

Chapitre II : Méthodes de diagnostic des produits pathologiques.

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 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. 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.

1. Examen cytotabactériologique des urines (ECBU)

L'examen cytotabactériologique des urines (ECBU) est l'analyse microbiologique la plus fréquemment réalisée en laboratoire. L'analyse permet principalement de rechercher la présence d'une infection urinaire, de déterminer les germes responsables et d'adapter ainsi le traitement antibiotique. La réalisation de l'ECBU comprend les différentes étapes indiquées dans la figure 01.

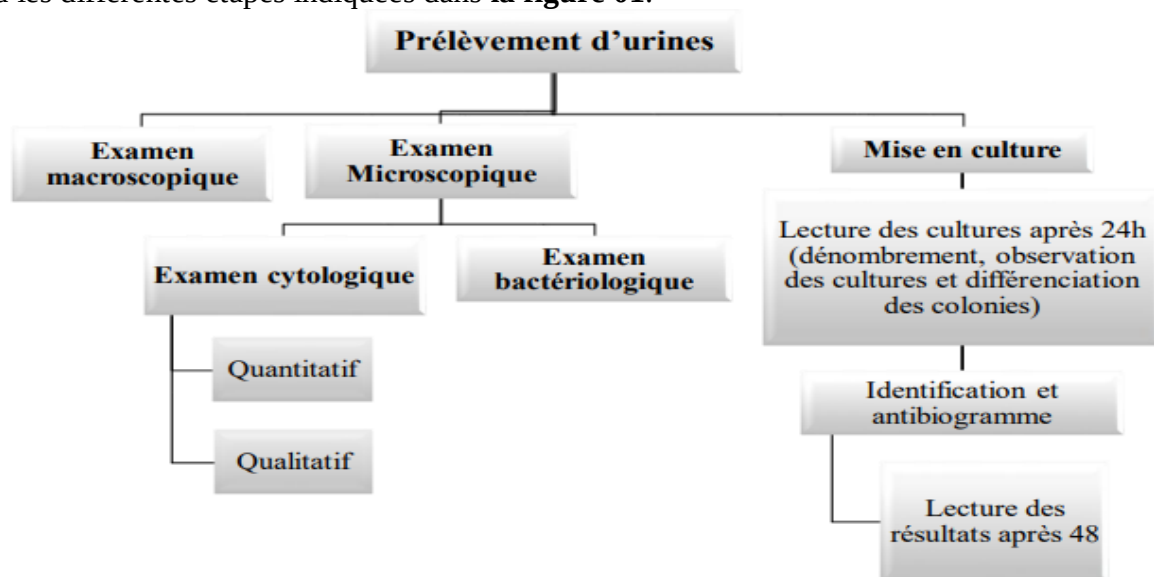


Figure 01 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'ECBU.

1.1. Examen macroscopique

Cet examen est effectué immédiatement dès la réception des urines. Il s'agit de visualiser l'apparence des urines à l'œil nu. Il permet de noter s'il y a une modification des caractères physiques de l'urine tels que la couleur, l'odeur, et l'aspect. L'urine normale est de couleur jaune citron et claire, tandis que l'urine infectée est souvent trouble, d'odeur nauséabonde et de couleur plus foncée. Parfois, on note même la présence de sédiments blanchâtres (phosphates), ou rouge brique (acide urique ou urate), hématique ou marron.

1.2. Examen microscopique

Il comprend un examen cytologique et un examen bactériologique

1.2.1. Examen cytologique (qualitatif et quantitatif)

➤ Analyse qualitatif (leucocytes, hématies, cylindres, cristaux).

Cette analyse permet d'observer et d'apprécier les cellules présentes dans l'échantillon d'urine, essentiellement les leucocytes, les germes et leurs éventuelles mobilités, les hématies, les cellules épithéliales, les cylindres granuleux et les cristaux. Cet examen est réalisé en déposant une goutte d'urine, à l'aide d'une micropipette entre lame et lamelle, puis la lame est examinée sous microscope optique à l'objectif x 40.

➤ Analyse quantitatif

Cette analyse consiste à quantifier les cellules présentes dans l'urine d'une façon précise, surtout les leucocytes et les hématies. Le dénombrement de ces éléments se fait dans un hématimètre de préférence en verre de Malassez (Cellule de Malassez) permettant la numération dans un volume 1 mm^3 (**Fig. 02**). Le résultat est exprimé en hématies et leucocytes par mm^3 , ou plus volontiers par millilitre (unité reconnue internationalement). A l'état physiologique, l'urine contient moins de 10 000 leucocytes et 5 000 hématies par ml (ou 10 leucocytes/ mm^3 et 5 Hématies/ mm^3). En cas d'infection urinaire, le processus inflammatoire se traduit le plus souvent par la présence de :

- > 50.000 leucocytes /ml.
- > 10.000 hématies /ml.

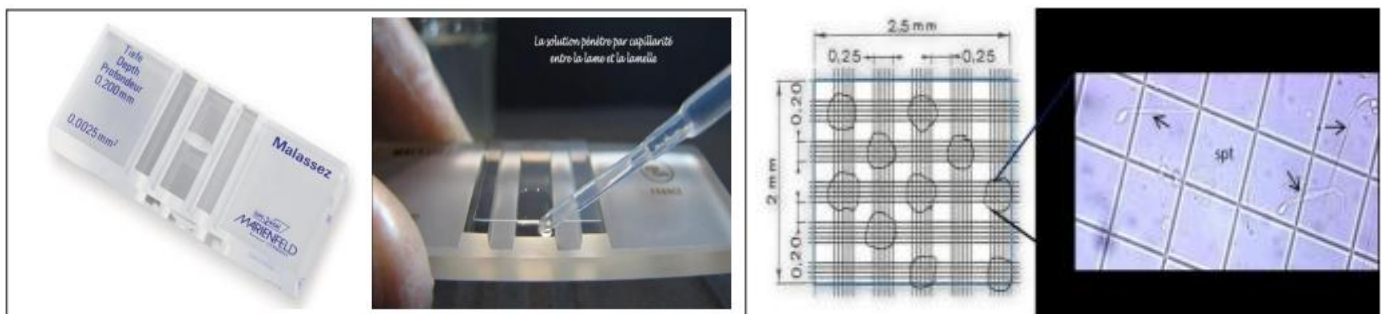


Figure 02: Méthode de comptage sur cellule de Malassez.

1.2.2. Examen bactériologique

Cet examen peut être effectué sans coloration par observation directe à l'état frais, ou bien après la coloration de Gram.

➤ L'état frais

Il permet de détecter la présence des bactéries et de déterminer leur forme, et surtout leur mobilité par l'observation directe d'une gouttelette d'urine entre une lame et lamelle sous microscope à l'objectif x 40.

➤ La coloration de Gram

Cet examen reste indispensable en apportant des informations immédiates au clinicien sur le type de bactéries impliquées permettant d'adapter le traitement. Cette coloration permet d'étudier la morphologie des germes et le Gram différentiel.

Avant la coloration, il faut préparer un frottis : à l'aide de l'anse de platine ou de pipette Pasteur, on prélève une goutte d'urine puis on la pose sur une lame préalablement marquée. Ensuite, on étale, on fait sécher puis on fixe par trois ou quatre passages brefs dans la flamme d'un bec benzène.

