

Bases Microbiologiques pour la clinique

Pr M H Nicolas Chanoine
Laboratoire de Microbiologie
CHU Beaujon

Connaissances pratiques pour
augmenter le succès diagnostique

5 étapes

I - Prélèvement des produits biologiques

II - Conservation et acheminement des prélèvements jusqu'au service de bactériologie

III - Examen microscopique (examen direct)

IV - Ensemencement + incubation ou amplification génique

V - Identification, sensibilité aux antibiotiques

I- Prélèvement des produits biologiques

- Les conditions dans lesquelles est fait le prélèvement conditionnent la suite
- Bactéries partout :
 - environnement
 - peau et muqueuse des malades (plus de bactéries que de cellules)

I- Prélèvement des produits biologiques

- ECBU décontamination des muqueuses,
 élimination du 1er jet
 (adhésion aux muqueuses)
- Recherche de Chlamydia : pas de décontamination, recueil du premier jet.
- Hémocultures décontamination de la peau
 (30% des hémocultures positives : contamination du prélèvement
 par bactéries de la peau : staphylocoque à coagulase négative,
 corynébactéries, ...)
- Prélèvement distal protégé : PDP

I- Prélèvement des produits biologiques

- Aérobiose

- Anaérobiose

conditionnement particulier pour recherche
de bactéries anaérobies

II- Conservation et acheminement des prélèvements jusqu'au service de bactériologie

- Conservation à 4°C pour éviter multiplication bactérienne:
temps de génération 20 min
(diagnostic quantitatif : 10^5 UFC/ml urine)
- Conservation au chaud pour éviter lyse bactérienne (autolysines)
(pneumocoque dans LCR)
—————▶ acheminement immédiat
- Acheminement
—————▶ sous la dépendance du système
(centre de tri, agents hospitaliers, etc)

III- Examen microscopique

- Information disponible rapidement ($\cong 20$ mn) = orientation du diagnostic

- ECBU : centrifugation

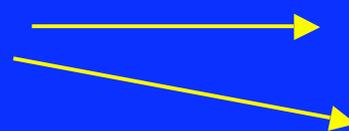
1) examen direct

{ éléments ?
bacilles ? cocci?
mobiles? immobiles?

2) coloration de Gram

positif / négatif

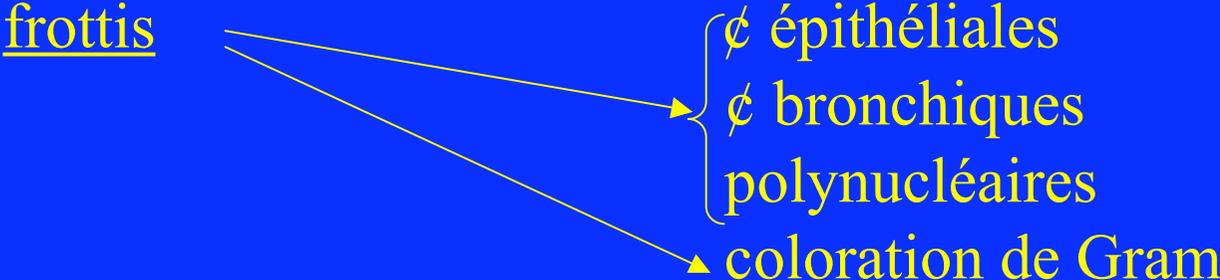
- PL : cytopspin



numération formule
coloration de Gram

III- Examen microscopique

Information disponible rapidement (20 mn) : orientation du diagnostic

- PDP frottis 
 - ç épithéliales
 - ç bronchiques polynucléaires
 - ▲ coloration de Gram

(brosse, lavage alvéolaire, aspiration bronchique, crachat)

- Tissu ou biopsie: apposition 
 - éléments cellulaires
 - coloration de Gram

- Crachats pour recherche de BK : microscope + ou -

- Sang : pas d'examen direct

III- Examen microscopique

- Bactéries visibles au microscope



10^5 UFC/unité de prélèvement (ml, gr)

Mais examen microscopique négatif ne veut pas dire absence de bactérie

IV- Ensemencement et incubation (18h - 24h)



Immersion dans la vie des bactéries

Immersion dans la vie des malades

IV- Ensemencement et incubation

Immersion dans la vie des bactéries

Facteurs de croissance ? Sélection du type de gélose

CO₂ ? Anaérobiose ? Sélection des étuves

Type de bactéries (bacilles/cocci, Gram +/-) ou polymicrobisme vu à l'examen direct



milieux sélectifs ?

