



Techniques d'analyses des produits pathologiques

Master II BPC
2021/2022

Enseignant. Ramzi LAMRAOUI


Analyses biologiques

Définition

Un ensemble d'étapes successives, allant du prélèvement de l'échantillon biologique (sang, urine, selle, LCR,.....) jusqu'à la remise des résultats.



Produits pathologiques ?



Produits pathologiques

=

Produits biologiques contaminés

Produits pathologiques

Ce sont des produits biologiques où se sont multipliés des micro-organismes responsables de l'infection.

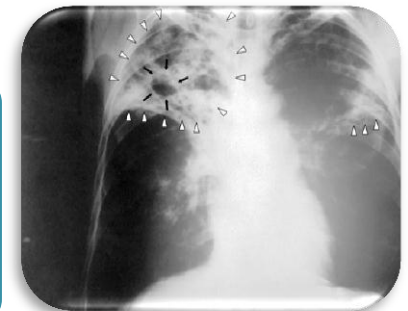
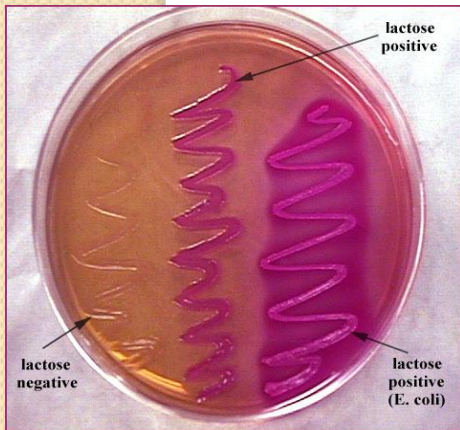
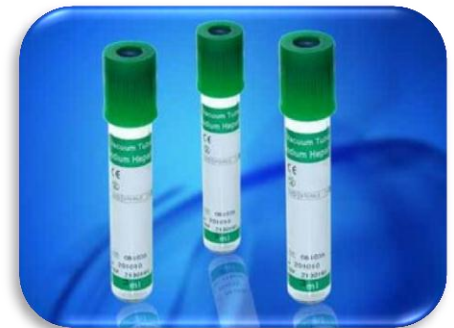
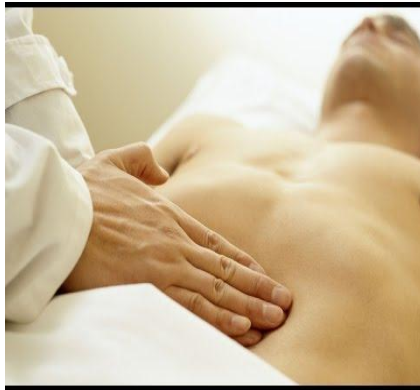
Diagnostic de l'infection

Diagnostic clinique

Diagnostic para clinique

Examen microbiologique

Examens non microbiologiques



Analyses des produits pathologiques

Objectives

- ❑ d'isoler et d'identifier les micro-organismes pathogènes.
- ❑ de mesurer leur **sensibilité**(s) aux antibiotiques habituellement actifs sur cette ou ces bactérie(s).
« Antibiogramme »
- ❑ Identification  suivi épidémiologique

Règles générales concernant l'analyse bactériologique

Une analyse bactériologique ne doit pas se résumer à une simple technique, mais doit être orientée selon la demande du clinicien et selon les renseignements cliniques qui accompagnent le prélèvement.

Elle comprend 3 phases (pré-analytique, analytique et post-analytique).

Phases analytiques des analyses de microbiologie médicale

Phase	Définition
pré analytique	série d'étapes commençant chronologiquement par la prescription des analyses par le clinicien, comprenant la demande d'analyse, la préparation du patient, le prélèvement du spécimen, l'acheminement jusqu'au laboratoire et au sein du laboratoire et finissant au début de la procédure analytique.
analytique	comprend tous les événements qui peuvent se produire pendant l'analyse à proprement parlée.
post analytique	concerne tous les évènements qui peuvent se produire après l'analyse (remise des résultats,.....).

N.B. Les phases : pré-analytique et analytique sont les phases *critiques*

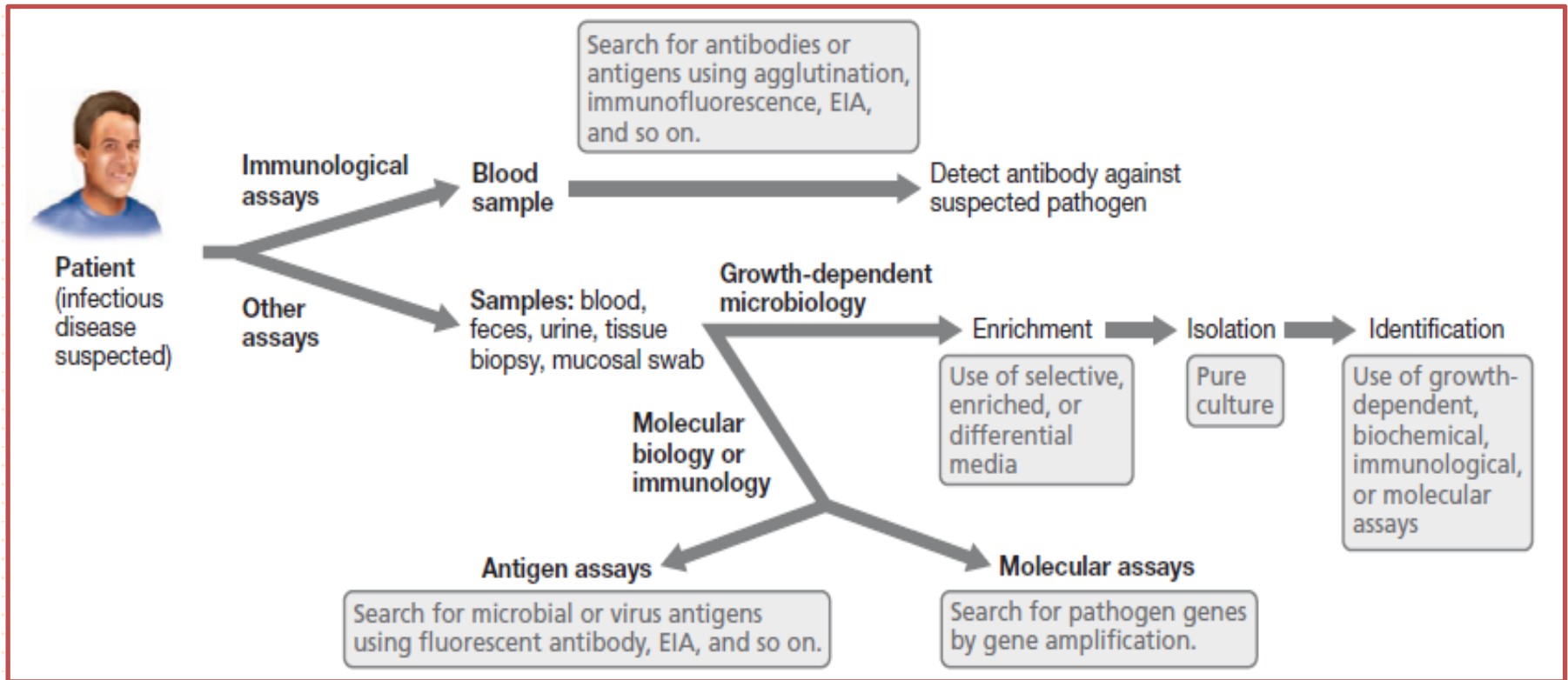


Démarche de l'examen bactériologique

Démarche de l'examen bactériologique

Le diagnostic bactériologique est un ensemble de moyens permettant de confirmer telle ou telle étiologie infectieuse d'origine bactérienne. Ces moyens diagnostiques sont variés et caractérisent soit le diagnostic **direct** soit celui **indirect** :

Démarche de l'examen bactériologique



Laboratory identification of microbial pathogens. The flowchart shows alternative paths for identifying pathogens or pathogen exposure in the clinical laboratory.

Démarche de l'examen bactériologique

DIAGNOSTIC DIRECT : mise en évidence de la bactérie elle-même, donc finalement de sa culture ou isolement qui permettra l'identification ultérieure ainsi que de préciser sa sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

Démarche de l'examen bactériologique

DIAGNOSTIC DIRECT

Ceci n'est pas toujours possible soit :

- ❑ L'agent a disparu avant ou peu après l'apparition des symptômes (ex : Rhumatisme articulaire aigu , brucellose) ou a la suite d'un traitement antibiotique trop hâtif.
- ❑ La bactérie de culture impossible, ex : agent de la syphilis (tréponème)
- ❑ La bactérie est de culture très lente ou nécessite des milieux de culture spéciaux. Isolement fait par des laboratoires spécialisés (ex : agent de pneumopathie atypiques : chlamydiae, mycoplasmes).

