

**Cours Techniques d'analyse biologique II**  
**1ere année Master**  
**Biologie moléculaire et cellulaire**

**1ere partie les prélèvements en bactériologie**

**Enseignant : Dr Lamraoui**

**2019/2020**

## Table des Matières

<b>Chapitre I: Prélèvement</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>I.2. Les produits pathologiques</b> .....	<b>2</b>
I.2.1. Définition.....	2
I.2.2. Les Produits pathologiques monomicrobiens .....	2
I.2.3. Les produits pathologiques polymicrobiens .....	3
<b>I.3. Les étapes de l'analyse des produits pathologiques</b> .....	<b>4</b>
I.3.1. La phase Pré-analytique .....	4
I.3.2. La phase analytique.....	5
I.3.3. La phase post-analytique .....	5
<b>I.4. La récolte prélèvements</b> .....	<b>5</b>
I.4.1. Moment du prélèvement .....	7
I.4.2. Site de prélèvement .....	8
I.4.3. Le transport de prélèvements.....	8
<b>I.5. Examen macroscopique du prélèvement</b> .....	<b>10</b>
I.5.1. Le liquide céphalo-rachidien .....	10
I.5.2. Le pus.....	10
I.5.3. L'urine.....	10
I.5.4. Les expectorations .....	10
I.5.5. Les matières fécales .....	11
<b>I.6. L'examen microscopique</b> .....	<b>11</b>
I.6.1. Analyse cytologique.....	11
I.6.2. Analyse quantitative.....	12
I.6.3. Analyse qualitative .....	14
I.6.4. Examen microscopique bactériologique.....	14

## **Introduction**

Les objectifs de la démarche de l'analyse bactériologique sont divers. Le plus fréquemment, il s'agit pour le laboratoire de mettre en évidence la ou les bactéries responsables d'une infection, d'effectuer une identification précise du ou des pathogènes et de tester sa (leurs) sensibilité(s) aux antibiotiques habituellement actifs sur cette ou ces bactérie(s). Le Diagnostic Bactériologique permet de mieux cerner l'épidémiologie des infections, afin de mieux adapter l'antibioprophylaxie et l'antibiothérapie et ceci par une bonne connaissance des germes. Ce Diagnostic consistera à un isolement et à une identification des bactéries au niveau de divers prélèvements, à savoir: les produits pathologiques.

Les micro-organismes sont partout. Comme les pathogènes, en particulier les bactéries et les levures, cohabitent avec des micro-organismes inoffensifs à la surface de ou dans l'hôte, il est essentiel de les détecter et de les identifier rapidement pour prévenir ou traiter la maladie. Le défi pour les domaines de la microbiologie clinique et de l'immunologie clinique est d'intégrer une technologie et des pratiques fiables basées sur des preuves pour atteindre ces objectifs. Diverses approches peuvent être employées pour détecter et identifier des micro-organismes basées sur des procédés morphologiques, biochimiques, immunologiques et moléculaires. En l'absence d'une culture, on peut employer des tests de biologie moléculaire et immunologiques pour détecter des pathogènes dans des échantillons tels que le sang et les crachats. Mais surtout, la sécurité au laboratoire doit toujours être la plus haute priorité. En fin de compte, le bien-être et la santé des patients peuvent beaucoup bénéficier des informations fournies par le laboratoire de microbiologie clinique.

Dans certains cas, il s'agit de s'assurer que la bactérie initialement responsable de l'infection pour laquelle un traitement antibiotique a été entrepris est bien éradiquée. Dans d'autres cas, il peut s'agir de rechercher un portage bactérien. Les moyens de diagnostiquer une infection bactérienne sont de deux ordres, les méthodes de diagnostic direct et les méthodes de diagnostic indirect. Les méthodes directes regroupent les techniques qui permettent de mettre en évidence tout ou partie de la bactérie. Les méthodes mettant en évidence les bactéries dans leur intégralité sont fondées principalement sur les techniques de microscopie en absence de coloration (état frais) ou après coloration et sur les techniques de culture sur milieu artificiel. La détection d'antigènes spécifiques de la bactérie ainsi que les méthodes de mise en évidence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) spécifiques de la bactérie constituent les autres méthodes de diagnostic direct. Les méthodes de diagnostic indirect correspondent aux techniques de détection d'anticorps développés par l'organisme infecté en réponse à l'agression par la bactérie pathogène. Il s'agit dans ce cas des méthodes de sérodiagnostic.

### Chapitre I: Prélèvement

#### I.1. Introduction

Les analyses bactériologiques sont directement tributaires de la qualité du prélèvement. La pertinence de leurs résultats dépend du mode de collection de l'échantillon clinique et d'acheminement au laboratoire, au besoin en utilisant des milieux de transport, et de la capacité de ce dernier à en réaliser rapidement l'examen.

Le biologiste est responsable de l'analyse bactériologique des prélèvements provenant des patients (prélèvements qu'il a pratiqué lui-même ou qui lui ont été transmis) ; sa responsabilité va de la phase préanalytique jusqu'au résultat. La prise en charge correcte d'un échantillon biologique au cours des étapes successives de préanalytique, analytique et postanalytique, allant de la prescription jusqu'à l'intégration des résultats dans le processus diagnostique, est cruciale.

Les prélèvements bactériologiques peuvent avoir un objectif diagnostique ou épidémiologique. Les prélèvements à visée diagnostique sont les plus fréquents. Selon les cas, ils permettent l'isolement et l'identification de bactéries, complétés éventuellement par l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques, la mise en évidence des antigènes structuraux ou des produits du métabolisme bactérien présents dans l'échantillon et/ou l'identification du génome de l'agent pathogène.

En biologie, le prélèvement doit répondre à des critères de qualité car, de la qualité du prélèvement dépend la valeur et la fiabilité du résultat de l'analyse. Ces critères de qualité sont :

- Concernant le prélèvement proprement dit :

- Prélever avant toute antibiothérapie sinon sous fenêtre thérapeutique de 4 jours
- Effectuer une désinfection correcte du site de prélèvement ainsi que des mains du personnel chargé du prélèvement
- Utiliser du matériel stérile pour réaliser et collecter le prélèvement ;
- Respecter un volume suffisant du prélèvement destiné à l'analyse.

Afin de pouvoir optimiser la prise en charge des prélèvements, il doit disposer d'informations claires : données cliniques et biologiques concernant notamment la nature précise du prélèvement, le terrain (femme enceinte, diabétique, mucoviscidose, splénectomisé, immunodéprimé), le traitement antibiotique préalable, ou les bactéries potentiellement causales.

Certaines situations vont en effet requérir des recherches particulières.

## **Chapitre I prélèvement**

Le biologiste procédera à un examen macroscopique de l'échantillon et réalisera sur celui-ci, souvent au préalable, une analyse qualitative voire quantitative de la cytologie avant de réaliser les examens relevant de la démarche bactériologique classique : diagnostic direct (avec examen direct et recherche qualitative ou quantitative des bactéries et/ou de leurs constituants, étude de la sensibilité aux antibiotiques) et diagnostic indirect ou sérodiagnostic.

Il devra aussi interpréter les résultats, même s'il ne maîtrise pas toutes les étapes préanalytiques ou tous les éléments cliniques.