Ensuite, une coloration primaire se fait par le violet de gentiane pendant 30 secondes à 1 minute. Cette étape est suivie par un rinçage à l'eau du robinet. La deuxième étape s'agit d'un mordantage au lugol pendant 60 secondes suivie d'un autre rinçage à l'eau distillée. La troisième étape est une décoloration à l'alcool (+ acétone) pendant 5 à 10 secondes. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. La décoloration est suivie également d'un rinçage d'eau distillée. La dernière étape de la coloration Gram est une contre-coloration à la fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute. Cette dernière étape est suivie par un lavage à l'eau distillée et ensuite d'un séchage de la lame dans la flamme du bec benzène (**Fig. 03**). L'observation microscopique se fait avec une goutte d'huile à immersion en microscope à l'objectif x 100.

Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet, les bactéries à Gram négatif en rose. Cependant, elles peuvent avoir l'une de ces formes : Cocci isolé, Cocci en diplocoque, Cocci en tétrade, Cocci en chaînette, Cocci en grappe de raisin, Bacilles, coccobacilles...

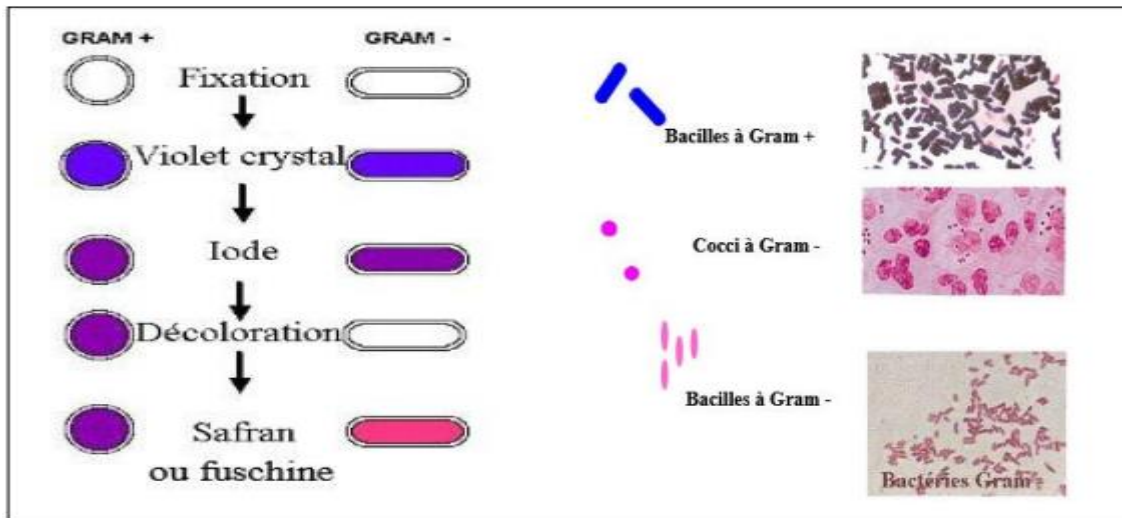


Figure 03: Étapes de la coloration de gram.

1.3. Mise en culture

La mise en culture est une étape très importante, elle sert à l'isolement et la numération des bactéries afin de permettre leur identification. L'importance de cette étape réside dans le choix d'un milieu de culture adapté à la pousse des germes les plus fréquemment impliqués dans les infections urinaires, et aussi la connaissance des exigences culturales des germes en cause.

L'isolement est effectué sur différents milieux. La majorité des bactéries responsables d'infection urinaire ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur gélose nutritive (GN). D'autres milieux peuvent être utilisés tels que des milieux sélectifs comme le milieu de Chapman, surtout utilisé pour l'isolement des Germes G^+ : les *Staphylococcus*, les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus* et de rares bactéries à Gram négatif. Aussi, la gélose Hektoen (Verte) pour l'isolement et à la culture des Salmonelles et shigelles. Et la gélose au sang frais ou au sang cuit qui est un milieu enrichi pour l'isolement des streptocoques et toutes les bactéries exigeantes et non exigeantes.

L'ensemencement sur les milieux de culture se fait par la méthode de l'anse calibrée. Cette méthode consiste à déposer un volume de 10 μ l d'échantillon d'urine parfaitement homogénéisée sur un rayon de la boîte à l'aide d'une anse calibrée stérile, puis étaler le dépôt en stries perpendiculaires au rayon sur toute la surface de la gélose (**Fig. 04**). Ensuite, les boîtes sont incubées dans une étuve à 37° pendant 24h.

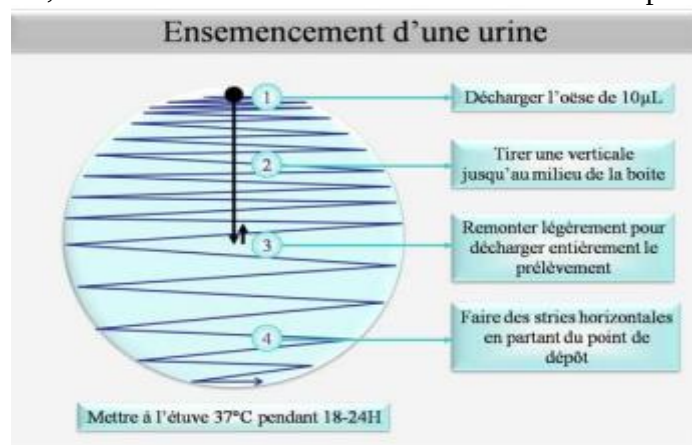


Figure 04 : Ensemencement des urines par méthode de l'anse calibrée.

1.4. Numération bactérienne

Après le temps d'incubation, chaque bactérie viable donne naissance à une colonie visible à l'œil nu. Le nombre de bactéries/ ml d'urine ou bactériurie est alors calculé à partir du nombre de colonies obtenus et le volume d'urine ensemencé : Unité Formant Colonie (UFC) par ml d'urine analysée. La numération des colonies repose sur une comparaison de la densité des colonies présentes sur la partie supérieure de la gélose à celle du schéma fourni avec l'abaque de dénombrement (**Fig. 05**).

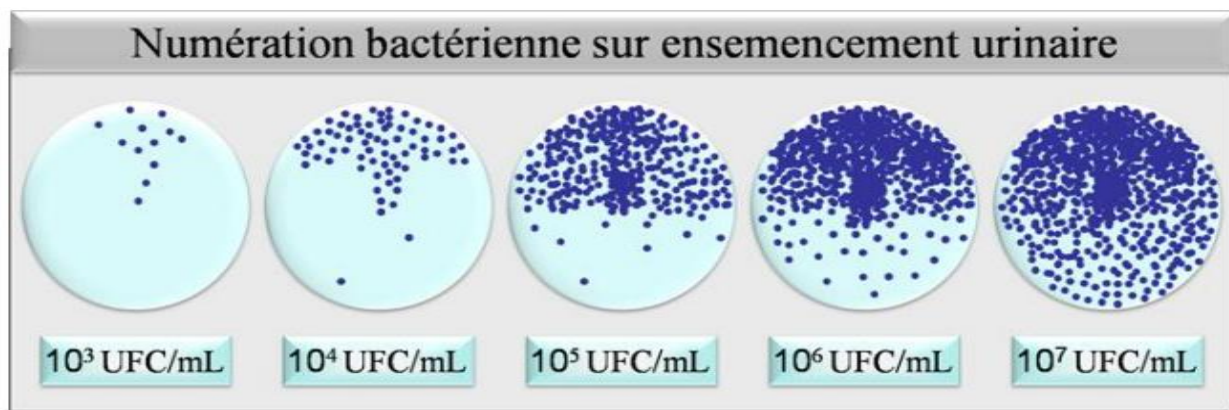


Figure 05: Abaque de dénombrement.