Démarche de l'examen bactériologique

DIAGNOSTIC DIRECT

Ceci n'est pas toujours possible

- L'agent a des symptômes non spécifiques

(apparition des symptômes (brucellose) ou



On a donc recourt à d'autres moyens de diagnostic direct : recherche d'Ag bactérien ou mise en évidence de séquences d'ADN spécifiques de bactéries.

la syphilis

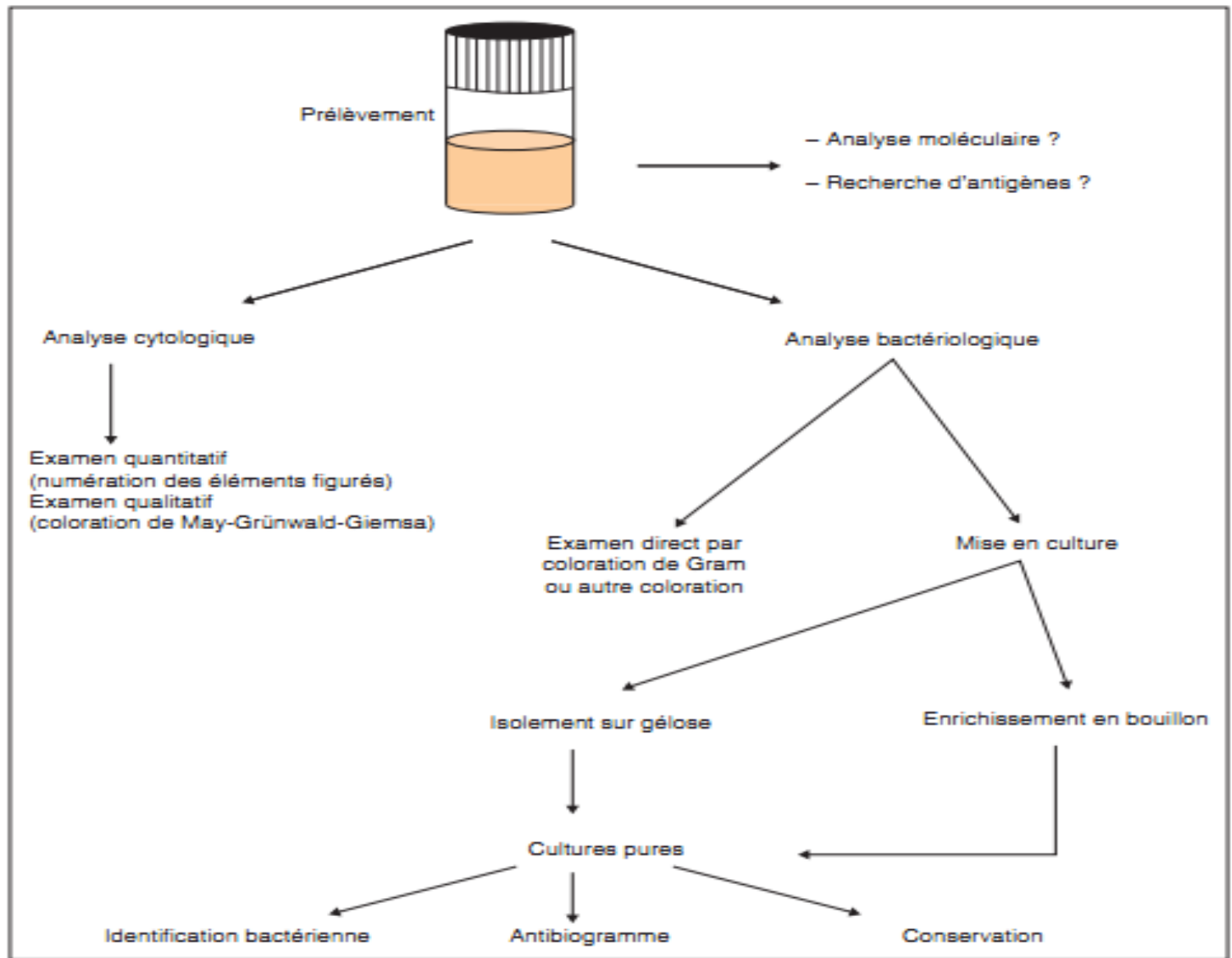
- Les agents sont difficiles à cultiver ou nécessitent des milieux de culture particuliers (ex : maladie amorphe) ou nécessitent des laboratoires spécialisés (ex : maladie amorphe atypiques : chlamydiae, myco)

Démarche de l'examen bactériologique

DIAGNOSTIC INDIRECT : mise en évidence de la réponse de l'organisme à l'infection par la présence d'anticorps spécifiques, le plus souvent sériques ou plus rarement par une réponse d'hypersensibilité, dite allergique.

Démarche de l'examen bactériologique

RETENIR : Le diagnostic direct est le seul diagnostic de *certitude*, car il permet la mise en évidence de la bactérie elle-même, donc finalement sa culture ou isolement qui permettra l'identification ultérieure mais aussi de préciser sa sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).



Démarche de l'examen bactériologique

I- Les prélèvements (1ere étape du diagnostic)

Les prélèvements permettant de mettre en évidence une bactérie responsable d'une infection dépendent du **site anatomique** atteint, mais peuvent correspondre à des **liquides biologiques** dans lesquels la bactérie ou des antigènes bactériens peuvent être détectés.

Les échantillons biologiques sont prélevés dans des flacons stériles puis transmis au laboratoire le plus rapidement possible.

Produits pathologiques

Monomicrobiens

Les monomicrobiens sont des produits biologiques, qui est **stérile** à l'état normal. Par exemple: *Le LCR, le sang, les liquides pleuraux, les liquides d'arthrite, les liquides Péricardes.*

En général, on isole qu'une seule bactérie responsable de l'infection

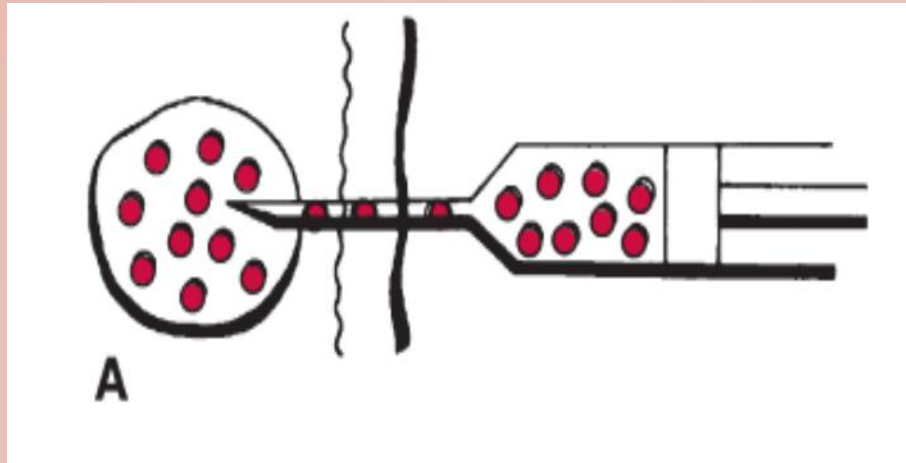
Polymicrobiens

Les polymicrobiens sont issus de cavités naturelles qui sont normalement **septiques**. Ce sont des produits riches en germes. Par exemple: *Selles, Sécrétions buccales, vaginales, rhinopharyngées.*

Il y a de difficulté dans l'interprétation des résultats

I- Les prélèvements

sites normalement stériles

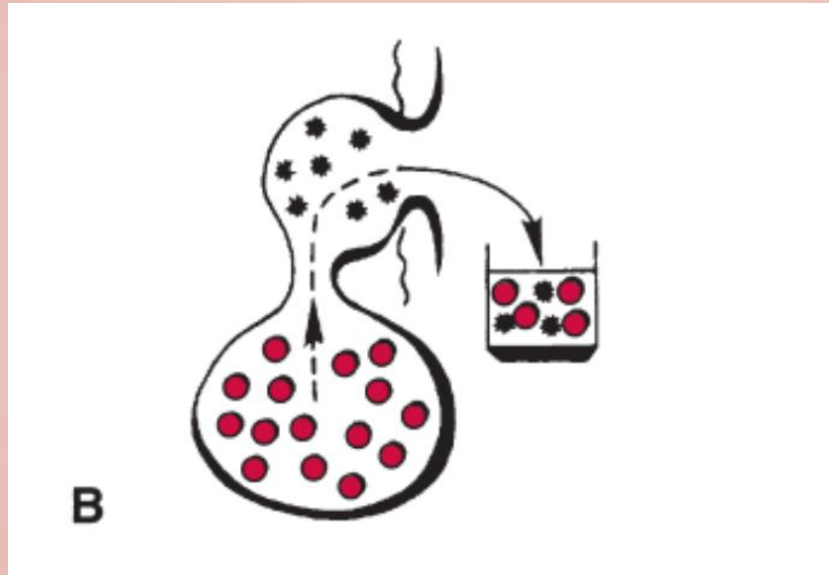


(liquide céphalorachidien, liquide articulaire, sang, biopsies, etc.)

- ➡ contamination est très peu probable
- ➡ si la désinfection a été correctement exécutée.
- ➡ L'interprétation est relativement aisée.

I- Les prélèvements

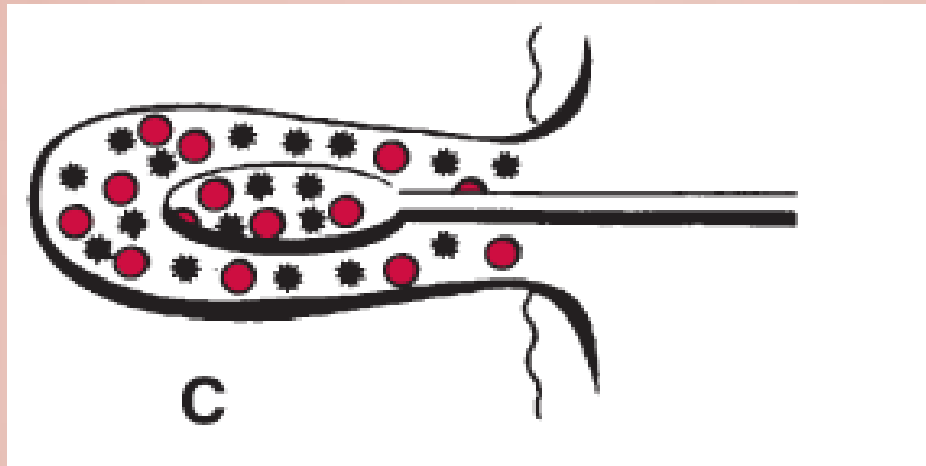
- ❖ site anatomique normalement stérile mais la contamination par une flore endogène est pratiquement obligatoire.



les prélèvements pulmonaires profonds comme les brossages distaux, même s'ils sont protégés).