Dans un certain nombre de situations, lorsqu'on examine des liquides normalement stériles, l'interprétation est simple (méningites purulentes avec examen direct évocateur et culture monomicrobienne ou plusieurs hémocultures positives avec le même germe, etc.). Dans d'autres cas, l'interprétation est plus délicate ; c'est le cas notamment si la flore est polymicrobienne et si la ou les bactéries potentiellement pathogènes doivent être isolées ou révélées sélectivement, voire quand le terrain fait que des espèces peu virulentes profitent d'un terrain favorable (patients fragilisés, immunodéprimés, patients polyinstrumentés) pouvant entraîner une infection. L'analyse critique des résultats doit se faire dans le cadre de confrontations clinicobiologiques. C'est également valable tant pour l'établissement du diagnostic que pour l'instauration du traitement, et fait partie de ce que l'on peut appeler un « code de bonne conduite entre biologiste et clinicien ».

### **I.2. Les produits pathologiques**

#### **I.2.1. Définition**

Ce sont des produits Biologiques où se sont multipliés des Micro-organismes responsables de l'infection. Classiquement, on distingue deux types de produits pathologiques :

- Monomicrobiens
- Polymicrobiens

#### **I.2.2. Les Produits pathologiques monomicrobiens**

Ce sont des Produits Biologiques originaires d'une cavité naturelle, qui est stérile à l'état normal, car n'ayant aucun contact avec l'extérieur. Ce sont des produits que l'on prélève à l'aide d'une aiguille ou de tout autre matériel de Ponction.

Les échantillons issus de sites stériles à l'état physiologique et recueillis selon des méthodes limitant le risque de contamination exogène sont souvent les plus contributifs. Les liquides issus de séreuses, les pus issus de collections fermées, les échantillons issus de sites profonds recueillis

## Chapitre I prélèvement

chirurgicalement et les biomatériaux endo-prothétiques appartiennent à cette catégorie. L'isolement, en général monomicrobien, suffit au diagnostic d'infection. Cependant, la prise en compte de critères bactériologiques quantitatifs, parfois complétés par un dénombrement des éléments nucléés dans l'échantillon, peut aider l'interprétation. La technique de prélèvement, souvent invasive, doit être parfaite et éviter des contaminations afin de conserver la valeur de tels produits.

Comme exemple nous pouvons citer: le liquide Céphalorachidien, le sang, liquides pleuraux, liquides d'arthrite, liquides péricardiques. En général on isole qu'une seule Bactérie responsable de l'infection.

### I.2.3. Les produits pathologiques polymicrobiens

Ils sont issus de cavités naturelles qui sont normalement septiques. Ce sont des produits riches en germes ou en produits contaminés par des germes lors de leur élimination dans le milieu extérieur. Cette contamination survient lors de l'émission dans le milieu extérieur par des voies naturelles septiques.

Les échantillons potentiellement polymicrobiens exigent rarement des méthodes de recueil invasives, mais sont plus difficilement contributifs. Citons les échantillons recueillis par prélèvements pulmonaires non protégés (crachats, fibro-aspirations bronchiques), ceux issus de lésions cutanées ou muqueuses, les pus issus de collections ouvertes, les matières fécales et les matériels autres que ceux évoqués précédemment. Les indications sont rarement pesées par les cliniciens et ces prélèvements sont fréquemment transmis au laboratoire isolément du contexte clinique. Dans ces conditions, l'interprétation est difficile, d'autant que certaines bactéries impliquées dans le processus infectieux peuvent faire partie de la flore commensale ou de transit. Au contraire, la bactérie à l'origine de l'infection peut ne pas être identifiée si les moyens mis en œuvre pour son isolement ne sont pas adaptés. Ces prélèvements conservent néanmoins un intérêt à condition d'être interprétés en prenant en compte la globalité des données épidémiologiques, cliniques, bactériologiques qualitatives (coloration de Gram, présence de polynucléaires, caractère pathogène de l'espèce bactérienne isolée) et quantitatives. Ceci a bien été montré, en particulier dans la prise en charge des infections cutanées. L'absence de cette étape interprétative peut entraîner des conduites thérapeutiques inadaptées.

Exemples de produits Polymicrobiens: selles, sécrétions Buccales, vaginales, Rhinopharyngées, pus d'abcès fistulisés, urines.

Pour ces produits pathologiques les techniques utilisées pour isoler les germes causals et l'interprétation des résultats vont différer selon qu'il s'agisse de produits Monomicrobiens ou Polymicrobiens.

## Chapitre I prélèvement

L'interprétation des résultats qui sont obtenus après l'étude d'un produit pathologique polymicrobien passe nécessairement par la connaissance de la flore commensale du milieu où le prélèvement a été effectué, et c'est sous réserve de parfaites conditions d'asepsie au cours des Manipulations, que l'isolement d'un germe étranger à la flore, amène à suspecter sa responsabilité dans le processus infectieux en cours.

Pour les produits Monocrobiens, sous réserve également des conditions d'asepsie durant la manipulation, tout germe isolé de ces produits est suspect de l'infection.

### I.3. Les étapes de l'analyse des produits pathologiques

#### I.3.1. La phase Pré-analytique

L'étape pré-analytique en bactériologie comporte plusieurs étapes séquentielles toutes aussi importantes les unes que les autres pour obtenir un résultat analytique utile pour le patient :

- la prescription de l'analyse ;
- le geste appelé, « prélèvement », destiné à obtenir un échantillon biologique;
- le conditionnement et le transport de l'échantillon vers le laboratoire d'analyse ;
- le contrôle de la qualité de l'échantillon à l'arrivée au laboratoire d'analyse.

Deux difficultés majeures existent en bactériologie :

- l'analyse d'organismes vivants : les bactéries sont sujettes à leur environnement. Pendant le transport, si le délai d'acheminement est trop long, ou si le conditionnement n'est pas adapté, les résultats peuvent être faussés par excès (les résultats nécessitant une quantification comme les ECBU peuvent être surestimés suite à une multiplication bactérienne), ou par défaut (les bactéries ne sont plus viables, comme dans le cas des anaérobies par défaut d'atmosphère adéquate, ou des germes fragiles du type gonocoque) ;
- la variété du type d'échantillons (sang, liquides de ponction, urines, abcès, pièces anatomiques, etc.) et du site de prélèvement. Cette variété conduit à une certaine difficulté de la standardisation des méthodes de prélèvement. Ces difficultés de la phase préanalytique imposent un conditionnement du milieu de transport adapté, un délai d'acheminement au laboratoire raisonnable (moins de 2 heures est l'idéal) et un dialogue avec les cliniciens.

L'analyse bactériologique (avec son interprétation) nécessite des renseignements cliniques : le type de site anatomique prélevé, la méthode de prélèvement (écouvillon au lit du malade versus prélèvement au bloc opératoire, ou via un cathéter, etc.), l'histoire clinique du patient (antécédents d'antibiothérapie,

## **Chapitre I prélèvement**

d'immunodépression, etc.). La phase pré-analytique s'arrête au début de l'analyse proprement dite. Cette phase pré-analytique, sur laquelle le biologiste n'a que peu d'emprise, conditionne les étapes ultérieures d'analyse, de validation et d'interprétation et donc la qualité de la réponse.

Le dialogue biologiste–clinicien est d'autant plus important que la norme oblige à une prestation de conseils à la phase pré-analytique comme à la phase post-analytique. Le biologiste peut modifier la prescription après accord du prescripteur, sauf urgence ou indisponibilité, pour l'adapter aux recommandations de bonnes pratiques.