1.5. Interprétation des résultats

En fonction des résultats de l'examen cytologique, du compte de germes et du nombre de colonies différentes obtenues après culture, plusieurs situations sont possibles :

- **Absence de colonies sur les milieux de culture + présence de germes à l'examen cytologique** : Ré-incuber pendant 24h à 35°C (possibilité de germes à croissance tardive ou infection décapitée par une antibiothérapie récente). Si absence de colonies à 48 h, la culture est dite négative.
- **Absence de colonies + présence d'assez nombreux, très nombreux leucocytes** : L'éventualité d'une antibiothérapie préalable, refaire l'ECBU 3-5 jours après l'arrêt de traitement, recherche du germe exigent comme les mycobactéries.
- **Une sorte de colonies (un seul type de germe), $N < 10^3$ UFC/ml** : Absence de culture bactérienne significative, peut être une infection débutante, ou contamination possible.
- **Une sorte de colonie, $N \geq 10^3$ UFC/ml** : Culture bactérienne positive. Procéder à l'identification de germe et réaliser l'antibiogramme.
- **Deux sortes de colonies, $N \geq 10^5$ UFC/ml** : Poursuivre le protocole avec 2 cas à envisager : Si l'une des colonies est majoritaire, l'autre germe constitue une contamination du prélèvement. Donc, il faut identifier et réaliser l'antibiogramme du germe responsable des colonies majoritaires. S'il y a une équivalence, on identifie les 2 sortes et on réalise l'antibiogramme de chaque germe.
- **Plus de deux sortes de colonies** : Flore bactérienne polymorphe et donc la culture est contaminée, refaire le prélèvement.

Ce tableau représente les principales espèces responsables d'infections urinaires.

Tableau 01: Espèces responsables d'infections urinaires (proportion en %).

Espèces bactériennes	Infections communautaires Réseau AFORCOPI-BIO Rapport Onerba 2002 (n = 417)	Infections nosocomiales Groupe d'étude ESCMID Europe 2000 (n = 421)	Infections S.A.U. d'un hôpital pédiatrique 2005 (n = 221)
Gram négatif			
<i>Escherichia coli</i>	68	38	79
<i>Proteus mirabilis</i>	8	7	9
<i>Klebsiella spp.</i>	5	9	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	6	0,5
Autres entérobactéries	3	7	1
<i>Acinetobacter spp.</i>		2	
Gram positif			
<i>Enterococcus spp.</i>	5	17	3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3		0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	2	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3		1
Autres	1	2	1
Levures		10	

2. Examen bactériologique des selles (Coproculture)

La coproculture est recommandée en cas de diarrhée persistante, d'intoxication alimentaire, de suspicion de maladie intestinale... La coproculture est envisagée en cas de diarrhée aiguë en cas de :

- Trois selles molles ou liquides par jour depuis plus d'une journée et moins de 15 jours ;
- Fièvre supérieure à 40°C ;
- Présence de glaire ou de sang dans les selles ;
- Douleurs abdominales ;
- Retour d'un pays où les diarrhées bactériennes sont fréquentes ;
- Diarrhées chez des patients hospitalisés (diarrhée nosocomiale due à *Clostridium difficile*) ;
- Toxi-infection alimentaire collective (TIAC)

De nombreuses bactéries sont incriminées dans l'étiologie des diarrhées infectieuses aiguës. Certaines d'entre elles ont un pouvoir entéropathogène bien établi (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, *Campylobacter spp.*...etc). D'autres bactéries sont devenues pathogènes après acquisition de facteurs de virulence. C'est le cas en particulier d'*Escherichia coli*, est à la fois une bactérie commensale (espèce représentant 80% de la flore intestinale aérobie de l'homme), et une bactérie entéropathogène par l'expression de facteurs de virulence acquis et/ou constitutifs.

En pratique de routine :

- Chez l'adulte on recherche : *Salmonella*, *Shigella* et *Vibrion cholérique* à la demande.
- Chez l'enfant < à 2 ans on recherche : *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella* et *Vibrio cholerae* à la demande.

2.1.Examen direct

Il comporte deux étapes : un examen macroscopique et un examen microscopique.

➤ Examen macroscopique

Un examen macroscopique consiste à noter la consistance des selles (moulée, selle molle ou en bouse, selle liquide, selle semi liquide, selle dure), et leur couleur : brune, jaune ou ocre, verte, décolorée, rouge ou noir. Ainsi la présence de glaires, de pus ou de sang. La selle peut être :

- **Normale**: moulée, molle ou liquide.
- Elle peut être diarrhéique ou afécale avec glaires sanglantes (dysentériques) ou, incolore en eau de riz (cholérique).

➤ Examen microscopique

-**Observation des selles à l'état frais** : pour les selles liquides, on travaillera directement sur la selle. Pour les selles moulées, Elle se fait par étalement de la matière fécale avec une goutte d'eau physiologique sur une lame propre puis recouvrir d'une lamelle, on fait l'observation au microscope optique (x40), et on note la présence des leucocytes, des hématies, et des bactéries très mobiles. Il permet d'apprécier un déséquilibre de la flore. A l'état normal, on trouve environ 4/5 de bacilles et 1/5 de cocci et de rares levures. Un processus invasif est caractérisé par la présence d'hématies et de leucocytes.

- **Observation des selles après coloration au bleu de méthylène** : Cet examen permet d'apprécier la flore, de voir les leucocytes (recherche des polynucléaires) et les levures.

-**Observation des selles après coloration de Gram**: Cet examen est très important, permet d'évaluer le pourcentage de bactéries Gram⁺ et Gram⁻ (voir si la flore est équilibrée entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif : environ 60 % de bactéries Gram⁻, et 40 % de bactéries Gram⁺, dans une selle normale) (**Fig.04**), de rechercher les aspects caractéristiques (Entérobactérie, *Vibrio*). Il permet aussi de rechercher les leucocytes qui en quantité supérieure à 5 par champ, sont le signe d'une diarrhée à germe invasif, de même que la présence d'hématies.

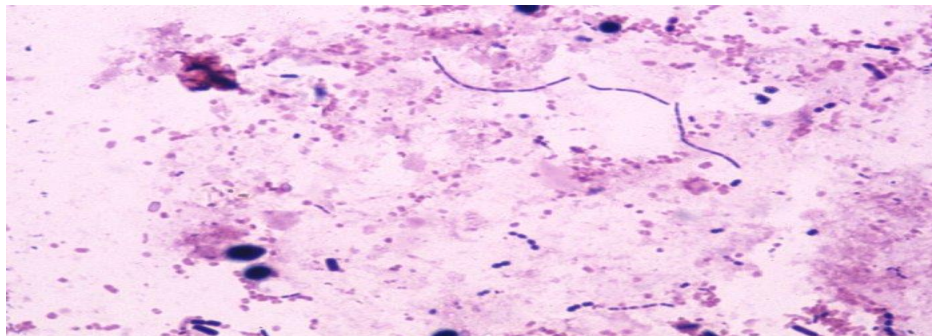


Figure 04 : Flore équilibrée : majorité de bactéries à Gram négatif.