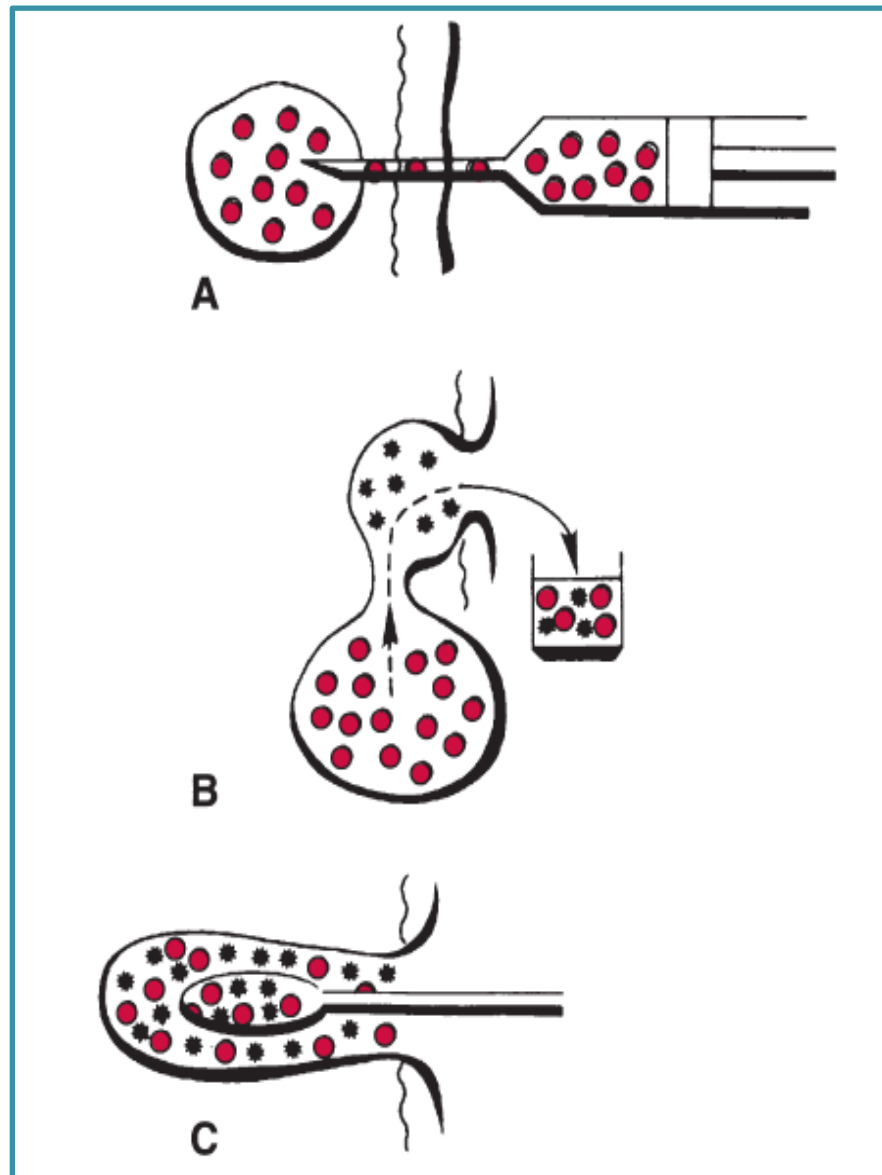
I- Les prélèvements

- ❖ Enfin, lorsque la bactérie responsable de l'infection est associée à une flore endogène.



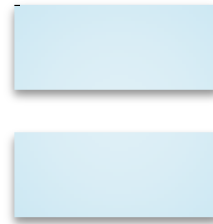
(c'est le cas dans les infections digestives, les infections cutanées, les angines, etc.),

- ➡ interférer avec l'isolement de la bactérie,
- ➡ l'utilisation de milieux **sélectifs**.



Récapitulatif des lieux de prélèvements

**Bons
prélèvements**



**Bons
résultats**

I- Les prélèvements

I-I - Le préleveur

Il doit respecter les règles de soins et d'hygiène, notamment en ce qui concerne (le port de gants, blouse et dans certains cas de masques ou de lunette de protection).

Tout produit pathologique doit être considéré comme potentiellement infectieux



4 niveaux de sécurité biologique

BSL (Biosefty Laboratory Level 1, 2, 3, 4)

Tableau 1. Classification des micro-organismes infectieux par groupe de risque

Groupe de risque 1 (*risque faible ou nul pour les individus ou la collectivité*)

Micro-organisme qui, selon toute probabilité, ne peut causer de maladie humaine ou animale.

Groupe de risque 2 (*risque modéré pour les individus, faible pour la collectivité*)

Germe pathogène capable de provoquer une maladie humaine ou animale mais qui ne présente vraisemblablement pas un sérieux danger pour le personnel de laboratoire, la collectivité, le bétail ou l'environnement. Une exposition en laboratoire est susceptible d'entraîner une infection grave, mais qui peut être traitée ou prévenue efficacement; par ailleurs le risque de propagation de l'infection est limité.

Groupe de risque 3 (*risque important pour les individus, faible pour la collectivité*)

Germe pathogène qui cause habituellement une grave maladie humaine ou animale, mais qui ne se transmet généralement pas d'un individu à l'autre. Il existe un traitement et des mesures préventives efficaces.

Groupe de risque 4 (*risque important pour les individus comme pour la collectivité*)

Germe pathogène qui cause habituellement une grave maladie humaine ou animale et peut se transmettre facilement d'un individu à l'autre, soit directement, soit indirectement. Il n'existe généralement ni traitement, ni mesures préventives efficaces.

I-1- Le préleveur

Chaque pays ou région devra établir une classification nationale ou régionale, par groupe de risque, des micro-organismes. Cette classification devra reposer sur les critères suivants :

- Pathogénicité du germe.

- Mode de transmission et gamme d'hôtes, qui peuvent dépendre de l'état immunitaire de la population locale, de la densité et de la mobilité des hôtes, de la présence de vecteurs appropriés et du niveau d'hygiène de l'environnement.

I-1- Le préleveur

- ❑ Possibilité de prendre localement des mesures préventives efficaces, lesquelles peuvent comprendre : une prophylaxie par vaccination ou administration d'immunsérums (immunisation passive), des mesures sanitaires concernant par exemple l'hygiène des aliments et de l'eau, l'élimination des réservoirs animaux ou des arthropodes vecteurs.
- ❑ Possibilité de dispenser localement un traitement efficace : immunisation passive, vaccination post-exposition, utilisation d'anti-infectieux et d'agents chimiothérapeutiques ou antiviraux, sans négliger le risque d'apparition de souches pharmacorésistantes.

I-2- Le moment de prélèvement

Avant l'administration d'agents antimicrobiens (ATB,...).

le début de processus infectieux (pic fébrile).

N.B. Si la sévérité de l'évolution ne permet pas l'arrêt des antibiotiques pendant plus de quelques heures, l'antibiothérapie en cours reste justifiée et des modalités techniques particulières peuvent être proposées. L'ensemencement pourra par exemple être pratiqué dans des milieux liquides permettant de **diluer les antibiotiques** de l'échantillon, ou dans des milieux contenant **des inhibiteurs d'antibiotiques**.

I-3- Le site de prélèvement

Le site de prélèvement

Les plus proches du foyer infectieux initial

Les localisations secondaires

La porte d'entrée

Les voies d'*excrétion* ou d'*évacuation* de l'infection (fistule, drainage).

1-4- Une quantité suffisante de matériel est nécessaire pour une analyse complète

Une **trop petite quantité** de matériel ne permet pas au laboratoire de réaliser les frottis et les cultures appropriés. Le microbiologiste privilégie alors les techniques permettant la reconnaissance des bactéries les plus souvent en cause.

1-4- Une quantité suffisante de matériel est nécessaire pour une analyse complète

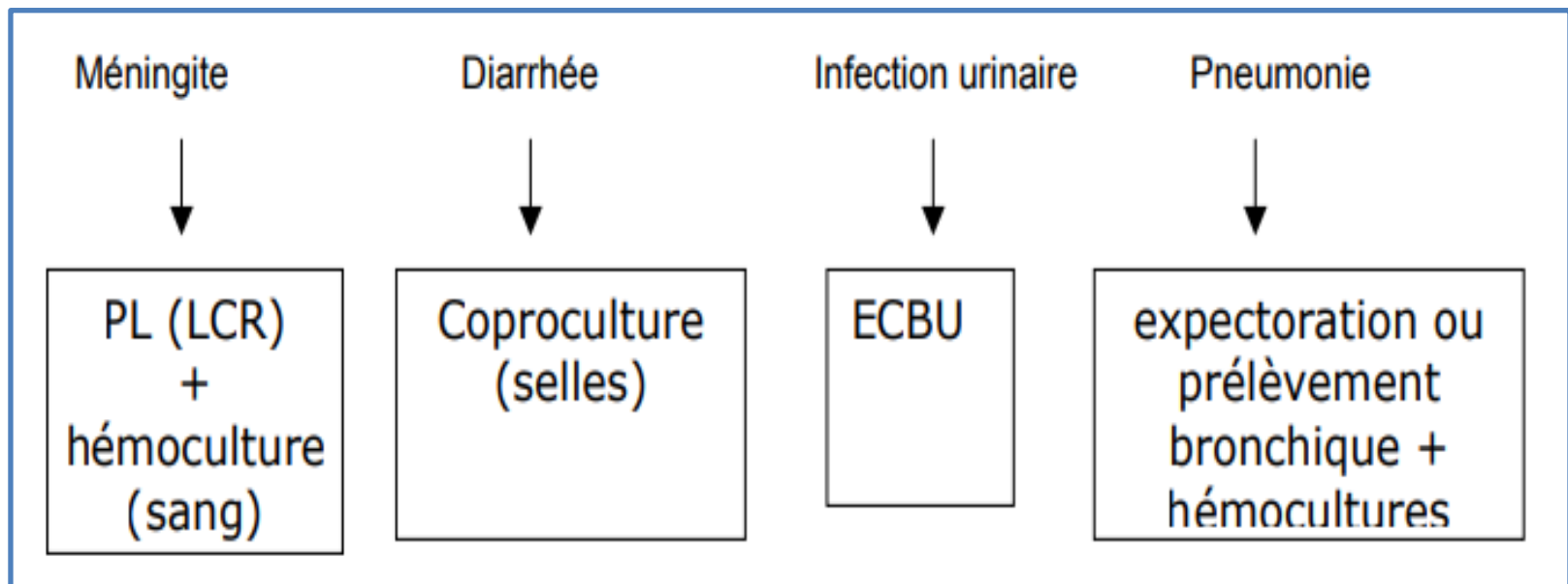
Ceci est particulièrement problématique pour les **lésions chroniques** contenant un petit nombre de micro-organismes qui risquent de ne pas être **déTECTÉS** à l'examen microscopique d'un frottis, ni même **récupÉRÉS** en culture. Des volumes insuffisants peuvent donc donner lieu à des résultats **faussement négatifs**.