### **I.3.2. La phase analytique**

Elle comprend tous les événements qui peuvent se produire pendant l'analyse à proprement parlée.

### **I.3.3. La phase post-analytique**

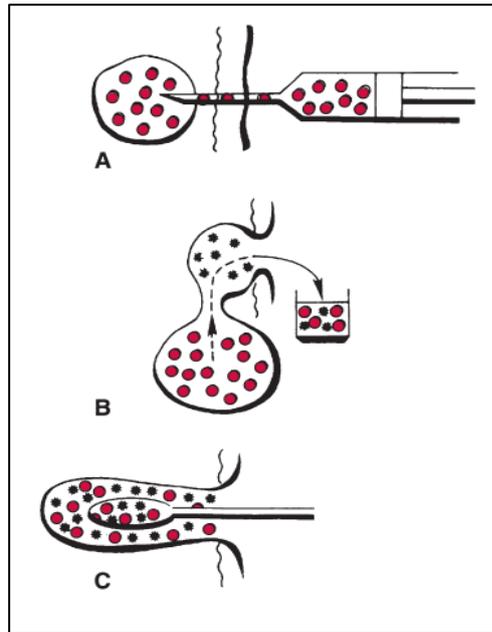
Elle concerne tous les événements qui peuvent se produire après l'analyse (remise des résultats,.....).

## **I.4. La récolte prélèvements**

Le choix de la méthode de récolte, conservation et transport du produit pathologique dépend de la nature du produit, on distingue alors :

- Les produits normalement stériles (sang, LCR, exsudat de séreuse, urine),
- Les produits qui se contaminent lors de leur élimination de l'organisme, avec la flore normale de la voie d'élimination (urine, crachat),
- Les produits contaminés (matières fécales, exsudat nasopharyngien, le pus provenant de plaies ou brûlures, sécrétions vaginales), et qui peuvent provenir de zones normalement colonisées par des micro-organismes (Figure 1).

## Chapitre I prélèvement



**Figure 1: Les types d'échantillons pour le diagnostic microbiologique**

*A : sites normalement stériles (LCR, sang) ; B : site anatomique normalement stérile mais la contamination par une flore endogène est pratiquement obligatoire (urine, crachat) ; C : Enfin, lorsque la bactérie responsable de l'infection est associée à une flore endogène.*

La récolte est un point de rencontre entre la clinique et le laboratoire de microbiologie. Si le prélèvement n'est pas correctement réalisé, aucune technique de laboratoire ne permettra l'identification des germes.

Les produits biologiques doivent être accompagnés d'un bulletin d'analyses dans lequel est inscrit: le nom et le prénom du patient, l'âge, le domicile, le nombre de feuilles d'observation, la section et la date d'admission à l'hôpital, la date et l'heure du prélèvement, le type et la provenance du prélèvement, le diagnostic de présomption et des indications sur le traitement antibiotique.

Le prélèvement doit être transporté rapidement au laboratoire d'analyse. La durée de transport doit être aussi courte que possible (si possible inférieur, à 1 heure). Pour ce qui est de la température de transport, on distingue :

1. Les prélèvements qu'il est préférable de garder à + 4o C : ils comportent une flore microbienne qui risque d'interférer avec l'agent causal. La multiplication de cette flore est ralentie a + 4o C. C'est le cas pour tous les prélèvements poly microbiens. Ces prélèvements sont : les urines post-mictionnelles, les selles, les expectorations pour la recherche du BK.
2. Les prélèvements que l'on doit maintenir à + 37o C (étuve) : ils sont mono microbiens et renferment généralement des bactéries pathogènes fragiles, supportant mal les écarts de température. Ceci justifie le transport rapide vers le laboratoire, à l'abri du froid et de la

## Chapitre I prélèvement

dessiccation. Ce sont les hémocultures, les LCR et liquide de ponction, les pus d'abcès non fistualisés, les prothèses et les pièces opératoires ou biopsie.

3. Les prélèvements qu'il faut mettre immédiatement en culture en raison du risque de dessiccation si la culture est retardée. En effet, ces prélèvements sont généralement pratiqués à l'aide d'un écouvillon, dispositif stérile constitué d'une tige surmontée d'un coton. De tels prélèvements doivent être réalisés au laboratoire même. C'est le cas des prélèvements de gorge, des pus d'oreille, des pus d'abcès fistualisés, des prélèvements génitaux masculins et féminins (Tableau 1).

**Tableau 1 : Température et atmosphère de conservation du prélèvement en attendant l'analyse.**

T° Conesvation	37°C (étuve)	+4°C (réfrigérateur)	Mise en culture immédiate Pas de conservation
Prélèvements	Hémocultures, LCR Liquides de ponction, Pus d'abcès non fistulisés Prothèses Pièces opératoires	Urines post-mictionnelles Selles Expectorations Moins 2 heures.	Prélèvement de gorge, Pus d'oreille, Abcès fistulisés, Pvts gynécologiques Pvts génitaux masculins.
Remarques	ils ne comportent aucune flore microbienne associée.	une flore microbienne qui risque d'interférer avec l'agent causal. La multiplication de cette flore est ralentie à +4°C.	ils ne tolèrent pas de conservation Ces prélèvements seront si possible effectués au laboratoire et mis en culture immédiatement.

### I.4.1. Moment du prélèvement

Un prélèvement à visée diagnostique devrait dans toute la mesure du possible être fait avant l'initiation de l'antibiothérapie. En cas de réponse insuffisante à un traitement instauré sans analyse préliminaire, le diagnostic devrait être reconsidéré (s'agit-il vraiment d'une infection ?) et une fenêtre thérapeutique peut être envisagée en cas de tableau clinique non menaçant. Sinon, des modalités particulières, telles une incubation prolongée ou une recherche par biologie moléculaire, sont à considérer d'entente avec le laboratoire. Dans les cas particuliers où l'excrétion des germes est intermittente ou leur quantité faible, il faut prélever 3 fois de suite à 3 jours d'intervalle. Il en est ainsi de la recherche de mycobactéries dans les expectorations ou les urines. Ici, le moment de prélèvement – le matin au réveil – est en outre important.

## Chapitre I prélèvement

### I.4.2. Site de prélèvement

Les bons sites sont situés à proximité du foyer infectieux ou de ses extensions secondaires. Un prélèvement à visée diagnostique est utile si le résultat de l'analyse influence l'attitude thérapeutique. Il a un risque de contamination minimal et est généralement obtenu de manière invasive. Il s'agit notamment du sang, des liquides internes prélevés par paracentèse au travers de la peau ou de muqueuses préalablement décontaminées, des abcès ponctionnés, des échantillons profonds obtenus chirurgicalement, du liquide de lavage bronchoalvéolaire, de l'urine du milieu du jet ou prélevée par sondage unique.

A l'inverse, l'échantillon est peu utile s'il reflète une colonisation plutôt que l'agent pathogène. C'est le cas, excepté pour les analyses épidémiologiques et autres rares exceptions, des échantillons obtenus par voie non invasive, provenant de la peau, d'une plaie et de muqueuses. Ainsi, un frottis d'orifice de fistule est fortement susceptible de contenir une flore commensale. Les biomatériaux traversant la peau (mèches, drains) sont eux aussi sujets à contamination. Il est inutile d'adresser les liquides recueillis dans des récipients de drains, les souches isolées reflétant les germes les plus aptes à se multiplier secondairement *ex vivo* plutôt que le pathogène.