2.2. Milieux utilisés et ensemencement

La recherche de certains germes responsables d'infections digestives peut être grandement facilitée par l'ensemencement dans des milieux sélectifs d'isolement et d'enrichissement, pour isoler, puis identifier l'agent infectieux. La culture s'effectue par l'ensemencement des milieux spécifiques suivants (**Fig.05**):

- Milieu Hektoen pour les bactéries entéro-pathogènes, particulièrement de *Salmonella* et de *Shigella*.
- Milieu Salmonelle-Shigelle (milieu SS).

Pour la recherche de *Salmonella*, on ensemence un milieu d'enrichissement au sélénite, milieu de Leifson, ou au tétrathionate, milieu de Muller-Kauffman, avec 0,5ml de selle. Il est important de les repiquer après 3 à 6 heures maximums d'incubation à 37°C. Il n'existe pas de milieu d'enrichissement pour *Shigella*.

➤ L'ensemencement et l'incubation

- Une dilution de la selle au 1/10 dans de l'eau distillée.
- L'ensemencement d'une goutte de la dilution en bouillon Mueller Kauffman (pour l'enrichissement en Salmonelle), et une goutte de la dilution en quadrant sur un milieu Hektoen, milieu SS.
- L'incubation de ces milieux se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures.

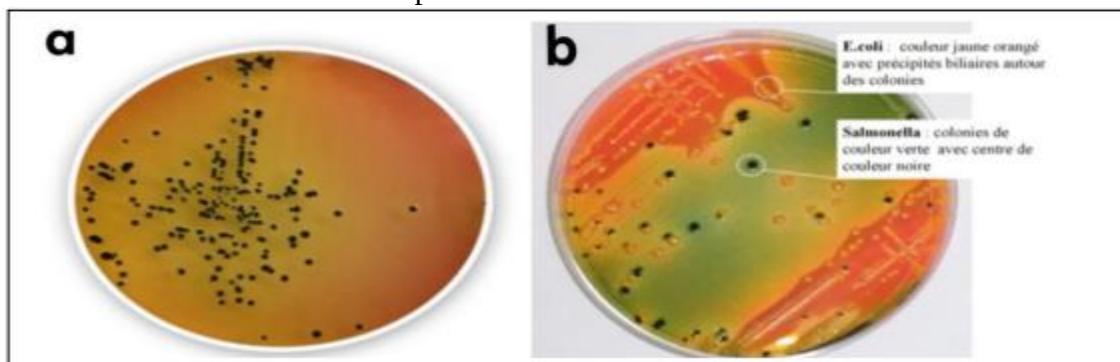


Figure 05 : a) milieu Salmonelle-Shigelle b) les germes *E. coli*, *Salmonella* sur milieu Hektoen.

2.3. Interprétation des résultats

➤ Résultat normaux d'une coproculture

Les résultats sont interprétés comme normaux lorsque la flore saprophyte ne présente pas de danger pour l'organisme. Une flore normale renferme plus de 400 espèces de bactéries différentes, on la considère normale quand elle est constituée de germes non pathogènes et en absence de globules blancs (leucocytes) ou de globules rouges (hématies).

➤ Résultat anormaux d'une coproculture

Les infections digestives et diarrhées aiguës sont dues principalement à la *Salmonella spp.* et des autres germes qui sont à une concentration très faible dans les selles : *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, certains colibacilles : *Yersinia Enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* et *Clostridium*, et certains souches d'*Escherichia coli*. avec la présence des leucocytes et hématies.

3. Examen bactériologique du sang (Hémoculture)

Le sang est normalement stérile. Lorsque des agents infectieux passent dans le sang, de façon répétée, ils peuvent provoquer une infection grave. On parle de bactériémie, voire septicémie en cas de passages importants et répétés dans le sang des agents pathogènes.

L'hémoculture est un examen médical utilisé pour détecter la présence de bactéries ou de micro-organismes pathogènes dans le sang. C'est un outil diagnostique essentiel pour identifier les infections bactériennes systémiques, souvent appelées bactériémies ou septicémies. Les étapes d'hémoculture sont les suivantes :

3.1. Prélèvement et milieux d'hémoculture

Le milieu pour hémoculture est classiquement un bouillon conditionné en flacon sous pression réduite, et que l'on inocule avec le sang du patient à travers un opercule en caoutchouc. On trouve dans le commerce divers modèles de flacons d'hémoculture, les uns pour incubation conventionnelle, les autres spécifiques pour incubateurs automatisés. En incubation classique, diverses options sont proposées :

- La présentation Biphase (phase solide - phase liquide) retrouvée dans le modèle CASTANEDA (BIORAD) ou HEMOLINE (BIOMERIEUX) (Voir figure D).
- La présentation monophasique proposée par les mêmes fournisseurs et destinée à la détection des bactéries anaérobies strictes : il s'agit d'un bouillon de culture SCHAEDELER conditionné sous vide.
- L'hémoculture SIGNAL (OXOID) ; équiper d'un indicateur de croissance (Voir figure C).
- Le bouillon pour hémoculture de l'Institut Pasteur d'Algérie.



Fig. 11.1. – Flacons d'hémocultures retrouvés sur le marché.
A) Gamme de flacons pour les Bactecs® (Becton Dickinson) ;
B) Gamme de flacons pour le BacT/ALERT® (bioMérieux) ;
C) Flacon manuel Signal® (Oxoid) équipé de son indicateur de croissance ;
D) Flacon manuel Hemoline® (bioMérieux) ;
E) Système Isolator® (Oxoid)

Classiquement, tout bouillon pour hémoculture est un bouillon nutritif enrichi de facteurs de croissance : Peptones de Caséine et de Gélatine, Extraits de levure, NAD et Hémine, Vitamines B6, K3, Cystéine. L'atmosphère à l'intérieur du flacon est faite de CO₂. L'anticoagulant est le SPS (Sodium polyanéthole sulfonate).

➤ Nombre de flacons et volume de sang à prélever

Les prélèvements doivent être répétés afin de majorer les chances d'isolement de l'agent causal. Classiquement, on admet 2 à 3 hémocultures, c'est à dire 4 à 6 flacons (2 à 3 paires aérobies et anaérobies sur une période de 24 h). Pour le volume de sang à prélever, il doit être de 10 ml par flacon chez l'adulte, de 2 à 5 ml chez l'enfant et de 1 ml chez le nouveau-né et le nourrisson.

➤ L'acheminement au laboratoire

Les flacons d'hémoculture sont rapidement acheminés au laboratoire d'analyse, de préférence enveloppés dans du coton afin de les maintenir à une température proche de celle de l'organisme. Une fiche de renseignements cliniques doit impérativement accompagner les flacons vers le laboratoire.

3.2. Incubation et suivi des flacons d'hémoculture

Une incubation à 37°C pendant 7 jours est recommandée pour les systèmes manuels. Les flacons sont examinés chaque jour à partir de la 6^{ème} heure d'incubation, à la recherche d'un signe de culture. La surveillance des flacons est visuelle, basée sur la recherche d'un trouble, d'un voile en surface, d'une hémolyse, d'un coagulum, de dépôts blanchâtres floconneux au fond du flacon ou de particules adhérentes sur sa paroi interne. En cas de flacon biphasique (CASTANEDA), l'apparition de colonies sur la paroi gélosée pose le diagnostic d'hémoculture positive (Tab. 01).

