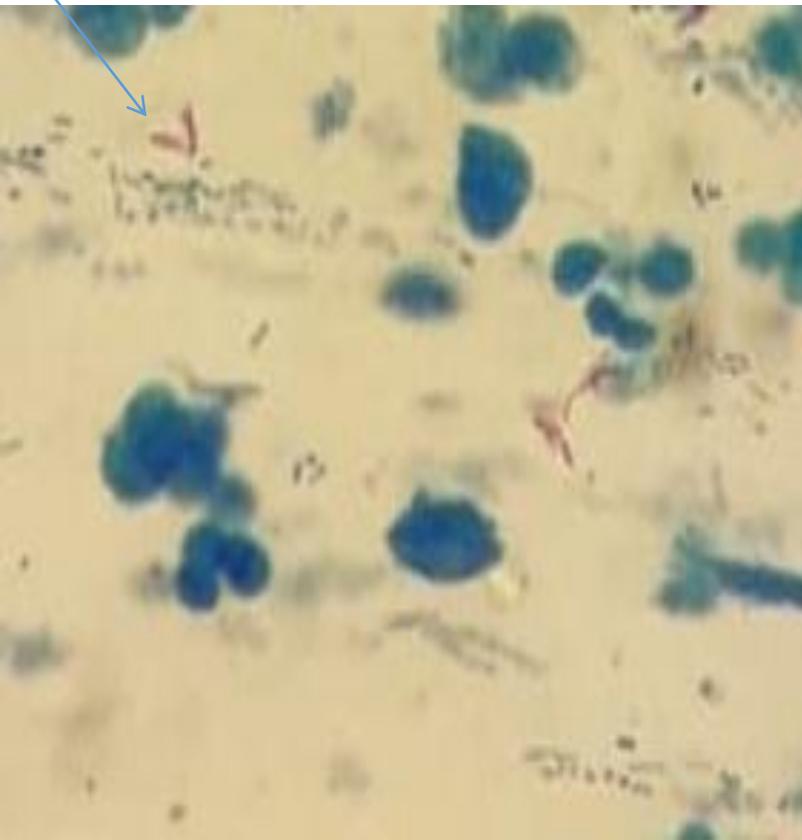
- la solution de carbolfuxine comme la première colorant,
- la solution d'acide-alcool, comme décolorant,
- et la solution de bleu de méthylène pour recoloration

## *Mycobacterium tuberculosis* (BK) Diagnostic bacteriologique

**Culture:** *Mycobacterium tuberculosis* est une bacille à croissance très lente qui dure de 2 à 6 semaines et sa culture nécessite des milieux spéciaux. Le milieu le plus utilisé est celui de Löwenstein-Jensen.

**Identification:** Est basé sur les caractères culturaux et biochimiques, seulement dans les laboratoires spécialisés.

BAAR



Le système Bactec pour le test de sensibilité



## *Mycobacterium tuberculosis (BK)*

**Sensibilité:** les tests de sensibilité pour les chimiothérapies tuberculose se fait par culture sur des milieux contenant des chimiothérapeutiques anti-tuberculose, mais en raison de leur croissance lente et la multiplication du pourcentage des souches multi-résistantes, on préfère le système Bactec, qui permet une lecture beaucoup plus rapide des échantillons (4-5 jours après l'inoculation).

**Traitement prophylactique:** Ce traitement consiste à l'injection du vaccin **BCG** (Bacille Calmette et Guérin) par voie intradermique.

**Traitement chimio-prophylactique:** Isoniazide pendant 6 mois.

**Traitement curatif:** Le traitement antimicrobien dans la tuberculose dure 6-12 mois, et pour éviter la sélection des mutants résistants est nécessaire d'associer au moins trois chimiothérapie antituberculeuse.

**Les antituberculeuse de première ligne** sont: l'isoniazide (HIN), rifampicine, pyrazinamide, éthambutol et streptomycine.

**Les antituberculeuse de deuxième ligne**, sont utilisé uniquement pour le traitement de la tuberculose résistante aux médicaments de première ligne, elles sont les suivants: kanamycine, amikacine, ethionamide, cycloserine, acide paraaminosalicylic (PAS), etc.



## LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PRODUITE PAR SPIROCHETA *Treponema pallidum*

**Habitat:** strictement humaine. Font partie de la flore normale de la muqueuse des voies respiratoires supérieures et de la muqueuse génitale chez l'homme.

**Voie de transmission:** maladie strictement humaine à transmission habituellement directe au cours des rapports sexuels et de répartition mondiale.

**Pouvoir pathogène:** syphilis de l'adulte / congénitale.

**Diagnostic:** Le diagnostic est direct (bactériologique) ou indirecte (serologique).

**Prélèvement:**

- Directe: de toute ulcération ou érosion génitale ou anal. La recherche directe des tréponèmes se fait uniquement dans la sérosité prélevée sur des lésions primaires et secondaires. Les prélèvements se font au niveau du chancre syphilitique plus exceptionnellement.
- Indirecte: par les anticorps anti-tréponémiques.