### I.4.3. Le transport de prélèvements

#### I.4.3.1. Le milieu de transport

La conservation de la viabilité des bactéries est nécessaire jusqu'à l'analyse. Le biologiste est le seul à même de définir les conditions à respecter et les moyens à utiliser. Si le prélèvement ne peut pas être traité immédiatement, il est nécessaire d'utiliser des milieux de conservation. En principe, ils évitent la dessiccation mais ne favorisent pas la croissance bactérienne et conservent la flore prélevée en l'état. Des milieux de composition différente sont disponibles. On peut distinguer des milieux « standard », tels que le milieu de Stuart, et des milieux plus spécifiques tels que les milieux de transport pour *Chlamydiae*. Leur performance varie en fonction de leur composition et de la bactérie cible. La viabilité de *Neisseria gonorrhoeae* persiste 8 heures en milieu de Stuart liquide contre 48 heures en milieu d'Amies gélose; celle de *Vibrio cholerae* atteint 4 semaines dans les selles conservées en milieu de Cary-Blair. Cependant les évaluations publiées sont rares et soulèvent des interrogations. Il a pu être montré par exemple que pour *C. pneumoniae*, le délai de conservation de viabilité différait selon que la souche-test était une souche sauvage ou une souche de collection. Pour l'isolement de bactéries anaérobies de tissus infectés, en termes de coût-bénéfice, les milieux classiques pré-réduits sont préférables aux milieux spécifiques commercialisés. Mais l'absence de milieu de transport est la règle pour de nombreux prélèvements (séreuses, selles, prélèvements pulmonaires).

## Chapitre I prélèvement

### 1.4.3.2. Délais et température de transport

Ils dépendent du milieu de transport utilisé, de la bactérie recherchée et du contenu de l'échantillon (phénomènes de compétition pour les échantillons polymicrobiens ou introduction d'un élément extérieur tel qu'un liquide de rinçage ou un anesthésique).

En l'absence de milieu de transport, l'échantillon doit être transmis dans les deux heures suivant le prélèvement, avec l'exception du LCR, recueilli dans un contexte de syndrome méningé, pour lequel aucun délai n'est toléré. La température à respecter est de 20 à 25 °C. Une conservation à 4 °C destinée à limiter la prolifération d'une flore commensale ne paraît pas justifiée. La conservation à + 4 °C, inhibant la prolifération bactérienne, est recommandée quand des cultures semi-quantitatives sont indiquées (par exemple, urines). L'acheminement des échantillons pouvant contenir des bactéries sensibles au froid (par exemple, *Haemophilus*, *Neisseria*) doit être assuré à température ambiante de + 20° C. C'est le cas notamment des échantillons oculaires ou respiratoires. La conservation des prélèvements dits « stériles », où un seul germe est recherché, se fait aussi à température ambiante.

Ces règles sont plus souples pour les mycobactéries, plus résistantes dans le milieu extérieur. Traditionnellement, le traitement des échantillons destinés à leur recherche peut être différé de 48 heures sans conséquence notable sur la sensibilité de la culture. Ce délai peut être accru si la décontamination du prélèvement est débutée dès le recueil par l'adjonction de bromure de cétyl pyridinium à 0,6 % par exemple. On sait par exemple que l'eau physiologique, milieu de dilution classique des échantillons pulmonaires, inhibe *Mycobacterium tuberculosis* de même que la lidocaïne, anesthésique local utilisé au cours des fibroscopies.

L'utilisation de milieux de transport permet d'augmenter les délais. Mais les facteurs temps et température doivent alors être pris en compte. Les études intégrant ces données multiparamétriques sont trop rares. On peut citer comme exemple la conservation des selles.

- à - 20 °C, la décroissance bactérienne de la flore commensale entre une et quatre semaines de conservation est en moyenne de 1 Log<sub>10</sub>. La conservation en tampon glycérol donne un meilleur résultat que la conservation en milieu de Cary-Blair.
- à + 4 °C, le simple recueil de selles sur écouvillon conserve en milieu de Stuart assure un taux de recouvrement acceptable par rapport à la congélation.

Pour être complet, un dernier aspect doit être évoqué. Le biologiste qui garde un œil critique sur les conditions de transport des échantillons ne doit pas oublier que pour des raisons de fonctionnement du laboratoire de bactériologie (gardes en particulier), il participe à l'accroissement des délais entre

## Chapitre I prélèvement

prélèvement et traitement de l'échantillon. Le développement de l'automatisation du laboratoire de bactériologie permettra probablement dans un avenir proche d'apporter des solutions innovantes, dans l'intérêt du patient et des praticiens.

### I.5. Examen macroscopique du prélèvement

Il a une valeur importante, non seulement pour dépister les erreurs de prélèvement, mais aussi pour orienter le diagnostic bactériologique.

#### I.5.1. Le liquide céphalo-rachidien

On observe la couleur, la turbidité, la présence de dépôt ou de caillot, avant de le soumettre à la centrifugation. Normalement le LCR est limpide, comme « de l'eau de source ». En présence de signes de méningite (fièvre, raideur de la nuque, photophobie), et même si le LCR est claire, on suspecte une méningite ou une tuberculose. Un LCR trouble signifie la présence de leucocytes et indique une infection bactérienne.

#### I.5.2. Le pus

On observe sa couleur, sa consistance et son odeur. La couleur du pus varie en fonction de la présence de bactéries. La bactérie pyogène la plus fréquente en pathologie infectieuse est le *Staphylococcus aureus*, qui produit un pus jaune crémeux. Le pus, dans les infections au bacille pyocyanique (*Pseudomonas aeruginosa*), est verdâtre, avec une odeur parfumée. Le pus, dans les infections causées par les actinomycètes, est granulé.

#### I.5.3. L'urine

On observe la couleur, le degré de turbidité, la présence et la nature de potentiels sédiments, la présence de filaments. Si l'urine est trouble, il faut déterminer si cela est causé par les leucocytes ou par les sels. Un chauffage léger de l'urine, à la flamme, entraîne la disparition de la turbidité causée par les sels.

#### I.5.4. Les expectorations

On observe l'aspect, la couleur, la présence de fragments purulent. Dans la pneumonie pneumococcique, les expectorations ont une couleur de rougeâtre. Dans les anciens traités de sémiologie médicale, on disait que « le malade crache le diagnostic ».

## Chapitre I prélèvement

### I.5.5. Les matières fécales

On cherche la présence de pus, de sang, ou d'un excès de mucus. Dans la dysenterie pathognomonique, les selles sont muco-purulentes et sanguinolentes.

### I.6. L'examen microscopique

L'examen microscopique a un rôle fondamental en microbiologie, étant une étape importante dans l'analyse des produits biologiques. L'analyse d'un prélèvement effectué dans un but diagnostique est en règle générale une analyse à la fois cytologique et bactériologique. Ainsi, l'examen microscopique est une étape clé dans la démarche diagnostique des infections bactériennes (Figure 2).