IV- Ensemencement et incubation

Immersion dans la vie des patients

Renseignements cliniques :

Exemples :

Brucella, endocardites

—> temps d'incubation des milieux de culture supérieur à la moyenne

Prothèse de hanche infectée

—> milieux d'enrichissement (ballon)

Patient sous antibiotique

—> milieu pour diluer les antibiotiques

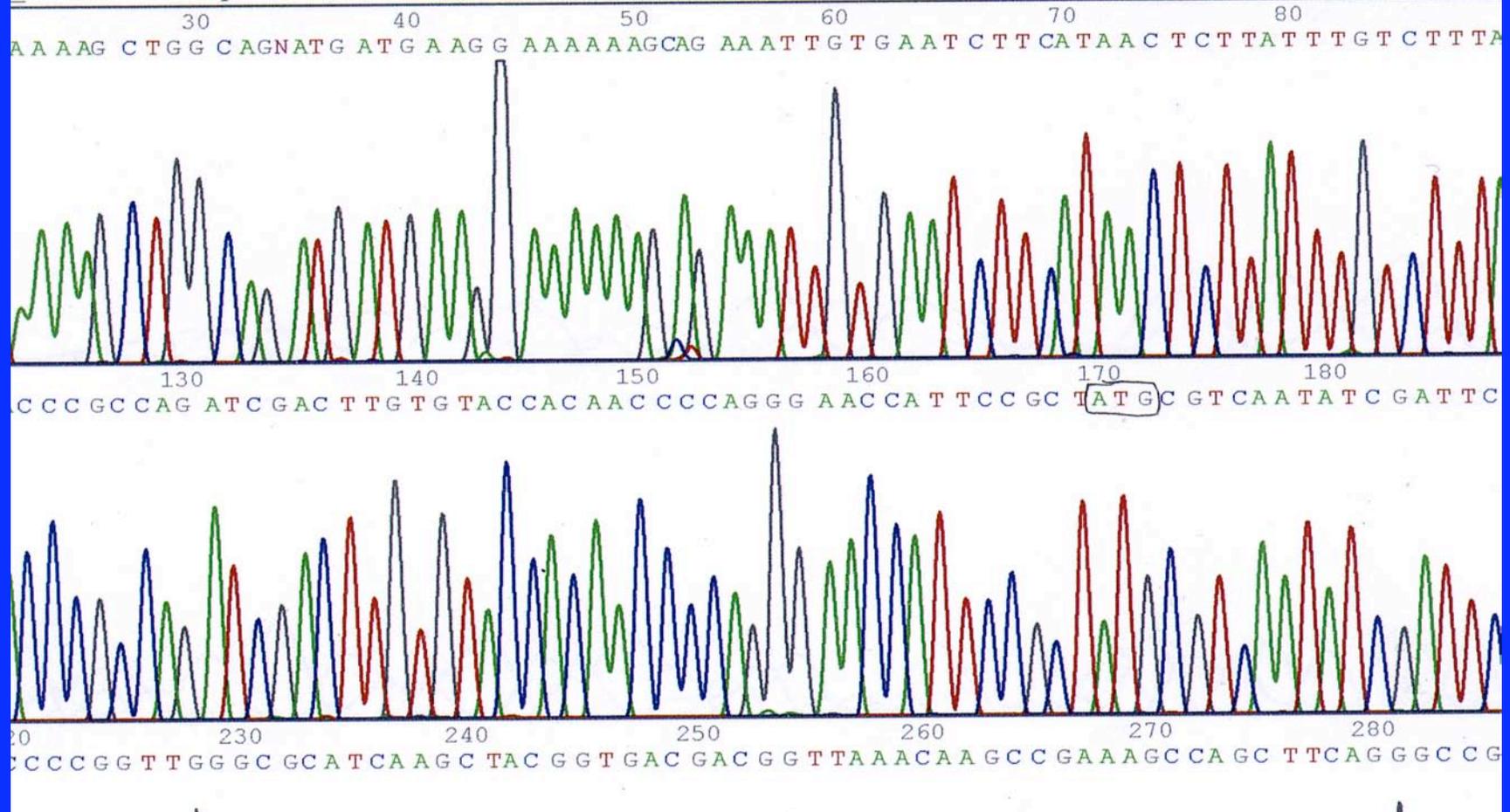
IV- Culture négative mais argument pour pathologie infectieuse



Alternative à la culture : amplification génique (ADNr 16S, *ropB*, *sodA*) à partir du prélèvement, séquençage du produit d'amplification et comparaison avec les banques d'ADN