Tableau 01 : Différents aspects du bouillon d'hémoculture en cas de positivité.

Aspect macroscopique	Bactérie en cause
Turbidité	<i>Bacilles à Gram – aérobies</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Bacteroides sp.</i>
Hémolyse	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>
Production de gaz	<i>Bactéries aero-anaérobies ou anaérobies strictes</i>
Coagulum	<i>Staphylococcus aureus</i>
Colonies au fond du flacon	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Nocardia sp.</i>

3.3. Traitement des flacons positifs

Devant toute suspicion de positivité, un examen microscopique et une mise en culture sont réalisés sur les flacons. Les flacons d'hémoculture ne sont jamais ouverts ; l'isolement et l'identification des agents infectieux sont réalisés à partir d'un échantillon prélevé par ponction à la seringue, de chaque flacon. Toutes les manipulations se font sous hotte bactériologique à flux laminaire. Le port d'un masque et de gants est indispensable vu le risque de transmission au manipulateur, de certains germes dangereux (exemple *Brucella*).

➤ Examen microscopique

Sous un poste de sécurité microbiologique, le bouillon est prélevé de façon aseptique après avoir désinfecté l'opercule du flacon, et à l'aide d'une seringue. L'examen du bouillon est effectué en deux étapes :

- L'état frais afin d'observer la morphologie et la mobilité des bactéries.
- la coloration de Gram pour déterminer plus précisément la morphologie des bactéries (cocci ou bacille) et leur affinité tinctoriale (G⁺ ou G⁻). Tout résultat positif de l'examen direct doit être communiqué rapidement

au clinicien, notamment si plusieurs flacons sont positifs, s'il ya de *Clostridium* ou *Neisseria* ou si les patients sont à risque (immunodéprimés).

➤ Ensemencement (repiquage)

Les repiquages de flacons suspects sont effectués en fonctions de l'examen direct. Les cultures étant généralement monomicrobiennes, des milieux gélosés non sélectifs seront utilisés, gélose colombia avec 5% du sang frais incubées en aérobiose pendant 48h et en anaérobiose pendant 5 jours, gélose au sang cuit enrichis (polyvitex) placés sous CO₂ pendant 48h lorsqu'un *Haemophilus spp.* ou *Neisseria spp.* sont évoqués.

Si à l'examen direct un mélange de bactéries est suspecté, des milieux sélectifs pourront être utilisés, la gélose ANC (Acide nalidixique- colistine) pour isolé sélectivement les bactéries à Gram⁺ et la gélose CLED (Cystine Lactose Electrolyte Déficient = milieu enrichi en cystine et lactose et pauvre en ions) pour les bacilles Gram⁻. Le choix de l'atmosphère (aérobiose, CO₂ ou anaérobiose) pour l'incubation de ces milieux à 37°C dépend du diagnostic présomptif (**Tab. 02**).

Les flacons sont conservés à température ambiante pour un éventuel nouveau repiquage ultérieur si les cultures sont restées négatives.

Tableau 02 : Milieux utilisés pour les repiquages d'hémocultures.

Agents recherchés	Repiquage sur milieux de culture suivants	T° et durée d'incubation
<i>Brucella sp</i>	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit (autres : TSA+5%sérum de bœuf ou Brucella Agar)	37°C 48h -72h S Sous 5% CO ₂
<i>Campylobacter sp</i>	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit (autres : milieu de Skirrow ou Butzler ou Karmali)	37°C 3- 4jrs 5% CO ₂ Microaérophilie
<i>Legionella sp</i>	BCYE	37°C 15jrs 5%CO ₂
HACCEK	Columbia au sang cuit Columbia au sang cuit +PVX	37°C 4jrs S/CO ₂
<i>Abiotrophia sp</i> <i>Granulicatella sp</i>	Columbia + sang frais+strie de Staph (Satellitisme) Autres : Columbia +sang frais+ 0,001% Pyridoxal Enrichissement sur TODD HEWITT + PVX	37°C 3jrs S/CO ₂
<i>Bartonella quintana</i> Ou <i>Bartonella henselae</i>	Prélèvement de sang sur tube hépariné Utilisation du système de centrifugation-lyse Culot de centrifugation mis en culture sur Columbia +sang frais de mouton ou de lapin Mise en culture sur lignée cellulaire (cellules endothéliales)	37°C 6 semaines 5% CO ₂ 37°C 10 jrs /CO ₂
Leptospires	Prélèvement de sang sur tube hépariné Milieu au Tween + Albumine en tubes	30°C à l'obscurité 2 mois
Mycobactéries	Hémoculture en Bact/alert- flacon d'hémoc. spécifique pour Mycobactéries	
Levures	Sabouraud	30°C 1 mois
Mycoplasmes Ureaplasma	Culture en bouillon PPLO (Pleuropneumoniae like organisms) ou en gélose A3	37°C Microaérophilie 3 jours

➤ Identification et antibiogramme

Sur des hémocultures monomicrobienne, suivant le type bactérien observé à la coloration de Gram, une identification sera parallèlement lancée. Il est possible à partir d'un culot lavé, de réaliser directement un antibiogramme.

Dans le cas d'un mélange de bactéries suspecté à l'examen direct, les colonies des repiquages seront pratiqués avec quelques test biochimiques, permettant d'orienter vers une identification complète (galerie, biotypage/serogroupage...etc), et d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

3.4. Interprétation des résultats

➤ Résultats normaux (négatifs)

- Les différentes hémocultures sont stériles, aucun germe n'est retrouvé.
- Une hémoculture négative ne veut pas forcément dire qu'il n'existe pas d'infection, mais cela indique qu'à l'instant précis où le prélèvement a été pratiqué il n'y avait pas de germes dans le sang.
- Ou alors que le germe responsable de l'infection a des exigences de cultures très particulières et qu'il ne pousse pas dans les milieux de cultures usuels. Le résultat est alors faussement négatif.

➤ Résultats anormaux (positifs)

L'interprétation des résultats des hémocultures positives est simple quand il y'a un isolement d'une bactérie pathogène spécifique (BPS) : *Salmonella typhi*, *Brucella*, *Neisseria meningitidis*, par exemple. L'isolement de telles bactéries impose le diagnostic.

4. Examen cytot bactériologique des sécrétions broncho pulmonaires

L'examen cytot bactériologique des sécrétions broncho-pulmonaires est un examen médical qui a comme objectifs: Recherche de bactéries responsables d'infections broncho pulmonaires (Pneumopathies); Détermination de traitement adapté ; et surveillance d'efficacité de traitement en cours.

Cet examen a une sensibilité et spécificité variables. Notamment à cause d'une contamination fréquente du prélèvement par la salive et la flore oropharyngée.

Le choix du prélèvement est fonction de l'importance clinique, du terrain du patients (immunodépression) et du résultat attendu (atypiques, mycobactéries). La stratégie diagnostique d'une infection broncho-pulmonaire va dépendre de sa gravité clinique. Pour des cas simples, chez des patients ayant un état général conservé, l'analyse bactériologique des expectorations convenablement recueillies et lavées peut fournir des résultats acceptables.