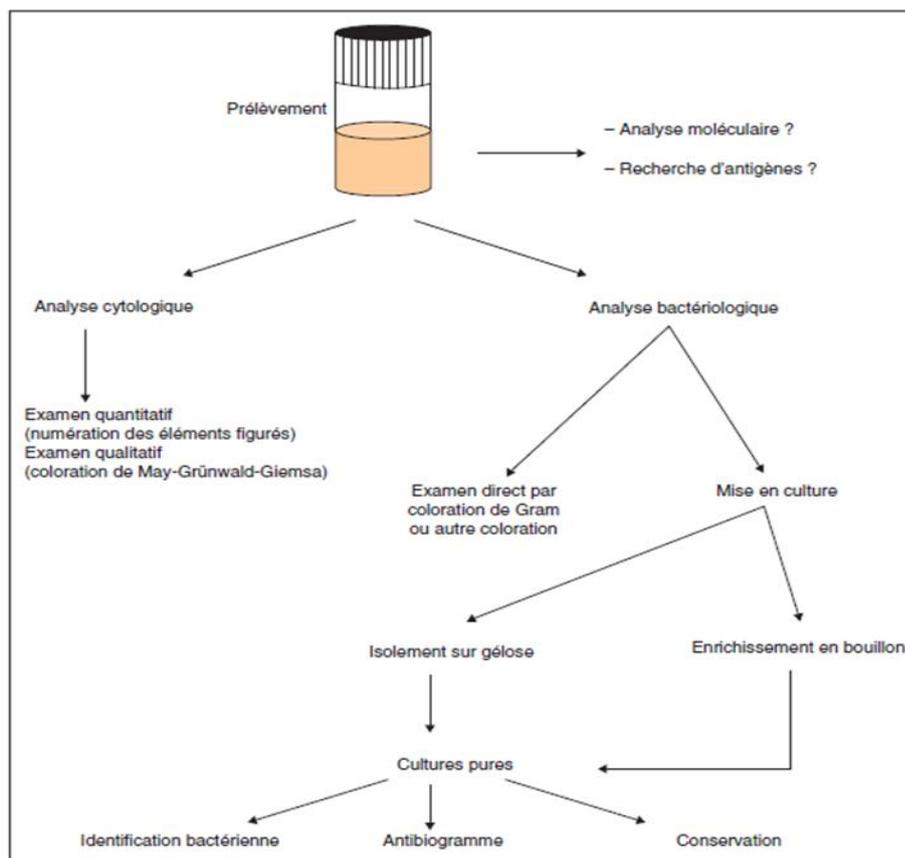


Figure 2: Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique

#### I.6.1. Analyse cytologique

L'analyse cytologique doit répondre à un ou deux objectifs en fonction de la nature de l'échantillon. Il peut s'agir d'une analyse quantitative qui va permettre de répondre en nombre d'éléments figurés par unité de volume (millimètre cube ou microlitre, millilitre). Cette numération est effectuée pour

## Chapitre I prélèvement

les prélèvements de nature liquide (liquides céphalorachidiens, urines, liquides articulaires, liquides pleuraux, etc.). Une analyse qualitative précisant la nature des éléments figurés observés sera effectuée sur la plupart des prélèvements précédemment cités lorsqu'une réaction cellulaire aura été mise en évidence. Cette analyse qualitative sera quant à elle également effectuée pour les prélèvements de nature solide (biopsies, tissus, écouvillonnages, etc.). Lorsque des éléments figurés seront présents, la richesse en ces éléments sera évaluée (rares, présence, nombreux) et leur nature sera précisée.

Dans le cas particulier des prélèvements respiratoires, l'appréciation de la qualité du prélèvement sera fondée sur une évaluation quantitative du nombre de leucocytes et de cellules épithéliales par champ microscopique (objectif 10).

### I.6.2. Analyse quantitative

La quantification des éléments est effectuée manuellement ou bien, plus récemment, en utilisant des systèmes automatiques de comptage, en particulier pour les prélèvements d'urine.

#### *I.6.2.1. Systèmes manuels de comptage*

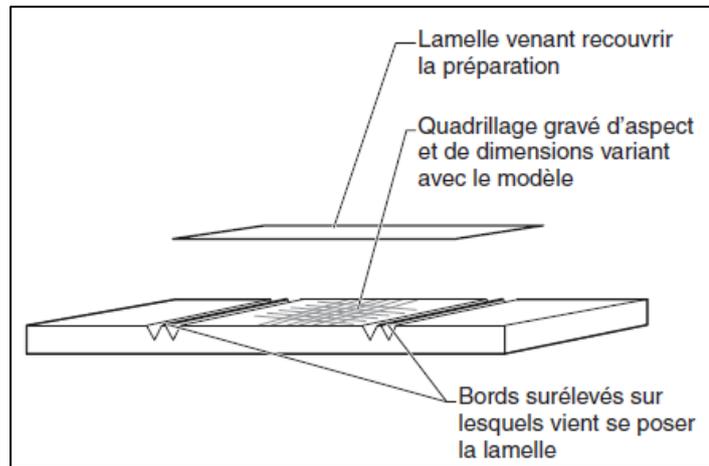
Ces systèmes font appel à des hémocytomètres ou hématimètres communément appelés cellules. Ces cellules sont réutilisables comme les cellules de Lemaure ou de Malassez par exemple, ou bien à usage unique comme les Kovalslide®. Le liquide biologique est analysé directement ou après ajout d'un colorant des noyaux (bleu de toluidine) qui, dans certains cas, permet de faciliter la détection des éléments figurés.

##### *I.6.2.1.1. Cellules réutilisables*

Les différentes cellules sont constituées de la même façon (Figure 3). Il s'agit d'une épaisse lame porte-objet en verre, quadrillée en son centre, qui présente de part et d'autre des plateaux surélevés qui permettent, lorsque ceux-ci reçoivent une lamelle, de définir un volume de liquide défini propre à chaque cellule.

Les cellules utilisées dépendent des habitudes de l'utilisateur ainsi que de la cellularité des milieux étudiés. Pour les milieux riches en cellules, l'hématimètre de Thoma permet l'étude d'un volume de 0,1  $\mu\text{l}$ , et la cellule de Malassez, l'étude de 1  $\mu\text{l}$ . Pour des milieux où les éléments figurés sont rares, des volumes plus importants peuvent être analysés ; la cellule de Lemaure permet d'étudier jusqu'à 40  $\mu\text{l}$  et celle de Nageotte par exemple jusqu'à 50  $\mu\text{l}$ .

## Chapitre I prélèvement



**Figure 3: Éléments composant une cellule pour analyse quantitative.**

### *1.6.2.1.2. Cellules à usage unique*

Les cellules à usage unique type Kovalslide® présentent l'avantage de regrouper sur un même support 10 cellules, ce support étant jeté après utilisation sans désinfection contrairement aux cellules précédentes (Figure 4). Le volume étudié est de 1  $\mu$ l.



**Figure 4: Cellule Kovalslide® sur la platine**

### *1.6.2.2. Utilisation de systèmes automatiques de comptage*

Les systèmes automatiques de comptage utilisent l'urine native avec un volume d'échantillon analysé voisin de 0,8 à 1 ml. Ces systèmes sont fondés soit sur une coloration des éléments urinaires avec différents colorants fluorescents qui sont ensuite comptés et différenciés par cytométrie en flux, soit par

## Chapitre I prélèvement

cytométrie en flux avec capture d'images associée à une reconnaissance automatique des particules. Dans ce dernier cas, toutes les particules sont numérisées et mémorisées. Ces systèmes sont connectables au système informatique de laboratoire.