Délai du résultat

02.ab1 Sequence Name: 91pl1 Run ended: Feb 7, 2003



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 21927976 gb AY114178.1 Cellulosimicrobium cellulans str...	896	0.0
gi 3169020 emb X79453.1 OX16S025 Oerskovia xanthineolytica ...	896	0.0
gi 5689056 dbj AB023355.1 Cellulomonas cellulans gene for ...	896	0.0
gi 15281314 dbj AB056131.1 Promicromonospora sp. IFO 16225...	896	0.0
gi 1051128 emb X83809.1 CCRRNAG C.cellulans 16S rRNA gene	888	0.0
gi 3168967 emb X79456.1 CC16S106 C.cartae MSD 20106 16S rDNA	888	0.0
gi 3168966 emb X79455.1 CC16S879 Cellulomonas cellulans DSM...	888	0.0
gi 27530899 dbj AB098580.1 Cellulosimicrobium cellulans ge...	888	0.0
gi 16943650 emb AJ313025.1 CSP313025 Cellulomonas sp. MN 60...	888	0.0
gi 5689055 dbj AB023354.1 Cellulomonas cellulans gene for ...	888	0.0
gi 12597318 gb AF306540.1 Cellulomonas cellulans 16S ribos...	872	0.0
gi 13122238 dbj AB004731.1 Cellulomonas sp. 16S rRNA gene,...	872	0.0
gi 30268677 dbj AB109293.1 Cellulosimicrobium cellulans ge...	864	0.0
gi 1051166 emb X83808.1 PC16RNA P.citrea 16S rRNA gene	801	0.0
gi 15594036 emb AJ400627.1 SMU400627 Salana multivorans 16S...	801	0.0
gi 33392103 gb AY345426.1 Bacterium K2-27 16S ribosomal RN...	793	0.0
gi 6468267 emb Y18378.1 BCA18378 Beutenbergia cavernosa 16S...	793	0.0

>gi|21927976|gb|AY114178.1| Cellulosimicrobium cellulans strain AS 4.1333 16S
ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length = 1423

Score = 896 bits (452), Expect = 0.0
Identities = 452/452 (100%)
Strand = Plus / Minus

```
Query: 1      gcagcgttgctgatctgcgattactagcgcactccgacttcatggggtcgagttgcagacc 60
           |||
Sbjct: 1307   gcagcgttgctgatctgcgattactagcgcactccgacttcatggggtcgagttgcagacc 1248

Query: 61     ccaatccgaactgagaccggcctttttgggattcgctccaccttacggtatcgcagccctt 120
           |||
Sbjct: 1247   ccaatccgaactgagaccggcctttttgggattcgctccaccttacggtatcgcagccctt 1188

Query: 121    tgtaccggccattgtagcatgcgtgaagcccaagacataaggggcatgatgatttgacgt 180
           |||
Sbjct: 1187   tgtaccggccattgtagcatgcgtgaagcccaagacataaggggcatgatgatttgacgt 1128

Query: 181    catccccaccttcctccgagttgaccccggcagtctcccatgagtcgccggcataaccgg 240
           |||
Sbjct: 1127   catccccaccttcctccgagttgaccccggcagtctcccatgagtcgccggcataaccgg 1068

Query: 241    ctggcaacatgggacgaggggtgcgctcggttcgcccacttaaccaacatctcacgacac 300
           |||
Sbjct: 1067   ctggcaacatgggacgaggggtgcgctcggttcgcccacttaaccaacatctcacgacac 1008

Query: 301    gagctgacgacaaccatgcaccacctgtgcacgagtggtccaaagagaccaccatctctgg 360
           |||
Sbjct: 1007   gagctgacgacaaccatgcaccacctgtgcacgagtggtccaaagagaccaccatctctgg 948
```

IV- Amplification génique

Problème d'interprétation des résultats

- Contamination des produits utilisés dans l'amplification (*Taq* polymérase)?
- Sens « pathologique » de la bactérie identifiée par ARN 16S
- « Reste bactérien » après infection



Confrontation clinico-biologique

Identification à partir de colonies isolées

- Milieu pour identification :
couleur des colonies = identification immédiate
- Caractères cultureux + quelques caractères biochimiques