4.1. Examen macroscopique

Cet examen macroscopique concerne seulement les expectorations (crachat) et les aspirations bronchiques. On décrira si l'aspect est :

- Muqueux : donnant un aspect en gelée avec de rares parcelles purulentes ;
- Mucopurulent : muqueux avec des parcelles de pus plus nombreuses ;
- Salivaire ;
- Fluide et purulent ;
- Visqueux et adhérent.

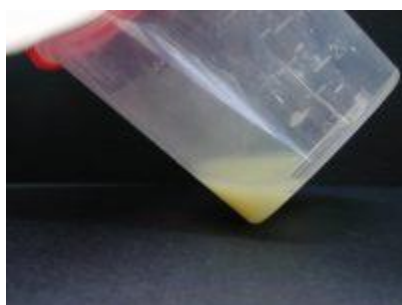
Préciser aussi la couleur éventuellement : rouille, verdâtre, hémoptoïque (sang). De même, la perception d'une odeur fétide témoigne de la présence des bactéries anaérobies.



muqueux



salivaire



fluide et purulent



visqueux et adhérent

Figure 07 : Différents aspects macroscopiques de crachat.

4.2. L'examen microscopique : L'examen microscopique présente deux objectifs :

- évaluer la qualité du prélèvement en s'assurant d'une part qu'il n'a pas été trop contaminé lors du passage par les voies aérienne supérieures et d'autre part qu'il provient bien d'un foyer infectieux (présence de granulocytes neutrophiles).
- observer la flore bactérienne de l'expectoration afin d'orienter rapidement le diagnostic et choisir les méthodes pour le confirmer.

Tout d'abord, c'est dans les parcelles purulentes que la probabilité de trouver l'agent infectieux est la plus grande. Il s'agit donc de prélever une parcelle purulente, de l'écraser entre 2 lames et de l'étaler sur 3 lames

pour une coloration au bleu de méthylène ou MGG, coloration de Gram, coloration de Ziehl-Neelsen ou à l'auramine.

- **Coloration au bleu de méthylène ou MGG:** Apprécier les cellules présentes : Cellules épithéliales, polynucléaires, lymphocytes, autre cellules, et confirmer la qualité du prélèvement ou le rejeter (critères de Bertlett) (**Tab. 03**).

Tableau 03 : Confirmation de la qualité du prélèvement.

Nombre de cellules par champ : objectif x100			Interprétation selon les critères de Bertlett*
Cellules épithéliales		Leucocytes	
1	>25	<25	Contamination salivaire – prélèvement à rejeter
2	>25	>25	Réaction inflammatoire – contamination salivaire
3	10-25	>25	Prélèvement acceptable
4	<10	>25	Prélèvement adapté

- **Coloration de Gram :** Apprécier la flore bactérienne.
- **Coloration de Ziehl-Neelsen**

La coloration de Ziehl-Neelsen est une méthode de coloration permettant l'identification des mycobactéries au microscope. Elle fait partie des colorations qui mettent en évidence l'acido-alcool-résistance, caractère fondamental des mycobactéries, en prenant en compte la difficulté de pénétration des colorants. Les étapes sont les suivantes :

➤ Préparation de frotti

- Etaler l'expectoration régulièrement sur la zone centrale de la lame grâce à un mouvement continu de rotation ; on recommande un étalement d'environ 20 mm sur 10mm.
- Placer les lames sur le séchoir avec la surface d'étalement vers le haut et laisser sécher à l'air durant environ 30 minutes.
- Procéder à la fixation des lames séchées en les tenant avec une pince et en les passant sur la flamme 5 fois pendant environ 4 secondes, la face d'étalement tournée vers le haut.



➤ Coloration

- ① Placer les lames fixées sur le support de coloration selon leur numéro d'ordre, la face d'étalement vers le haut. Les lames devraient être séparées par un intervalle d'1 cm et ne jamais se toucher l'une l'autre.
- ② Recouvrir les lames l'une après l'autre au moyen de la solution de travail de fuchsine phéniquée de Ziehl à 0,3 % filtrée.
- ③ En plaçant une bande de papier absorbant comme un papier filtre ou même du papier journal, on retiendra la solution de coloration et on évitera le dépôt de cristaux de fuchsine sur le frottis.
- ④ Chauffer les lames par le dessous au moyen de la flamme d'un bec Bunsen, d'une lampe à alcool ou d'un tampon d'ouate imbibé d'alcool, jusqu'à émission de vapeur. Il ne faut jamais aller jusqu'à l'ébullition de la solution de colorant. Ne pas laisser le colorant se dessécher.
- ⑤ Laisser les lames recouvertes d'une solution chaude et fumante de fuchsine phéniquée pendant 5 minutes en repassant la flamme si c'est nécessaire.
- ⑥ Rincer les lames délicatement à l'eau pour écarter l'excès de fuchsine phéniquée.
- ⑦ Evacuer l'excès d'eau de rinçage des lames. Les frottis d'expectoration ont une couleur rouge.

➤ Décoloration

- ❶ Recouvrir les lames au moyen d'acide sulfurique à 25 % ou d'une solution d'alcool-acide et laisser agir pendant 3 minutes, après cela la coloration rouge devrait avoir presque disparu. En cas de nécessité, répéter cette séquence durant deux minutes supplémentaires.
- ❷ Laver délicatement l'acide sulfurique ou l'alcool-acide et l'excès de colorant à l'eau. Evacuer des lames l'excès d'eau de rinçage.

➤ Contre-coloration

- ❶ Recouvrir les lames l'une après l'autre avec la solution de contre-coloration (bleu de méthylène à 0,3 %) et laisser agir pendant 1 minute.
- ❷ Rincer les lames à l'eau individuellement
- ❸ Evacuer l'eau des lames et les laisser sécher à l'air.

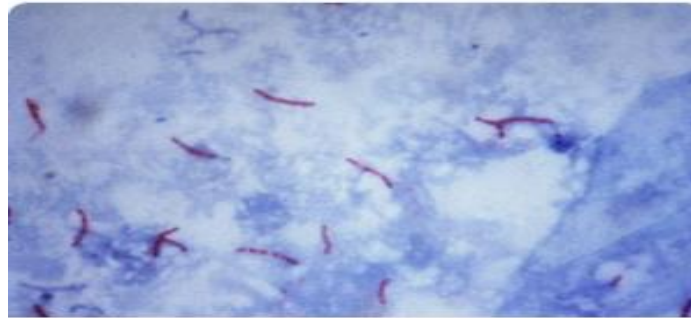


Figure 08 : *Mycobacterium tuberculosis* par la coloration de Ziehl-Neelsen.

➤ La coloration à l'auramine

La coloration à l'auramine est une coloration en fluorescence, pour la mise en évidence des mycobactéries (Les BAAR ou Bacilles Acido-Alcool Résistants). Ils sont colorés en jaune-vert fluorescent sur fond rouge. C'est une alternative à la coloration de Ziehl-Neelsen pour la mise en évidence des mycobactéries. Un résultat positif à la coloration par l'auramine doit être confirmé par une coloration de Ziehl-Neelsen (qui peut être réalisé sur la même lame).