### I.6.3. Analyse qualitative

Afin de connaître avec précision la nature des éléments figurés observés lors de l'analyse quantitative, l'étalement du prélèvement avant ou après centrifugation suivi d'une coloration est indispensable. La finesse de l'étalement du frottis est importante pour une observation de qualité. Ce frottis doit être réalisé, dans la mesure du possible, rapidement après le prélèvement car certains éléments cellulaires se dégradent vite, en particulier dans les liquides pauvres en protéines comme les urines ou le liquide céphalorachidien. La fixation des frottis est effectuée en recouvrant de méthanol la préparation jusqu'à évaporation.

Les méthodes de centrifugation douces sont intéressantes pour les liquides contenant peu de cellules et l'utilisation d'une cytocentrifugeuse permet d'obtenir un dépôt cellulaire de très bonne qualité.

La coloration cytologique effectuée est la coloration de May-Grünwald-Giemsa. Elle s'utilise pour les préparations de sang, les sécrétions vaginales, urétrales, exsudats de séreuses, ponctions médullaires, etc. La méthode classique consiste à déposer sur le frottis préalablement fixé la solution de May-Grünwald et à la laisser agir 5 minutes. Après un lavage à l'eau de 1 minute, la solution de Giemsa est laissée en contact 15 minutes. Après un dernier lavage à l'eau, la préparation est laissée séchée puis observée à l'immersion. Cette coloration permet de colorer les noyaux en bleu, le cytoplasme en rose et les bactéries, lorsqu'elles sont présentes, en bleu. Elle permet la visualisation précise de la morphologie cellulaire (anomalies, atypies, suspicions de modifications néoplasiques), l'appréciation quantitative des PMN et l'étiologie bactérienne. Il existe des colorations dérivant de la méthode de May-Grünwald-Giemsa qui sont plus rapides et permettent d'obtenir un résultat satisfaisant en quelques minutes.

Les frottis réalisés dans ces conditions sont également colorés par la coloration de Gram qui ne permet qu'une observation grossière de la morphologie des cellules.

### I.6.4. Examen microscopique bactériologique

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais), ou bien après coloration de l'échantillon, ou encore après réaction d'immunofluorescence. Cet examen renseigne sur la présence de bactéries confirmant l'origine bactérienne d'une infection (morphologie, propriétés tinctoriales particulières après coloration de Gram ou coloration de Ziehl-Neelsen), ce qui représente un élément

## Chapitre I prélèvement

majeur pour une prise en charge thérapeutique adaptée. Ainsi, cet examen oriente sur une famille de bactéries ou un genre bactérien, permettant d'adapter ou de modifier une antibiothérapie. En fonction du prélèvement ou du contexte clinique, il peut dans certains cas, en quelques minutes, identifier de façon quasi certaine un pathogène. Mais dans la majorité des cas, cet examen représente la première étape du diagnostic bactériologique et permet d'orienter les techniques d'isolement et d'identification du germe responsable.

L'examen renseigne également sur la quantité de bactéries présentes dans le prélèvement. Si l'on estime que, lors d'une observation à un grossissement de 1000 fois (oculaire de 10 et objectif 100 à l'immersion), le volume observé correspond à  $1/1000^{\text{e}}$  de  $\mu\text{l}$ , alors l'estimation de la quantité de bactéries visibles lors d'un examen direct peut être donnée selon le Tableau 2.

**Tableau 2: Estimation de la quantité de bactérie par ml de prélèvement en fonction de la quantité de bactérie visible au microscope à un grossissement de 1000 fois.**

Nombre de bactéries par champ	Quantité de bactéries par ml
<b>1 bactérie par 100 champs</b>	$10^4$ bactéries/ml (seuil estimé de sensibilité du microscope optique)
<b>1 bactérie par 10 champs</b>	$10^5$ bactéries/ml
<b>1 bactérie par 1 champ</b>	$10^6$ bactéries/ml
<b>10 bactéries par champ</b>	$10^7$ bactéries/ml
<b>100 bactéries par champ</b>	$10^8$ bactéries/ml

### *1.6.4.1. Examen direct à l'état frais*

Les méthodes fondées sur la technique de l'état frais correspondent à l'observation d'un matériel biologique ou d'une suspension bactérienne entre lame et lamelle sans fixation préalable du matériel par la chaleur ou l'alcool.

#### *1.6.4.1.1. État frais*

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40. Les renseignements obtenus par cette observation concernent principalement la mobilité des bactéries. Il faut cependant être prudent sur le fait que des courants de convection dans ces conditions peuvent être présents et perturber l'observation. En fonction de la mobilité observée, si elle est présente, on peut préjuger du type de ciliature de la bactérie (monotriche, péritriche, etc.), ce qui oriente sur la

## Chapitre I prélèvement

bactérie en cause. Ainsi, par sa mobilité, *Pseudomonas aeruginosa* par exemple peut se distinguer aisément d'une entérobactérie. Cet examen peut s'avérer très utile lors de la positivité d'une hémoculture. En effet, un doute peut persister sur l'orientation d'identification, après coloration de Gram d'un étalement du bouillon d'hémoculture coloré. Une mobilité importante avec des bacilles qui traversent le champ microscopique est en faveur de *P. aeruginosa* alors qu'une entérobactérie mobile sera mobile sur elle-même dans la majorité des cas. Certaines bactéries de mobilité caractéristique sont également repérées par la technique de l'état frais, comme les vibrions ou les campylobactéries.

Cet examen peut être effectué après avoir luté la lamelle sur la lame, c'est-à-dire après avoir déposé sur la totalité du pourtour de la lamelle un peu de paraffine préalablement fondue (Figure 5). Cette méthode permet de « sceller » la lamelle et ainsi d'empêcher les courants de convection. Dans ces conditions, une observation à l'immersion peut être effectuée.



**Figure 5: Réalisation de l'état frais après avoir luté la lamelle sur la lame.**

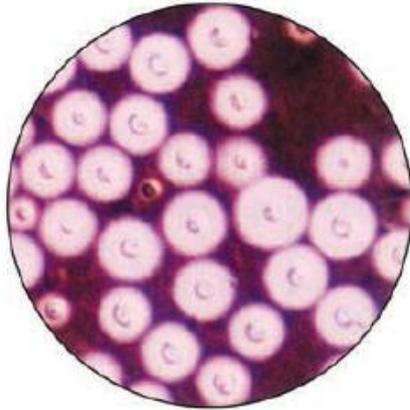
A) La lame est posée sur un chevalet ; la paraffine va être fondue en chauffant au bec Bunsen une tige métallique. B) Les quatre côtés de la lamelle vont être scellés par la paraffine. C) Observation à l'immersion, objectif 100, de la préparation.