1-4- Une quantité suffisante de matériel est nécessaire pour une analyse complète

Comme les échantillons de **sang**, les produits de ponction ou de biopsie contenant une faible quantité de bactéries peuvent êtreensemencés directement dans un milieu de culture liquide. Il faut alors réduire au maximum les risques de contamination par des bactéries se multipliant plus rapidement que l'agent pathogène.

I-5- Les méthodes de prélèvement

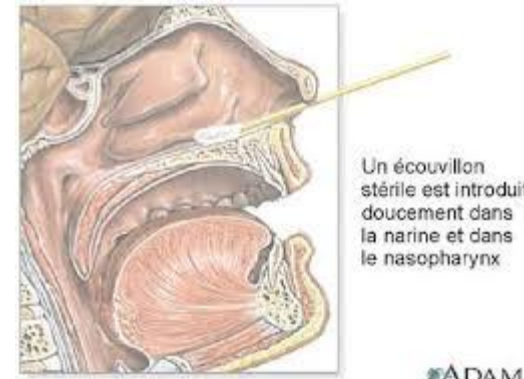
Dépendant des micro-organismes capable d'infecter différents organes ou tissus. Elles dépendent également du type de lésion et de l'enjeu du diagnostic étiologique, *en limitant les indications des prélèvements invasifs* selon le bénéfice escompté et les risques **iatrogènes**.



I-5- les méthodes de prélèvement

Dans **tous** les cas, les prélèvements seront réalisés avec du matériel ***stérile*** à usage unique, selon les règles d'hygiène et d'asepsie appropriées.

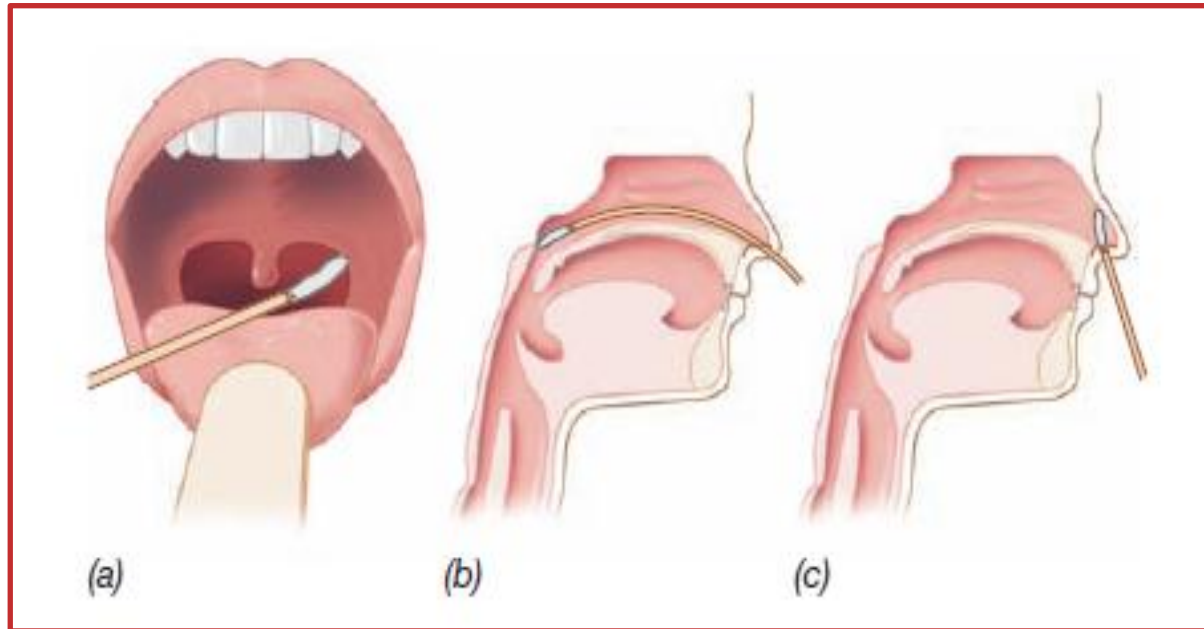
I-5- Les méthodes de prélèvement



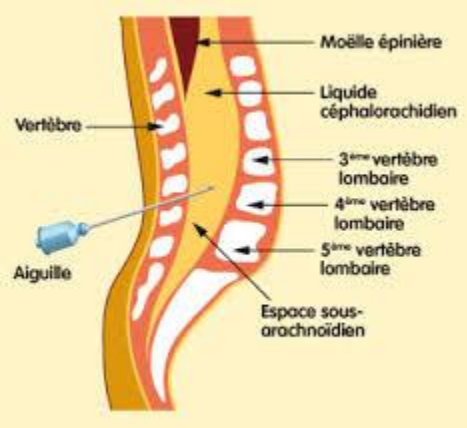
Écouvillonnage

Faible volume
d'échantillon recueilli,
Risque de dessiccation
et de contamination

Usage limité aux
prélèvements des
téguments ou des
muqueuses



Specimens from the upper respiratory tract. (a) Throat swab. (b) Nasopharyngeal swab passed through the nose. (c) Swabbing the inside of the nose.



Suppurations d'une séreuse, d'un organe creux ou d'une cavité abcédée

ponction

cathétérisme

chirurgie

I-6- Contamination des prélèvements

- Bactéries de l'environnement (saprophyte)
- Bactéries commensales (microbiote)

Ceci concerne en particulier les infections dont le site est respiratoire, ORL, oculaire, intestinal, génito-urinaire, cutané ou sous cutané.

Les procédés de décontamination de surface comportent soit le simple rinçage avec de sérum physiologique stérile ou l'utilisation sur la peau une solution antiseptique.

I-7- Récipients contenant les échantillons

Identification de récipient

- ❑ Nom, prénom et la date de naissance de malade
- ❑ La date, l'heure, la nature et le site de prélèvement.

1-8- Délai de transport et conservation des échantillons

En règle générale, les bactéries ne résistent pas à la dessiccation et au froid, en particulier lorsque de petits volumes d'échantillon sont prélevés.

La plupart des échantillons primaires peuvent être transportés à température ambiante (22°C) s'ils sont apportés rapidement au laboratoire (délai inférieur à 4h).

Les bactéries qui ne supportent pas de délai peuvent être préservées dans des *milieux de transport* (assurent la survie des germes sans provoquer de multiplication).

1-9- Conservation des échantillons

Pour éviter la dessiccation des échantillons de faible volume, notamment sur écouvillon, ceux-ci peuvent être placés dans des tubes contenant des milieux de transport.

La conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ inhibent la multiplication bactérienne.

Cependant les shigelles sont très sensibles au froid et nécessitent un ensemencement immédiat.

1-10- Milieux de transport

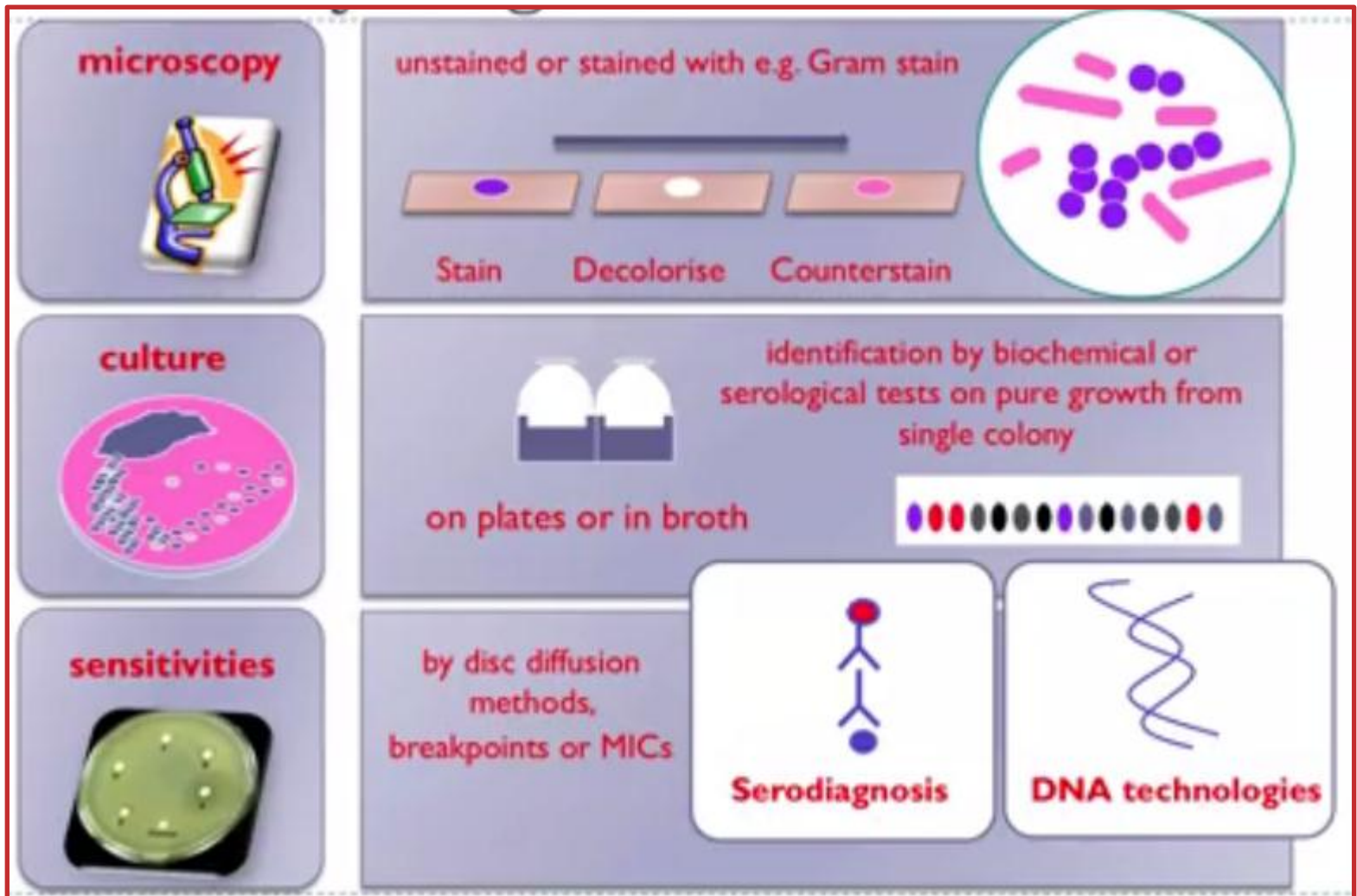
Ces milieux sont destinés à la conservation de certains types de micro-organisme et à l'inhibition des autres organismes de croissance plus rapide.