Voici la technique selon la méthode de Degommier :

- 1) Recouvrir la lame d'alcool méthylique : 2 minutes
- 2) Rincer à l'eau distillée
- 3) Recouvrir la lame d'auramine : 15 minutes
- 4) Rincer à l'eau distillée
- 5) Recouvrir la lame d'alcool acide : 5 minutes
- 6) Rincer à l'eau distillée
- 7) Recouvrir la lame de rouge de thiazine : 1 minute 30
- 8) Rincer à l'eau distillée
- 9) Recouvrir la lame d'alcool acide : 3 minutes
- 10) Rincer à l'eau distillée
- 11) Laisser sécher à l'air libre ou dans une étuve

La lecture se fait avec un microscope à fluorescence, de préférence dans une pièce sombre. Les BAAR apparaissent en vert/jaune brillant sur fond rouge orangé (**Fig.09**). La lecture peut se faire à faible grossissement : x25 pour un dépistage rapide et x40 pour confirmation. On doit observer au minimum 30 champs pour déclarer une lame négative (où il n'y a pas de BAAR).

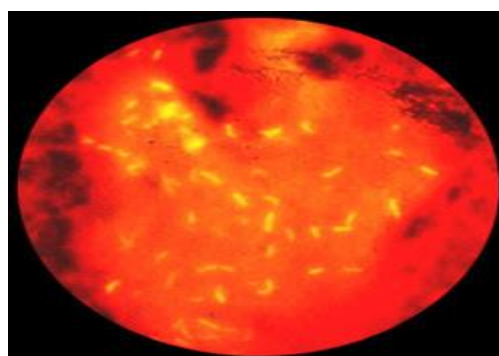


Figure 09 : *Mycobacterium tuberculosis* après coloration à l'auramine.

4.3. Mise en culture

La liste des milieux ensemencés est généralement déterminée à l'avance et dépend des germes recherchés et donc des contextes cliniques (**Tab. 04**).

Tableau 04 : Milieux et conditions de culture.

Milieux	Justification de l'usage	Conditions d'incubation
Ensemencement systématique		
Gélose chocolat enrichie (gélose chocolat + polyvitex)	Gélose non sélective qui permet la culture de la plupart des bactéries aérobies rencontrées dans les crachats.	37° C Atmosphère humide enrichie en CO ₂
Gélose au sang frais + ANC (acide nalidixique + colistine)	Les deux antibiotiques inhibent la plupart des bactéries Gram -, ce milieu permettra donc un meilleur isolement des streptocoques et des staphylocoques.	37° C Atmosphère enrichie en CO ₂
Gélose chocolat enrichie + bacitracine (50 UI/mL) avec ou sans vancomycine	Milieu sélectif des <i>Haemophilus</i>	37° C Atmosphère humide enrichie en CO ₂
Gélose Drigalski ou Mac Conkey	Elle permet une meilleure orientation des bacilles à Gram négatifs non exigeants	37° C Atmosphère ordinaire
Ensemencement non systématique		
Gélose BCYE	Gélose non sélective pour la culture des <i>Legionella</i> ensemencement non systématique	35° C Atmosphère ordinaire
Gélose BCYE sélective (GVPC)	Gélose sélective utile à la culture des <i>Legionella</i> , intéressante aussi pour les <i>Nocardia</i> ensemencement non systématique	35° C Atmosphère ordinaire
Gélose Sabouraud + chloramphénicol ± gentamicine	Gélose sélective des champignons son ensemencement se justifie si des levures ou des moisissures sont observées à l'examen microscopique (à ensemencer directement avec le crachat fluidifié).	37° C Atmosphère ordinaire
Gélose Schaedler + sang de mouton + néomycine et vancomycine	Gélose sélective des bacilles à Gram négatifs anaérobie stricte. son ensemencement dépend du contexte (expectoration fétide)	37°C Anaérobiose

Pour la recherche de *Mycobacterium tuberculosis*, on utilise le milieu de de Lowenstein-Jensen. L'incubation des tubes de Lowenstein se fait à 35-37°C pendant 2 à 3 jours en position horizontale, les bouchons étant dévissés d'un demi-tour. Les tubes de culture seront ensuite conservés à 37°C pendant 6 semaines, puis inspectés une fois par semaine à la recherche d'une prolifération. Au cours de ces inspections, toute croissance d'une colonie de bactéries à la surface des tubes devra être notée. Les souches typiquement humaines de *Mycobacterium tuberculosis* sont rugueuses, résistantes et crème-beige, et s'observent parfois au bout de 2 à 3 semaines d'incubation (mais rarement plus tôt).

4.4. Interprétation des résultats

De nombreux microorganismes responsables d'infections broncho-pulmonaires proviennent des flores commensales des voies aériennes supérieures et peuvent coloniser les voies aériennes inférieures sans provoquer une infection. Pour cette raison, il est nécessaire de distinguer une colonisation d'une infection. C'est pourquoi, il faut connaître la concentration des différents germes dans le prélèvement. En effet, on considère qu'un germe est responsable d'une infection broncho-pulmonaire si sa concentration dans le prélèvement dépasse un certain seuil. Notons que les seuils retenus dépendent du mode de recueil des sécrétions.

Tableau 05: Protocoles pour un dénombrement des germes et seuils définissant la pathogénicité selon les modalités du prélèvement.

	Dilution finale obtenue	Volume de l'inoculum	Seuils définissant la pathogénicité
Expectoration	1/10000	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ⁷ UFC/mL
	1/1000	10 µL	
Aspiration endotrachéale	1/100	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ⁵ UFC/mL
Aspiration bronchique	1/10	10 µL	
Aspiration bronchique protégée	1/2*	100 µL	≥ 50 colonies /boite soit 10 ³ UFC/mL
Lavage bronchoalvéolaire	1/10*	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ⁴ UFC/mL
Mini- LBA	Pas de dilution*	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ³ UFC/mL
Brossage bronchique protégé	Pas de dilution* / extrémité de la brosse dans 1 mL d'eau physiologique	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ³ UFC/mL

5. Examen cyto- bactériologique et biochimique du liquide céphalo- rachidien (LCR)

L'examen du liquide céphalorachidien (LCR) est une urgence dans laquelle le rôle du laboratoire est fondamental: il permet très rapidement de confirmer un diagnostic de méningite, de reconnaître une cause bactérienne et d'orienter un traitement antibiotique. En effet, la méningite bactérienne est une maladie grave, et c'est seulement un traitement précoce et efficace qui peut conduire à une guérison sans séquelles.

L'analyse biologique du liquide céphalorachidien comporte trois étapes:

- L'examen direct avec l'étude macroscopique et microscopique pour la recherche des cellules et bactéries ;
- L'examen biochimique : dosage des protéines, du glucose et des chlorures ;
- La mise en culture suivie le lendemain de l'identification et de l'antibiogramme du micro-organisme isolé.

5.1.Examen macroscopique

Après homogénéisation par une légère agitation, on note le degré de limpidité du liquide et sa coloration.

- **Un liquide clair** (appelé souvent eau de roche) correspond soit à un liquide normal, soit à un liquide pathologique: les liquides clairs peuvent se rencontrer dans les méningites virales, tuberculeuses, ou mycosiques.
- **Un liquide trouble** ou franchement purulent (eau de riz) correspond à une réaction leucocytaire marquée, traduisant généralement une méningite bactérienne.
- En cas de **piqûre d'un vaisseau** au cours de la ponction, on note une coloration rouge du liquide, plus marquée dans le premier tube que dans le dernier, avec souvent formation d'un petit caillot.
- **Les liquides sanglants ou jaunes** (appelés xanthochromiques) dans les trois tubes évoquent plutôt une hémorragie méningée.