### *1.6.4.1.2. État frais pour mise en évidence d'une capsule par méthode à l'encre de Chine*

La mise en évidence d'une capsule bactérienne peut être effectuée par coloration « négative », les capsules ne se colorant pas en présence d'encre de Chine. Néanmoins, en pratique quotidienne, cette technique est principalement utilisée pour la mise en évidence de la capsule de *Cryptococcus neoformans*, une levure impliquée dans des infections du système nerveux central chez le patient immunodéprimé, en

## Chapitre I prélèvement

particulier pour les malades VIH positifs. Un état frais après coloration du produit pathologique prélevé (en l'occurrence le liquide céphalorachidien pour les cryptocoques) peut être réalisé. Une goutte du liquide pathologique et une goutte d'encre de Chine sont déposées côte à côte sur une lame. Une lamelle vient recouvrir les deux gouttes et les deux constituants se mélangent. Lorsque ces levures capsulées sont présentes, elles sont visibles par la présence d'un large halo clair, correspondant à la capsule fungique, autour d'une levure éventuellement bourgeonnante (Figure 6).

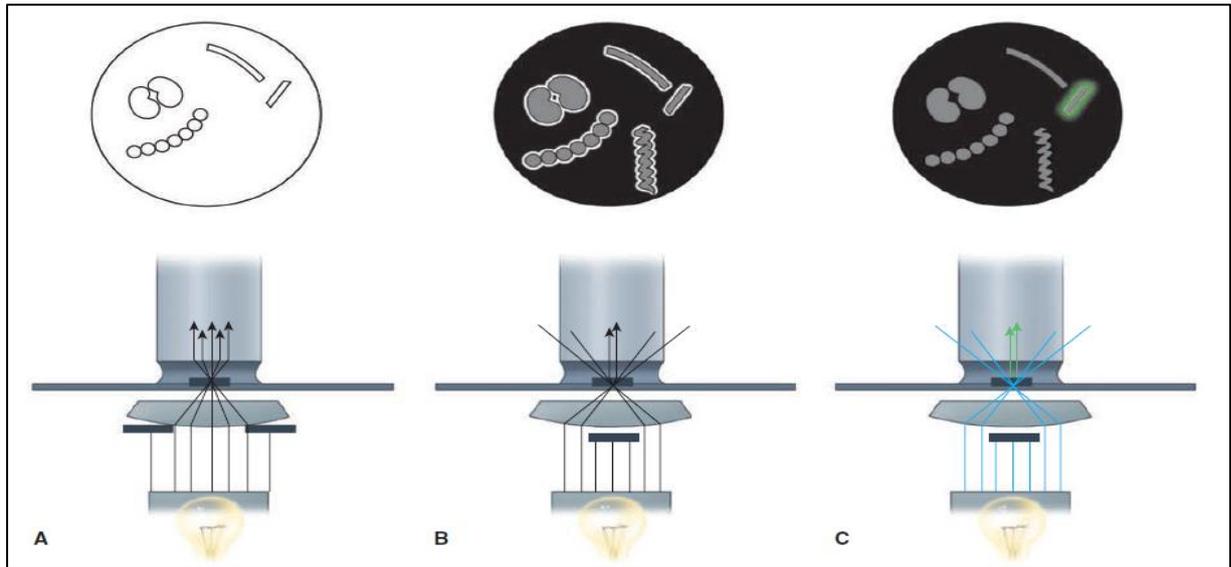


**Figure 6: coloration de la capsule de *Cryptococcus neoformans* par l'encre de Chine.**

### 1.6.4.1.3. État frais sur un microscope à fond noir

Un état frais particulier permet, lorsque le microscope dispose d'un condensateur particulier, d'observer les bactéries par contraste. En effet, les rayons lumineux émis par la source d'éclairage sont déviés par réflexion sur un miroir de telle sorte qu'ils ne peuvent pénétrer l'objectif.

Lorsqu'un élément est présent sur ce trajet lumineux, il modifie le trajet des rayons lumineux qui se trouvent réfractés et pénètrent dans l'objectif. Les éléments apparaissent brillants sur fond noir. Cette technique est intéressante pour les bactéries mobiles qui sont difficilement colorables par les colorations classiques. Le microscope à fond noir s'utilise pour déceler *Treponema pallidum*, corroboré avec les données cliniques, il peut établir l'étiologie de l'infection. Ainsi, les spirochètes et en particulier les tréponèmes (Figure 7b) et les leptospires sont facilement repérables à l'aide de cette méthode, avec visualisation de la mobilité et présence de spires régulières pour les premiers et mise en évidence d'une mobilité par flexion pour les seconds.



**Figure 7 : Différents types de microscopes.**

*A : Microscope à fond clair ; B : Le microscope à fond noir ; C : microscope à fluorescence.*

### ***1.6.4.2. Examen microscopique après coloration***

Les techniques les plus communément utilisées au laboratoire de bactériologie médicale font appel à des colorations. La préparation est fixée sur une lame puis colorée. Plusieurs types de coloration existent. Les colorations non différentielles, anciennes, peu utilisées en pratique, colorent toutes les bactéries de la même façon sans distinction, si ce n'est qu'elles permettent de mieux visualiser les morphologies bactériennes et de préciser les agencements des bactéries les unes avec les autres.

Les colorations différentielles distinguent les bactéries en fonction de la structure de leur paroi. Deux colorations de référence sont employées, la coloration de Gram distinguant bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif, et la coloration de Ziehl-Neelsen mettant en évidence les bacilles acido-alcool-résistants. Certaines colorations spéciales sont aussi utilisées.

#### ***1.6.4.2.1. Coloration non différentielle – coloration au bleu de méthylène***

La coloration au bleu de méthylène est une technique simple qui colore tout en bleu. Elle ne donne donc que la forme des bactéries éventuellement présentes, sans permettre de différencier les bactéries sur base de la résistance de leur paroi à la décoloration (Gram positif / Gram négatif).

La coloration au bleu de méthylène est réalisée en faisant couler une solution de bleu de méthylène sur un frottis correctement fixé. Le temps de contact est d'une minute. La lame est ensuite rincée à l'eau du robinet, séchée entre deux feuilles de papier buvard, puis observée à l'immersion. Les structures colorables apparaissent bleues. Néanmoins, cette méthode n'est que peu informative. On

## Chapitre I prélèvement

observe des bactéries bleu foncé sur un fond bleu clair. On peut aussi observer des leucocytes, des PMN, des lymphocytes, des levures, etc (Figure 8). Son utilisation principale est la recherche de diplocoques intra et/ou extra cellulaires dans un L.C.R. ou dans un pus urétral. Il s'agit d'une technique complémentaire à la coloration de Gram, qui n'utilise qu'un produit simple toujours disponible dans un hôpital de district. Elle présente en outre le grand avantage d'être techniquement immanquable.



**Figure 8: Coloration au bleu de méthylène.**

### *1.6.4.2.2. Coloration différentielle*

#### 1. Coloration de Gram

C'est la coloration de référence en bactériologie. Elle est réalisée comme suit et le résultat obtenu à chaque étape est schématisé dans la Figure 9a.

Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool:

- recouvrir la lame de violet de gentiane : 1 minute ;
- rejeter le violet de gentiane ;
- recouvrir de lugol : 1 minute;
- rejeter le lugol ;
- décolorer à l'alcool, la lame étant tenue inclinée. La durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis. En pratique, la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair ;
- stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau;
- recouvrir la lame de fuchsine diluée, 30 secondes à 1 minute ;
- laver à l'eau ;

## Chapitre I prélèvement

- sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur ;
- examiner à l'immersion.

La coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. On distingue ainsi deux grands groupes de bactéries grâce à la structure de leur paroi: les Grams positifs et les Grams négatifs.