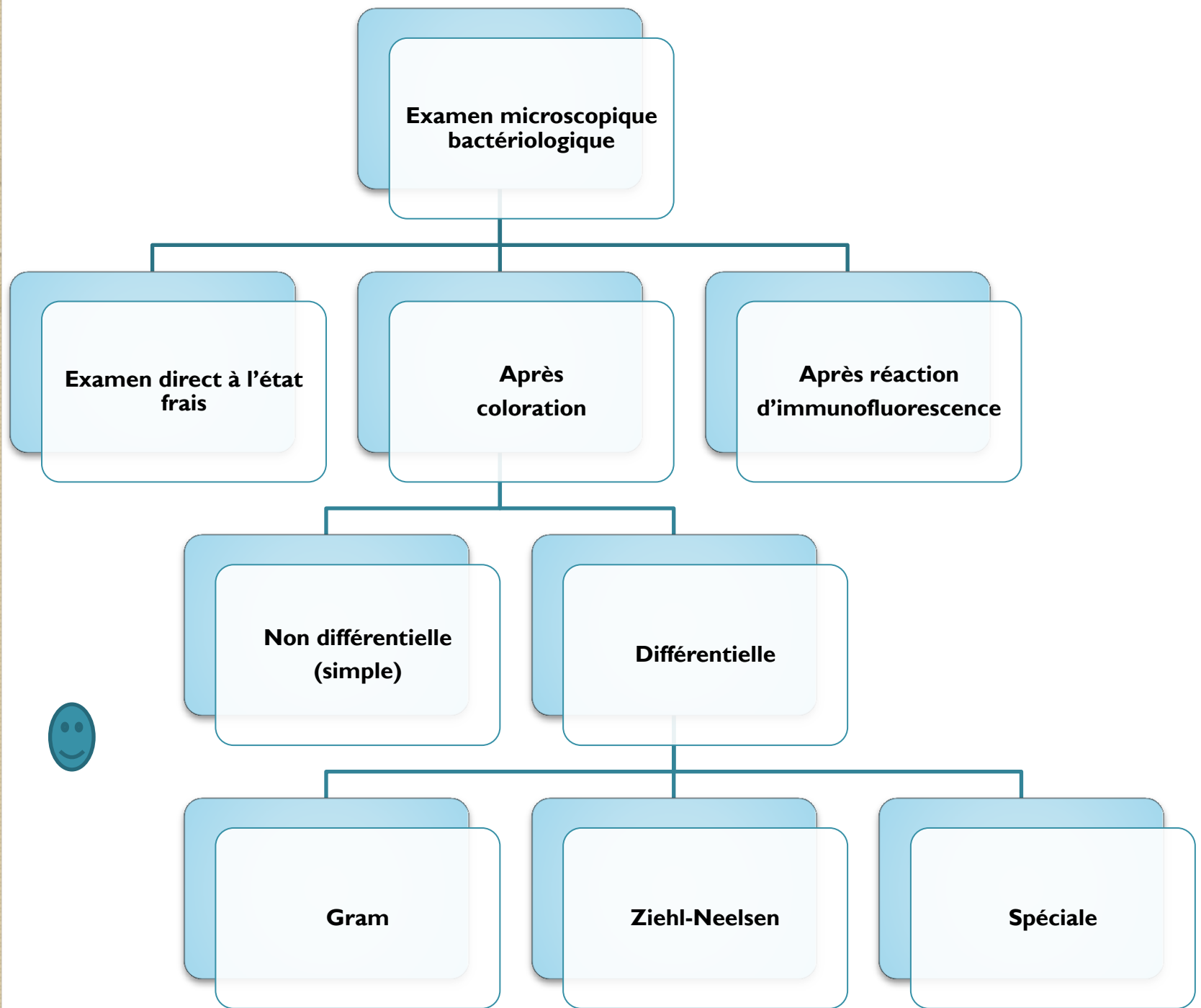
Les milieux de *stuart* conviennent pour la plupart des bactéries, y compris les anaérobies strictes.

Conclusions

- **Ne prélever que si c'est nécessaire**
- **respecter les conditions de prélèvement et de transport**
- **analyser et interpréter en fonction de la clinique**
- **étudier à mauvais escient peut entraîner des erreurs de diagnostic**
- **un traitement antibiotique non nécessaire peut être dangereux pour le patient et/ou l'environnement (population)**

Diagnostique de labo de l'infection





II. Coloration Différentielle

II.1. Coloration de Gram

Coloration basée sur la perméabilité de la paroi des bactéries à l'alcool.

- 1^{er} temps : cristal violet + lugol

⇒ complexe colorant soluble dans l'alcool qui colore en violet le cytoplasme de toutes les bactéries.

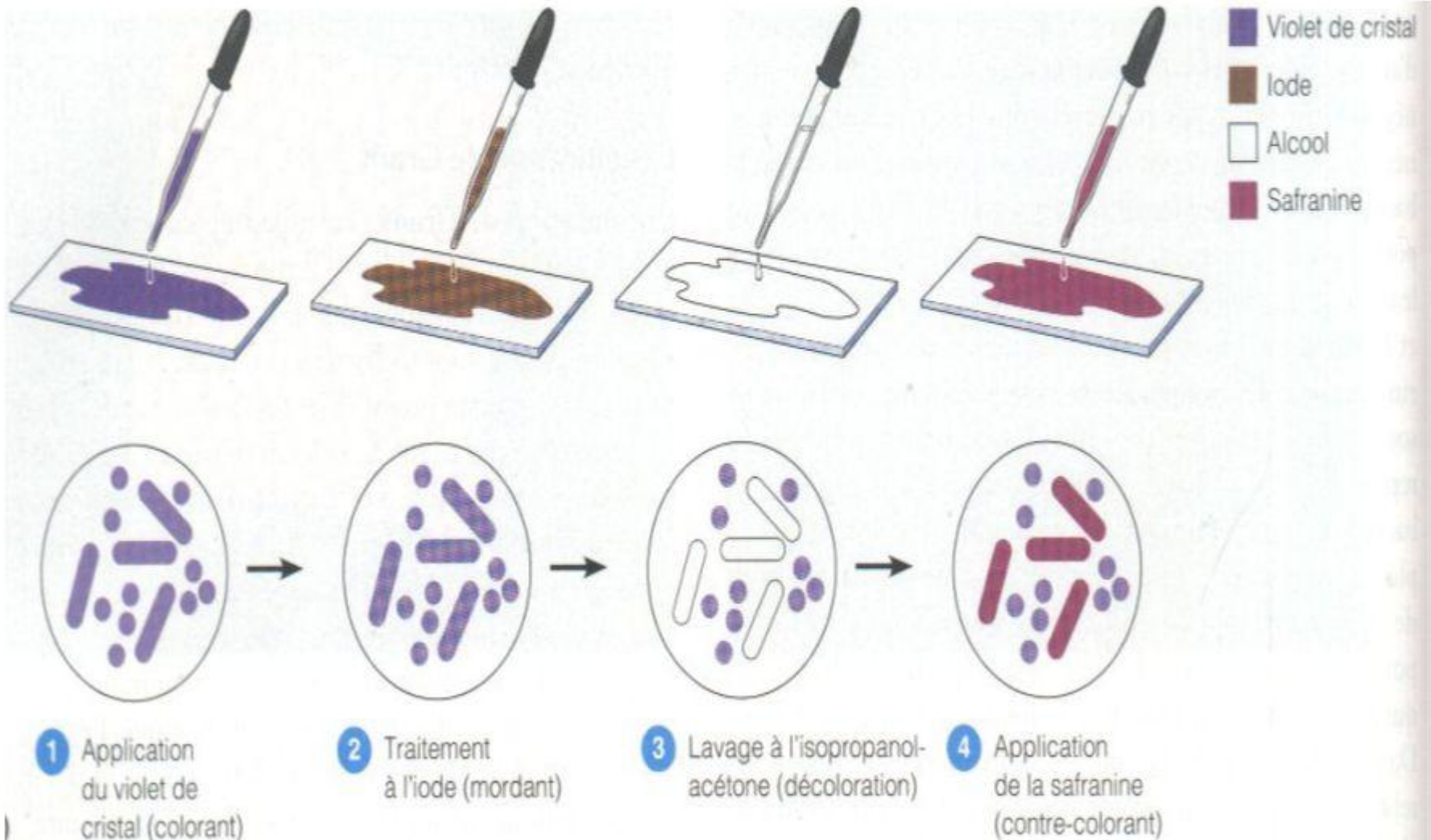
- 2^e temps : décoloration par l'alcool

⇒ l'alcool traverse la paroi des bactéries dites à Gram négatif et dissout le complexe colorant (bactéries décolorées).

⇒ bactéries à Gram positif : la paroi ne se laisse pas traverser par l'alcool (bactéries restent colorées en violet): bactéries dites à **Gram positif**.

- 3^e temps : contre coloration par de la fushine (rose) : les bactéries décolorées apparaissent rose ⇒ on les dit à **Gram négatif** .

Coloration de Gram



Coloration de gram

Chez les bactéries à Gram positif, **la paroi bloque l'extraction** du violet de gentiane et de l'iodure par l'alcool alors qu'elle ne bloque pas cette extraction chez les bactéries à Gram négatif.

Coloration de Gram

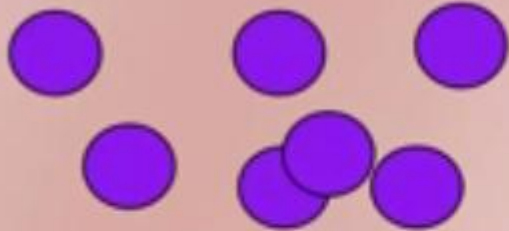
Retenir : La coloration de Gram ne permet pas une identification mais une *orientation*.