**Examen microscopique:** Bactérie minces spirales hélicoidales, filiformes, mobiles (mouvements caractéristiques de rotation du corps bactérien et flexion sinusoidale) non enveloppés et non sporulés.

L'identification spécifique de *T. pallidum* peut être fait en utilisant des anticorps marqués avec la fluorescéine. Les bactéries peuvent aussi être observées par imprégnation d'argent histologique des échantillons, faite à partir des lésions cutanées.

## *Treponema pallidum*

**Culture:** !!! Non cultivables en vitro la seule façon de les maintenir en vie dans des conditions de laboratoire est l'incubation intratesticulaire au lapin.

**Diagnostic sérologique:** C'est la méthode de choix dans le diagnostic de la syphilis. Il ya **2 types de tests** (spécifique et non spécifique), les deux avec une plus faible sensibilité de la syphilis primaire, mais avec une sensibilité de 100% dans le secondaire.

➤ **Tests non spécifiques (non-treponemiques):** Utilise des antigènes non-treponemiques (cardiolipines) qui met en évidence les anticorps antilipoidiques. Les réactions qui sont couramment utilisés sont VDRL (réaction de floculation) et la réaction Bordet-Wassermann (RBW - réaction de fixation du complément).

Les tests non spécifiques sont positifs 4-6 semaines après l'infection, c'est à dire à 1-2 semaines de l'apparition du chancre. Les titres augmente au cours de la période secondaire, pour diminuer lentement pendant la période de latence et pendant la syphilis tertiaire. Le traitement de la syphilis primaire et secondaire provoque de la diminution rapide du titre des anticorps, dans la plupart des cas en 6-18 mois.

➤ **Tests spécifiques:** Utilise les antigènes tréponémiques. Est effectuée:

- chez les personnes qui ont des tests non spécifiques positif pour confirmer leur diagnostic
- ou pour ceux ayant une sérologie négative, mais avec des éléments épidémiologiques et cliniques qui préconise la syphilis.

Les tests spécifiques les plus utilisés sont les suivants:

- FTA-ABS (Fluorescent treponemal antibody absorption)
- TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutination).

La sérologie est négative dans 25-30% des patients atteints de syphilis tertiaire.

**VDRL**



## *Treponema pallidum*

### **Sensibilité**

- Sensible aux beta-lactamines (pénicilline G), les tétracyclines, les macrolides.
- Il est résistant aux aminosides.
- L'antibiotique de choix pour traiter la syphilis est la pénicilline.
- Pour la syphilis primaire et secondaire, on utilise de préférence: la benzatin-pénicilline (pénicilline retard).
- Pour la syphilis congénitale et tertiaires on utilise la pénicilline G.
- Pour les patients allergiques à la pénicilline, on va utiliser la doxycycline et la tétracycline.
- En cas de neurosyphilis et pour les femmes enceintes se utilise seulement la pénicilline.
- Il y a des échecs dans la thérapie avec l'érythromycine, parce qu'il existe des souches résistantes.

# LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DES INFECTIONS PRODUITES PAR DES CHAMPIGNONS

## LE GENRE *CANDIDA*

Les *Candida* sont des parasites humains ou animaux.

L'homme constitue le principal "réservoir" de *Candida albicans*.

Le champignon y végète à l'état saprophyte dans la cavité buccale ou le tube digestif, plus rarement les voies génitales.