La paroi des bactéries est un élément rigide présent chez presque toutes les bactéries, à qui elle donne la forme et confère une protection mécanique. Elle contient une structure rigide, composée de sucres et de différents acides aminés, appelée le peptidoglycane. Dans la paroi des bactéries à Gram négatif, il existe une membrane externe, composée de protéines, lipides et polysaccharides. Cette membrane externe n'est pas présente chez les bactéries à Gram positif. La différence de couleur, violet pour les bactéries à Gram positif et rouge pour les bactéries à Gram négatif, est due à des différences de structure, plus exactement, de perméabilité de la paroi cellulaire. La rétention du cristal violet par les Grams positifs peut également être due en partie au protoplasme plus acide de ces organismes se liant au colorant basique (aidé par l'iode). La coloration de Gram est une technique délicate. L'élément essentiel et critique est la décoloration par l'alcool (ou l'alcool acétone). Une décoloration trop courte donnera de faux Grams positifs, alors qu'une décoloration trop longue donnera de faux Grams négatifs.

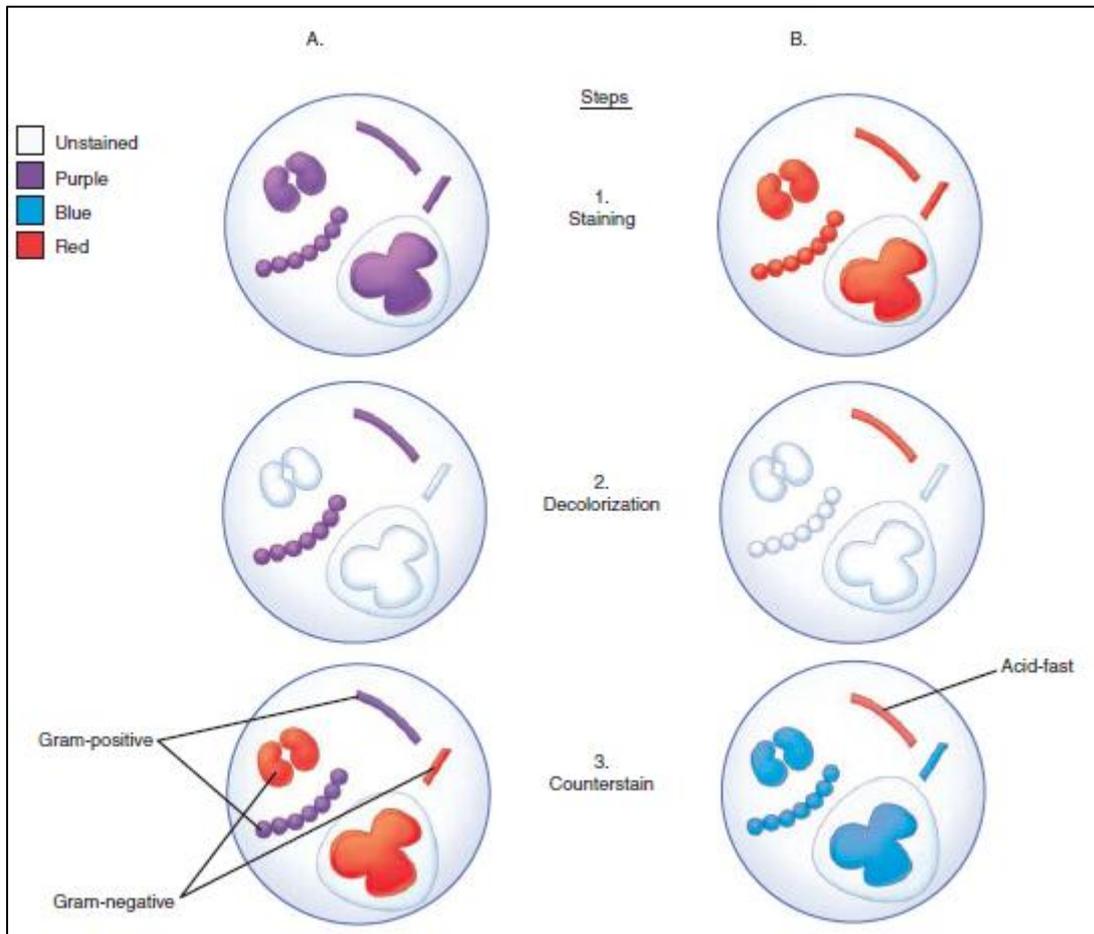
Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (Figure 9a). Lorsque la coloration est effectuée à partir d'un produit pathologique contenant des cellules ou des leucocytes, la coloration des noyaux de ces cellules doit apparaître violette et le cytoplasme rose.

Des variantes existent de cette coloration dans lesquelles le violet de gentiane est remplacé par le cristal violet. La décoloration à l'alcool peut être remplacée par une décoloration avec un mélange alcool-acétone. Enfin, la fuchsine peut être remplacée par de la safranine.

Des techniques de coloration utilisant des appareils à colorer par spray sont également disponibles. Elles offrent l'avantage de consommer moins de colorant et d'éviter le rejet de colorants sous forme liquide. Lorsque les prélèvements sont hémorragiques, les nombreuses hématies peuvent gêner l'observation microscopique.

Dans ce cas, les frottis sont immergés pendant 5 minutes dans le liquide de Carnoy (24 ml de chloroforme, 8 ml d'acide acétique, 100 ml d'alcool éthylique qsp).

## Chapitre I prélèvement



**Figure 9: Principe de la coloration de Gram et la coloration de Ziehl-Neelsen**

*A : coloration de Gram ; B : coloration de Ziehl-Neelsen.*

### 2. Coloration de Ziehl-Neelsen, coloration des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR)

La coloration de Ziehl-Neelsen est une coloration assez spécifique pour les mycobactéries. Elle repose sur une caractéristique fondamentale des mycobactéries : leur alcoolo-acido résistance, liée à la présence importante de lipides au niveau de leur paroi. Des variantes de cette méthode existent, en particulier la coloration de Kinyoun et Gabett.

Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool méthylique:

- recouvrir la lame de fuchsine : chauffer par intermittence pendant 10 à 15 minutes, jusqu'à émission de vapeurs (pour la technique à froid, la durée de contact entre la fuchsine et la préparation est de 3 heures) voire figure ci-dessous;

## Chapitre I prélèvement

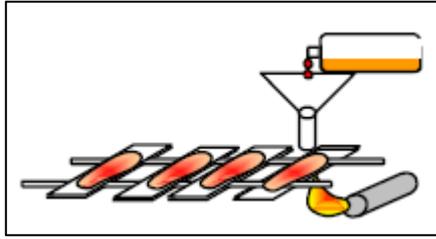


Figure 10: Chauffage des lames.

- laver à l'eau ;
- décolorer à l'acide sulfurique dilué au quart : 1 minute ;
- laver à l'eau ;
- décolorer à l'alcool à 95° pendant 10 minutes;
- laver à l'eau ;
- contre-colorer au bleu de méthylène pendant 2 minutes ;
- laver à l'eau ;
- sécher ;
- examiner à l'immersion.

Les bacilles acido-alcoolo-résistants apparaissent roses sur fond bleu (Figure 9b).

### 1. Colorations spéciales

Certaines colorations spéciales permettent de mettre en évidence des éléments de la cellule bactérienne comme les flagelles, les spores bactériennes.