Renseigne sur

- la présence (ou absence) de bactéries.
- leur forme (cocci ou bacille, cocobacille, fusiforme).
- leur groupement (amas, chaînettes, diplocoques)
- leur gram (+ ou -) \Rightarrow très utile car oriente *l'antibiothérapie*.

Coloration de Gram (Résultat)

Gram-positive cocci



Gram-positive rods



Gram-negative cocci



Gram-negative rods



Bactéries qui ne sont pas colorable par Gram

1. Bactérie avec une paroi très riche en lipide.
Exp: Mycobactérie
2. Bactérie qui ne possède pas une paroi Exp:
Mycoplasme
3. Bactérie à multiplication intracellulaire
obligatoire. Exp Chlamydia, Rickettsia
4. Bactérie très mince pour la visualiser. Exp
treponema

III Les milieux de culture en bactériologie



III. Les milieux de culture en bactériologie

III.1. Introduction

L'examen direct d'un étalement biologique contenant des bactéries n'est généralement pas suffisant pour identifier l'espèce bactérienne en cause;

seule la culture associée à une galerie d'identification biochimique peut garantir une identification **précise**.

Les milieux de culture en bactériologie

III.2. Définition

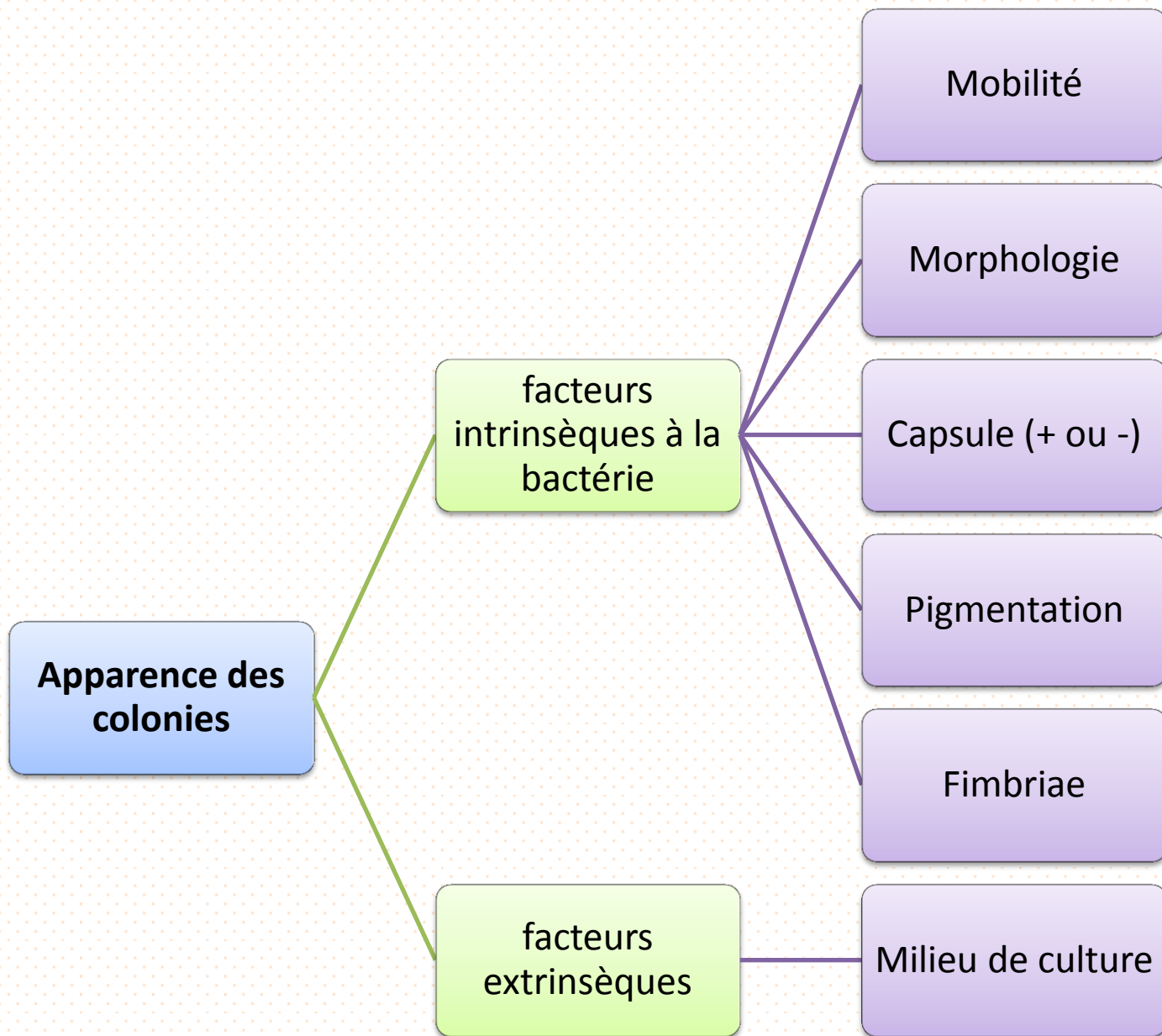
Un **milieu de culture** est composé d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres, etc), d'un système tampon pour éviter les variations importantes du pH, de sels minéraux et de vitamines. Il est possible d'ajouter d'autres facteurs de croissance (sang, protéines, hémoglobine, vitamines). Ils sont de nature solide, semi-solide ou liquide.

Les milieux de culture en bactériologie

III.2. Définition

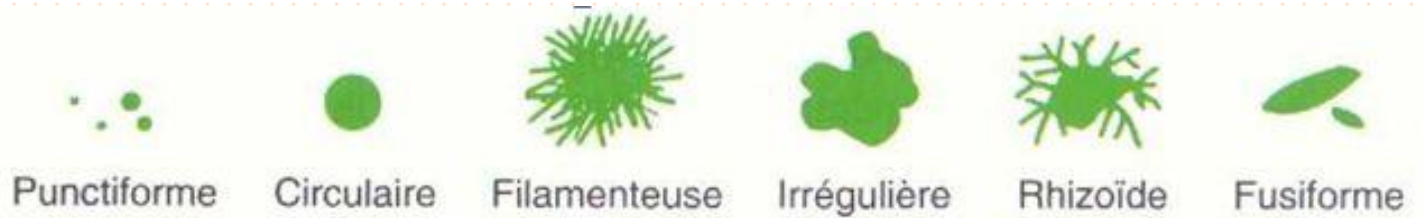
Les bactéries d'intérêt médical les plus fréquemment responsables d'infection arrivent à se développer sur des milieux de culture.

Ces milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification bactérienne ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture **pure**.



N.B. L'aspect des colonies est le caractère primaire utilisé pour orienter le diagnostic effectué par le bactériologiste

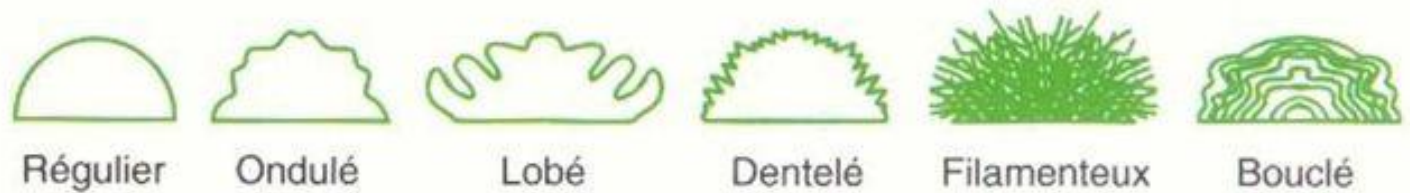
Forme



Élévation



Bord



Morphologies des colonies bactériennes

III.3. Différents type de milieux de culture bactérien

Base

- permet la croissance d'espèces non ou peu exigeantes.

Enrichissement

- enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines, etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes (*fastidieuse*).

Différentiel

- Contient des facteurs qui permettent la croissance des différentes espèces bactériennes sur le même milieu.

Sélectif

- Par addition d'antibiotiques, d'antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés.