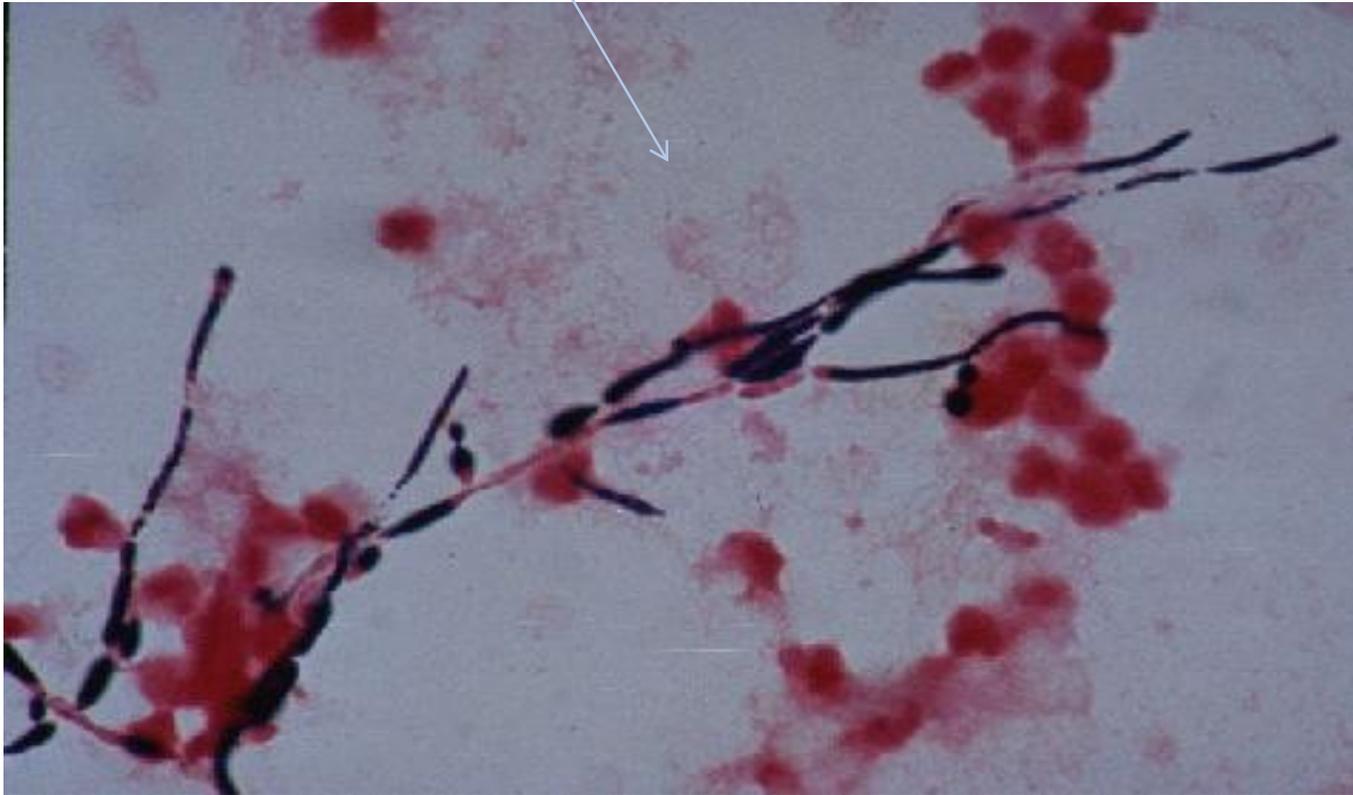
Les maladies=candidoses

Les facteurs favorisant des candidoses incluent:

- Des facteurs physiologiques: âge, grossesse
- Des facteurs locaux: macération, humidité, traumatismes, brûlures,
- Des altérations de l'organisme: diabète, immunodépression
- Des facteurs iatrogènes: antibiotiques, corticoïdes, immunosuppresseurs, cathéters intraveineux

## DIAGNOSTIQUE DE LABORATOIRE

Dans les candidoses superficielles les prélèvements in situ mettent facilement en évidence levures et filaments par **examen direct** et par **culture sur milieu de Sabouraud**.



## TRAITEMENT

La plupart des infections superficielles à *Candida* répondent aux topiques

- à base de nystatine,
- d'azolés ou
- d'amorolfine.

Dans les infections orales, la nystatine en comprimés ou en suspension et l'amphotéricine B en comprimés sont utiles.

Chez les patients immunodéprimés, il est souvent nécessaire d'utiliser un médicament oral à bonne absorption comme le fluconazole, l'itraconazole ou le kétoconazole.

Pour les infections vaginales, on dispose habituellement de comprimés gynécologiques pour une application locale d'une dose unique d'azolés, par exemple de clotrimazole ou de miconazole. Lorsque le traitement local est impossible, on peut donner une dose unique de fluconazole ou d'itraconazole.

Pour la paronychie, les azolés en topiques sont utiles sous forme de solutions pendant 3 à 4 mois ou jusqu'à ce que les replis péri-unguéaux paraissent moins tuméfiés.

## BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty third informational supplement, CLSI Document M100-S23. Wayne PA: CLSI; 2013
- Elliot T, Hastings M, Desselberger U. Medical Microbiology. Third Edition. Blackwell Science Ltd. 1997
- Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance 2013;Version 1.0:4-10
- Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF. Medical Microbiology. Fifteenth Edition. Churchill Livingstone, 1998
- Greenwood D. Antimicrobial Chemotherapy. Oxford University Press, 1989
- Grosjean J, Clave D, Archambaud M, Pasquier C. Bactériologie et Virusologie pratique. De Boeck Supérieur, 2017
- Jarlier V. Enterobacteries et  $\beta$  lactamines, L'antibiogramme. MPC Vigot 1985, 87-101
- Jehl F, Chomar M, și colab. De la antibiogramă la prescripție. Ediția a II-a. Editura Științelor Medicale, București, 2003

- Licker M, Moldovan R, Crăciunescu M, Dumitrașcu V. Rezistența la antibiotice - istorie și actualitate. Editura Eurostampa, Timișoara, 2002
- Licker M, Moldovan R și colab. Curs de Microbiologie specială Vol I, Bacteriologie, Lito UMF, Timișoara 2013
- Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6ème édition, 2011
- Mahon C, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. Second Edition. W.B. Saunders Company, USA, 2000
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. New York: Churchill Livingstone, 2010
- McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Twenty-first Edition. Saunders Elsevier, USA, 2007
- Mims CA, Dockrell HM, Goering RV, et al. Medical Microbiology. Third Edition. Mosby-Year Book Europe Limited, 2006
- Moldovan R și colab. Lucrări practice de Microbiologie, Editura Victor Babeș, Timișoara 2013, ISBN 978-606-6456-19-5
- Pilly E. Maladies Infectieuses, APPIT, 12Edition, Montmorency, 1992