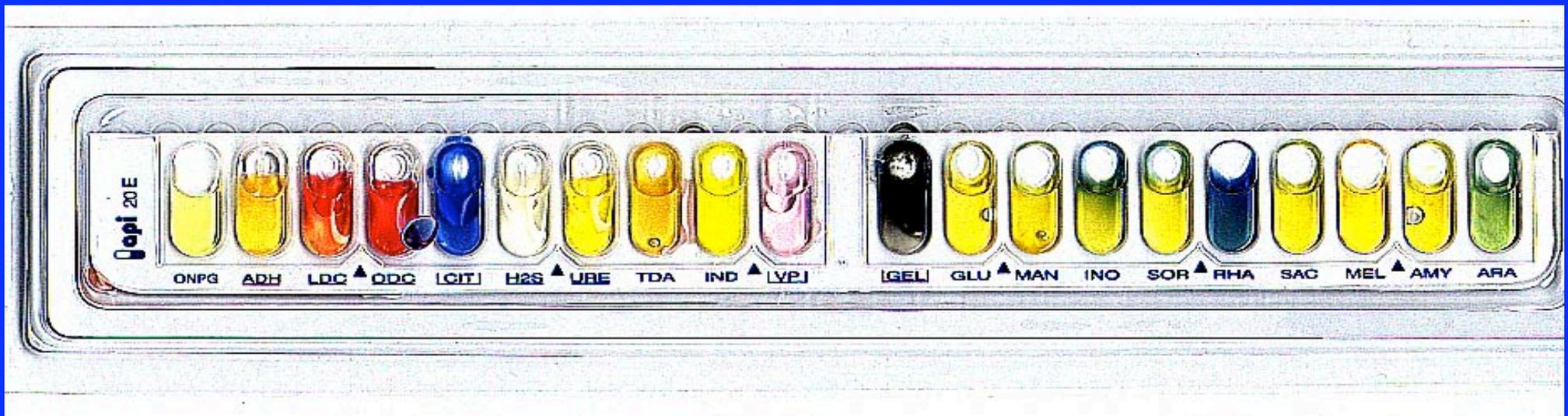
P. aeruginosa : pigment et oxydase +

S. aureus : coagulase +

Identification à partir de colonies isolées

« Galerie d'identification »

- manuelle (incubation 18-24h)
- automatisée (incubation 8h)



Identification à partir de colonies isolées

- Biologie moléculaire
- Amplification génique ADNr 16S, *sodA*
- Séquençage

Analyses complémentaires pour l'identification à partir de colonies isolées

- Serovar : antigène de paroi et de flagelle
Ex : *Salmonella* sp
(confirmation par laboratoire de référence)
- Antigène capsulaire
Ex : Pneumocoque : laboratoire de référence uniquement

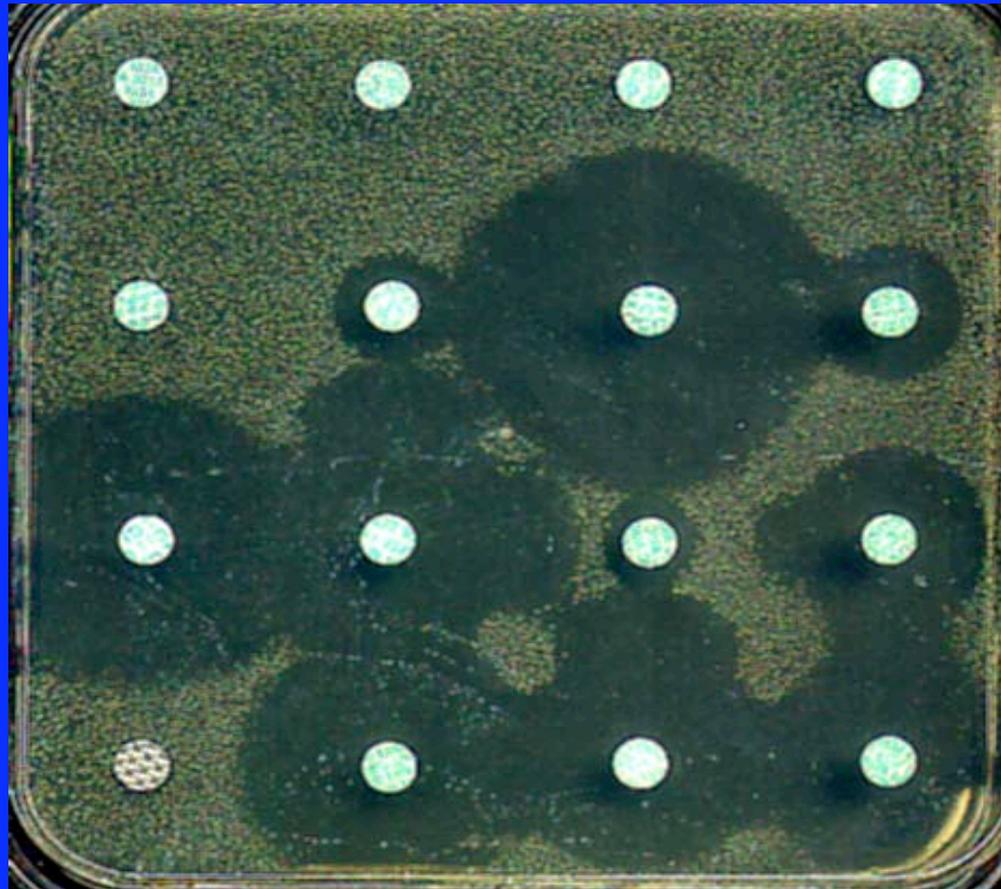
Sensibilité aux antibiotiques
Recommandations du Comité Français de
l'Antibiogramme (site SFM)