Choix d'un milieu de culture

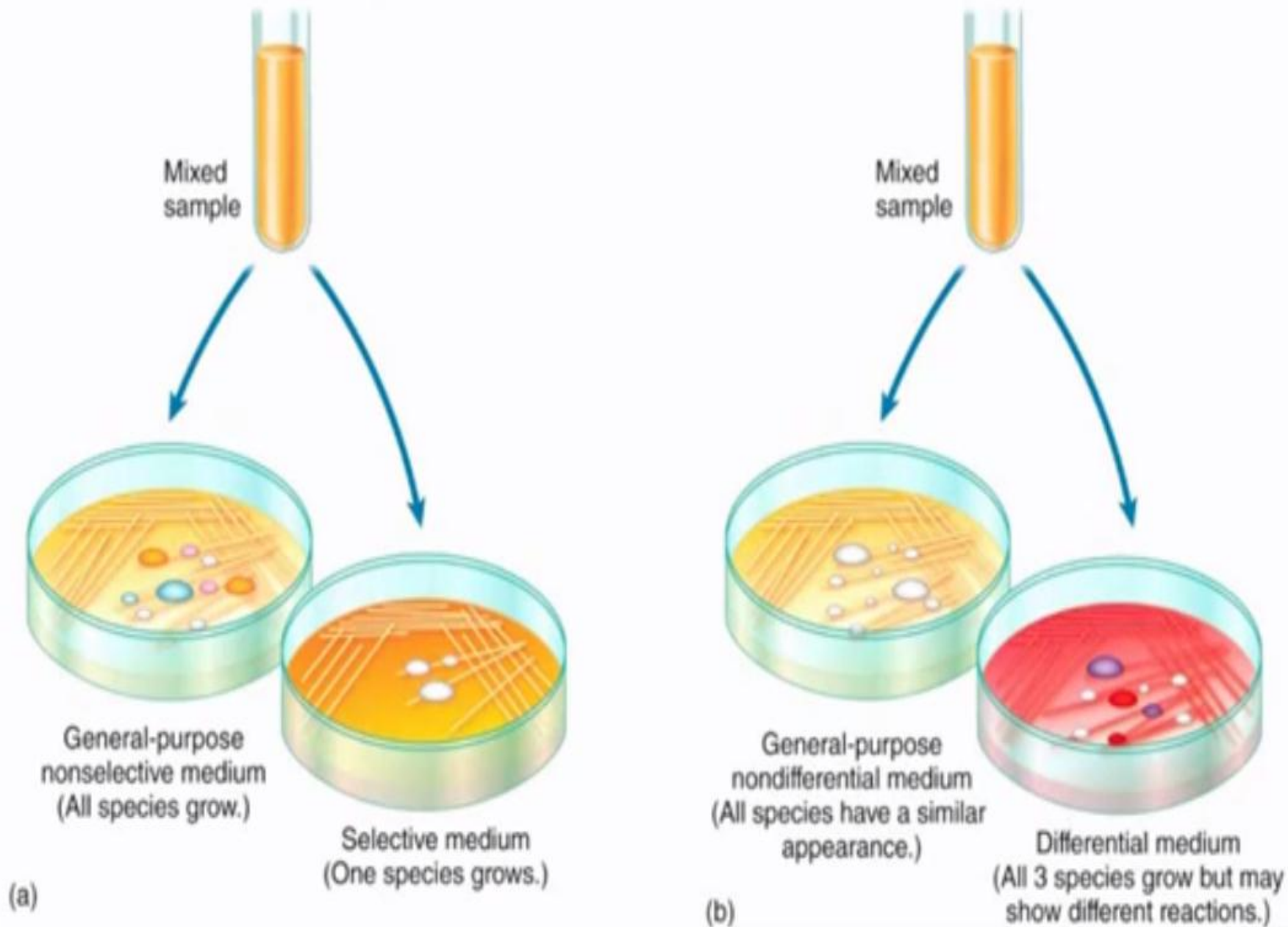


Milieux spécifiques de certaines espèces

Chapman : *S. aureus* ; Granada : *S. agalactiae* ; Cétrimide : *P. aeruginosa* ; milieux chromogènes ...

Comparison of Selective and Differential Media

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Gélose Mac Conkey



Sélectivité

- Sélectif des gram négatif (sels biliaires + cristal violet)

Indicateur coloré

- Rouge neutre (vire du rose pâle au rose foncé)

Substrats

- Sucre : lactose

Différentiel



Bactéries non exigeantes
gram -, lactose +

E. coli, Klebsiella, Enterobacter ...

Bactéries non exigeantes
gram -, lactose -

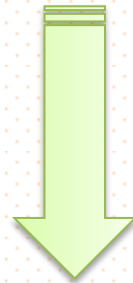
*Salmonella spp., Shigella spp.,
Proteus spp.*

IV. Techniques d'isolement et de purification des bactéries pathogènes

IV. Isolement et purification des bactéries

IV. 1. Définition

L'isolement est une technique qui permet de séparer les bactéries d'un échantillon. Il permet d'obtenir des colonies différentes, espacées les unes des autres.



Les milieux d'isolement sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries d'intérêt médical.

IV. Isolement et purification des bactéries

IV. 2. Principe

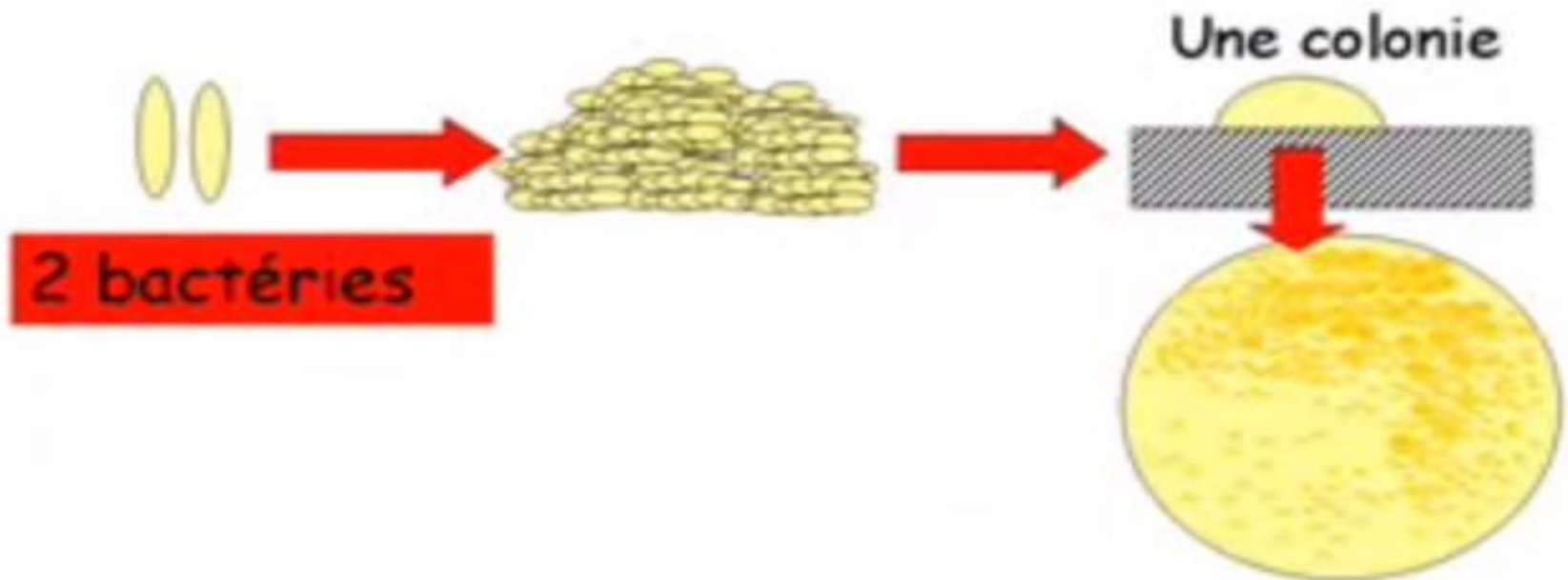
Une bactérie se multiplie en des millions d'exemplaires identiques qui forment une colonie visible à l'œil nu.



Cela permet l'isolement des bactéries en *culture pure* parce que la colonie est supposée provenir d'un *seul organisme*.

IV. Isolement et purification des bactéries

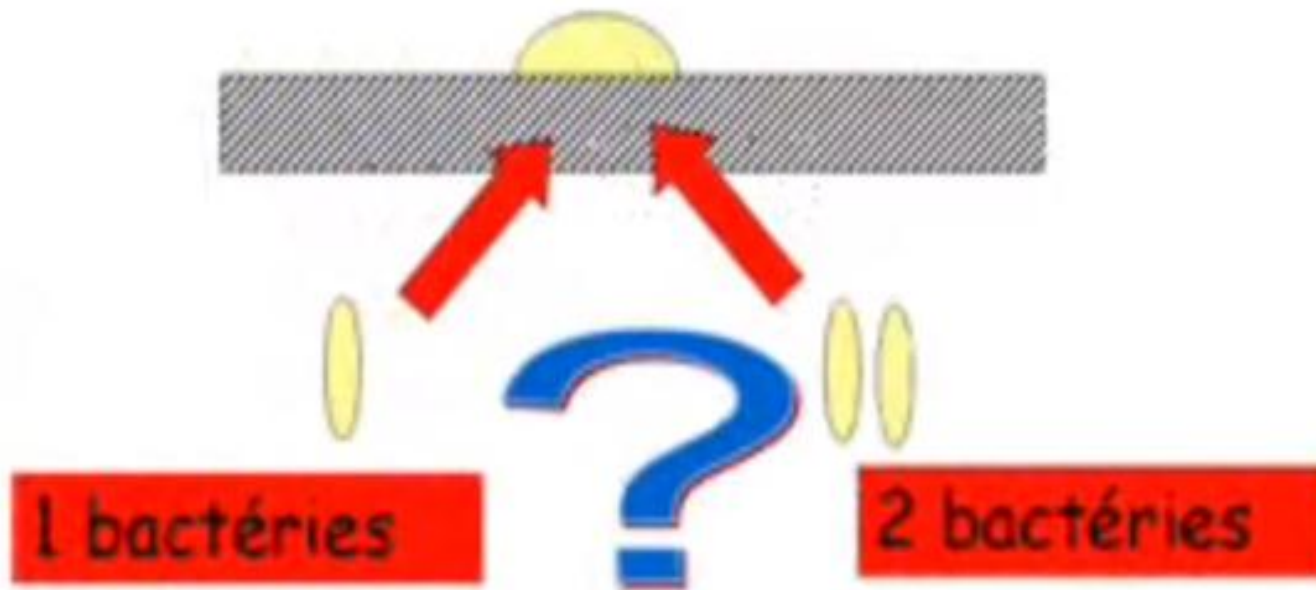
Attention: 2 bactéries l'une à côté de l'autre peuvent donner une seule colonie visible à l'œil nu.



IV. Isolement et purification des bactéries

Une colonie peut alors être dénommée **UFC** pour unité formant colonie.

Une colonie = UFC « unité formant colonie »



IV. Isolement et purification des bactéries

Si l'on sépare **physiquement** des bactéries en les déposant sur un milieu de culture gélosé (ensemencement) on a des chances de séparer suffisamment les bactéries pour qu'une *colonie* *correspond à une seule bactérie*.

IV. Isolement et purification des bactéries

Culture mixte

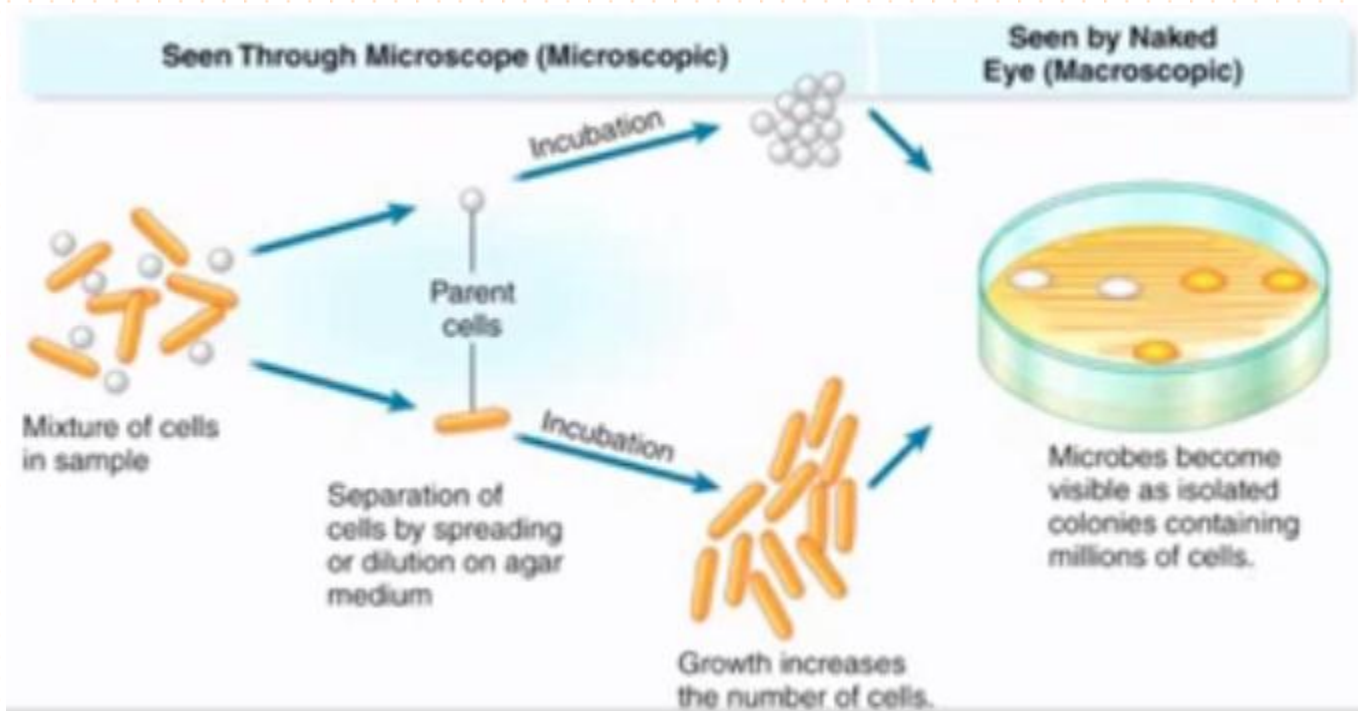


Culture pure

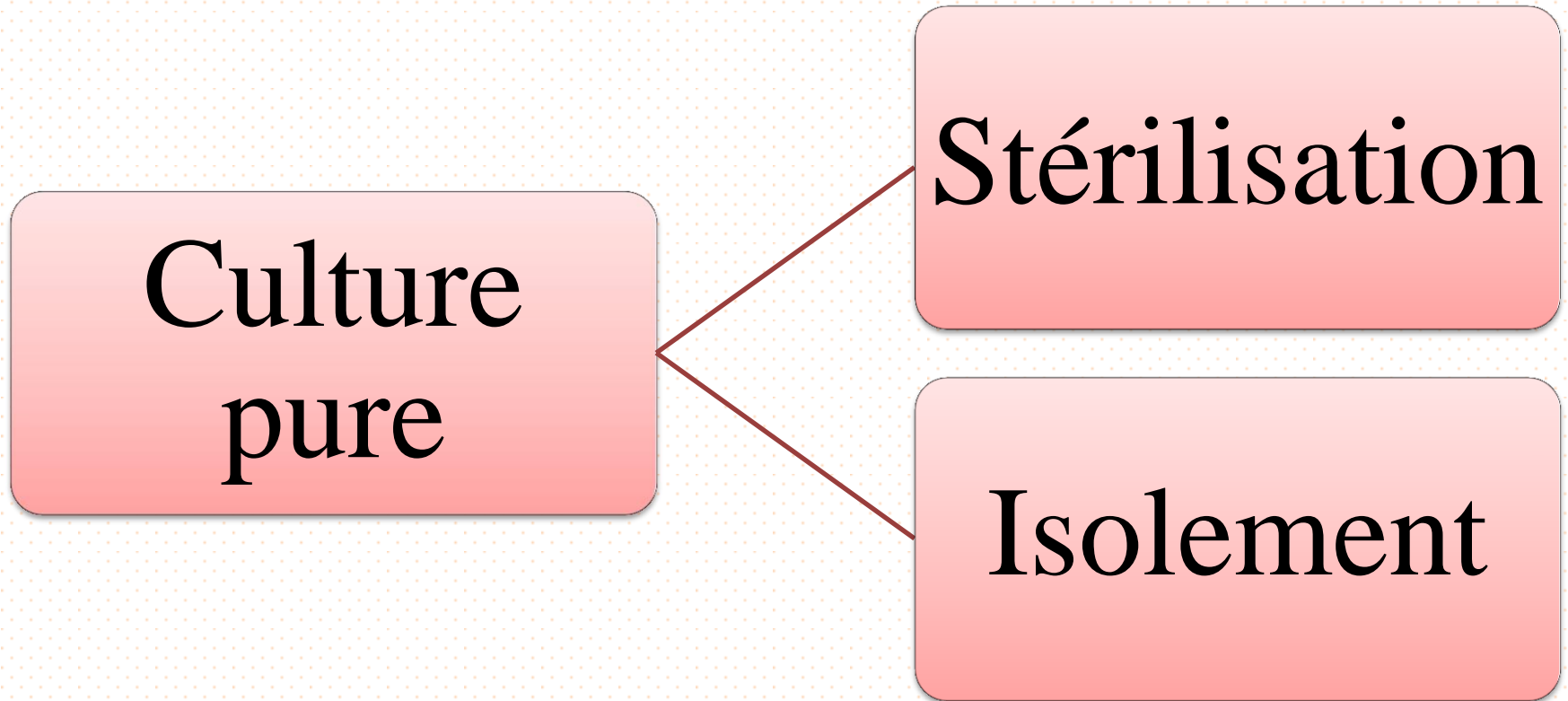
Contient Plusieurs
espèces bactériennes

Contient une seule
espèce bactérienne.

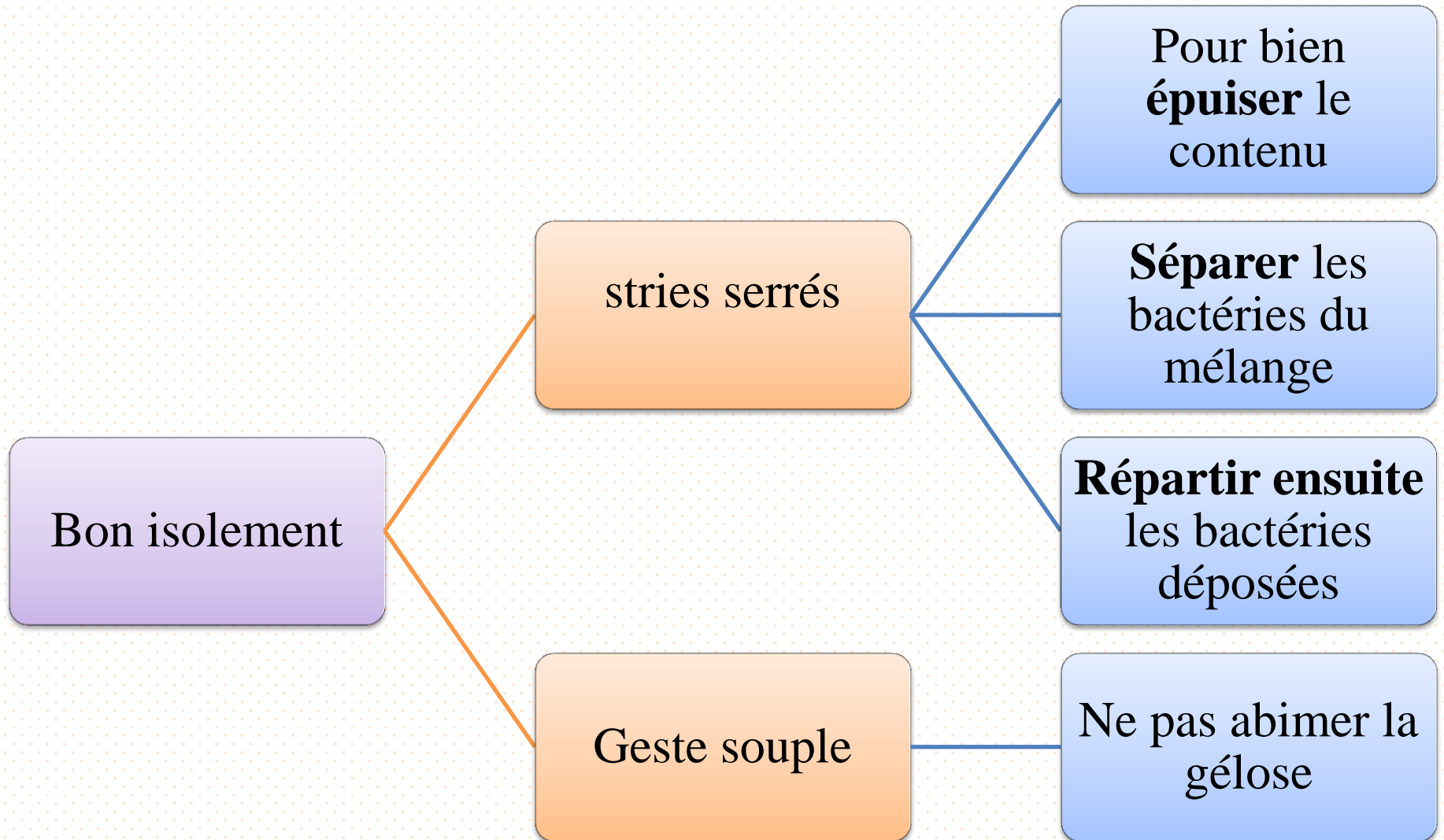
IV. Isolement et purification des bactéries



IV. Isolement et purification des bactéries



IV.3. Réussir un isolement



IV. 4. Méthodes d'isolement

❑ Technique d'isolement par épuisement

(méthode des cadrants)

❑ *technique d'incorporation dans la gélose*

❑ *Ensemencement par la technique du râteau*

IV. 5. Qu'est-ce qu'un bon isolement ?

- ❑ La présence d'un nombre suffisant de colonies isolées dans la dernière partie de l'isolement.
- ❑ La présence d'un gradient décroissant et régulier de colonies.