Taille de l'inoculum, antibiotiques à tester,
diamètres ou concentration critiques

Sensibilité aux antibiotiques
Recommandations du Comité
Français de l'Antibiogramme (site SFM)

Analyse manuelle : diffusion en gélose

Clone pBKKp (91)



Sensibilité aux antibiotiques

Analyse par automate (milieu liquide)

- Une concentration critique :
Pousse = I ou R ou non pousse = S
- Deux concentrations critiques : S, I ou R, vrai
- CMI « approchée » ou « vraie » (range)

Lecture interprétative de la mesure de la sensibilité aux antibiotiques

Règles : Comité Français de l'Antibiogramme

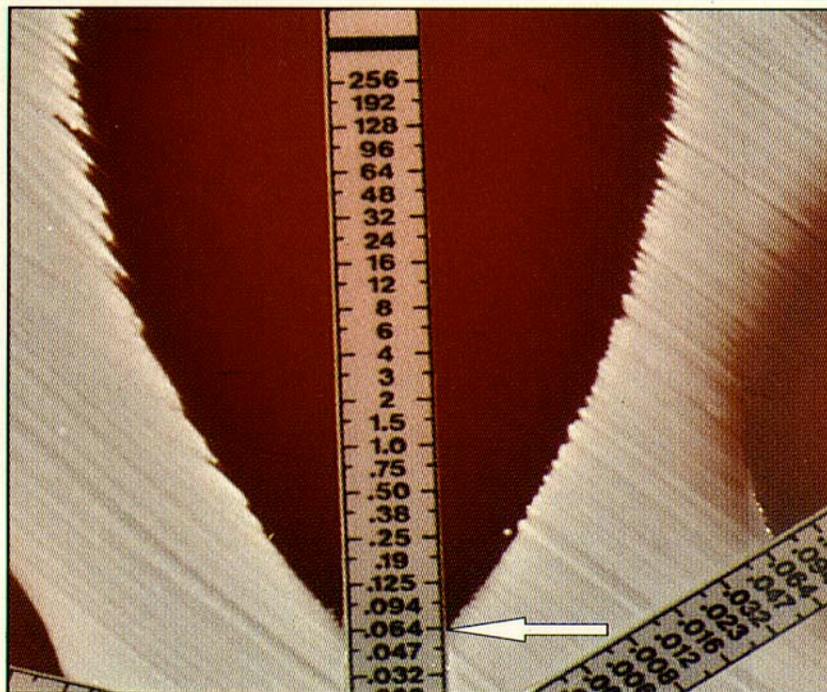
Mesure de la CMI

Pneumocoque et β lactamines (E-test)

S.aureus et glycopeptide

si un certain phénotype de résistance (multirésistant)

si la différence de diamètre entre teicoplanine et vancomycine > 3 mm



Bactericidal drugs such as aminoglycosides give sharp "crisp" ellipses. MIC 0.064 µg/ml.

Mesure de la CMI

Autres situations particulières

- Endocardites :
 - pouvoir bactéricide du sérum (PBS) :
 - > évaluation de la cohérence entre CMI et CMB des antibiotiques utilisés et résultats (PBS)

Mesure de la CMI

Pharmacocinétique

Pharmacodynamie

Concentration maximale / CMI

Aire sous la courbe / CMI

Diagnostic indirect

Sérologie bactérienne

- Fièvre typhoïde

Sérodiagnostic Felix et Vidal :

AC anti O

AC anti H

} Typhi, Paratyphi AB et C

- Brucellose

Test rose bengale (qualitatif)

Wright : titre AC > 80

Recherches actuelles

Au sein de l'espèce, y a-t-il des clones plus virulents que d'autres ?

Recherche de marqueurs de virulence

Découverte d'ilôts de pathogénicité

Corrélation entre facteurs de virulence et pouvoir pathogène?

Génomique et utilisation du transcriptome