5.2. Examen microscopique

Les examens microscopiques sont des examens d'urgence. Ils permettent l'orientation du diagnostic d'une méningite. Ils doivent être communiqués au clinicien dès leur réalisation. Il comporte :

5.2.1. Examen cytologique (qualitatif et quantitatif)

Les examens cytologiques sont importants, ils permettent d'orienter vers la méningite purulente ou lymphocytaire et permettent également de suivre l'évolution de l'infection.

➤ Examen quantitatif (Numération des cellules)

La numération cellulaire est un examen d'urgence. Elle permet l'orientation du diagnostic. C'est une étape très importante dans l'ECB du LCR. Après homogénéisation du liquide céphalorachidien, la numération des leucocytes et des hématies est effectuée en cellule de Malassez. La cellule de Malassez contient 1 mm^3 . Elle est divisée en dix bandes de $1/10 \text{ mm}^3$. Chaque bande est divisée en dix rectangles de $1/100$ de mm^3 (quadrillés ou non). Cet examen consiste à compter le nombre de leucocytes sur plusieurs champs ou bandes en fonction de la richesse de la cellule. Pour faciliter l'examen, on peut ajouter une trace de colorant (solution de bleu de méthylène) à quelques gouttes du liquide céphalorachidien. Un LCR normal contient moins de 5 leucocytes $/\text{mm}^3$ chez l'adulte et entre 10 et 30 leucocytes $/\text{mm}^3$ dont 50% de polynucléaires neutrophiles chez le nourrisson.

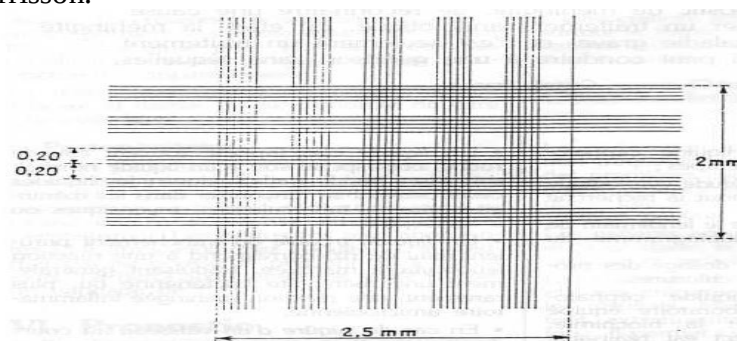


Figure 10 : Cellule de Malassez.

➤ Examen qualitatif des éléments

Il doit être fait dès que le nombre de cellules dépasse dix par mm^3 . Centrifuger le liquide céphalorachidien à 5 000 tours/mn pendant cinq à dix minutes dans un tube conique stérile.

Décanner le surnageant (dans un récipient contenant de l'eau de Javel). Maintenir le tube incliné à 45°, la partie effilée dirigée vers le haut. Introduire une effilure de pipette Pasteur au contact du culot: celui-ci monte spontanément par capillarité. Le répartir sur deux lames à raison d'une goutte par lame (**Fig. 11**). Étaler de façon à ne pas disperser les éléments. Dans le cas d'un culot important, étaler en couche mince, dans le cas contraire, concentrer l'échantillon sur une petite surface. Laisser sécher. Colorer la première lame avec du bleu de méthylène, ou du colorant de May Grünwald Giemsa. Etablir une formule en pourcentages respectifs des polynucléaires, et des lymphocytes (compter au moins 100 éléments).

Les liquides clairs contiennent en général une majorité de lymphocytes, alors que les liquides troubles sont le plus souvent à prédominance de polynucléaires. On trouve:

- une majorité de polynucléaires dans les méningites bactériennes ;
- une majorité de lymphocytes dans les méningites virales, tuberculeuses, ou mycosiques;
- parfois des formules mixtes, en particulier dans les formes de début et au cours des méningites à *Listeria*.



Figure 11

-Coloration au bleu de méthylène : La coloration au bleu de méthylène permet de faire la différence entre les polynucléaires et les lymphocytes. Elle permet également de voir l'aspect morphologique des bactéries (bacilles, Cocci, diplocoques, chainettes...etc.)

-Coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) : Cette coloration permet d'établir l'équilibre leucocytaire dans le LCR (Exemple : 80% de PNA, 20% de lymphocytes).

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) est la coloration de référence pour l'analyse des cellules en hématologie cellulaire. Elle colore les éléments acidophiles ainsi que les granulations neutrophiles des leucocytes et des lymphocytes. La technique de coloration est :

- Couvrir le frottis avec 1 mL de May-Grünwald en solution pendant 3 minutes.
- Ajouter avec précautions 1 mL de Tampon en solution pour hématologie et réaliser le mélange sans débordement. Laisser le mélange en contact 1 minute.
- Rejeter l'excès de colorant par égouttage ou rinçage rapide.
- Couvrir le frottis avec le Colorant de Giemsa R diluée au 1/30 dans un Tampon en solution pour hématologie pendant 10 minutes.
- Rinçage rapide à l'eau courante ou dans un Tampon en solution pour hématologie pendant 10 secondes.

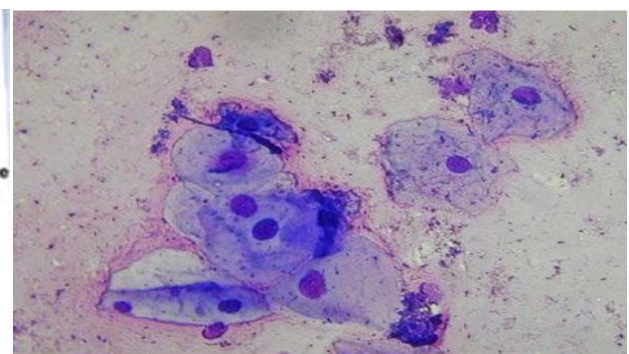
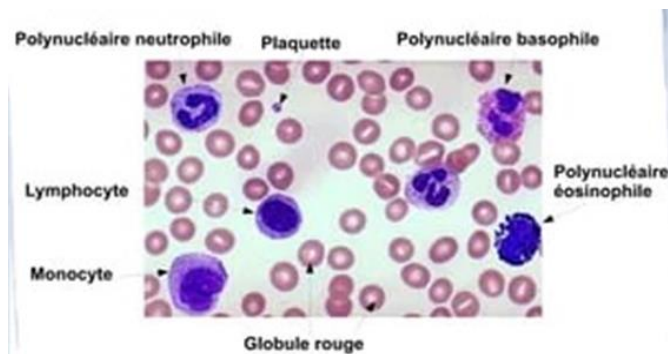


Figure 09 : Observation après coloration MGG.

5.2.2. Examen bactériologique : L'examen bactériologique est basé sur la recherche des bactéries dans le LCR en utilisant les colorations suivantes :

- **Coloration de Gram :** La coloration de Gram permet d'avoir l'aspect morpho-tinctorial des bactéries.
- **Coloration de Ziehl neelsen :** La coloration de Ziehl neelsen permet la recherche des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR).

5.3. Examens biochimique

En plus de l'ECB du LCR, des examens de biochimie sont également effectués à partir du LCR. Cet examen permet d'identifier essentiellement les mesures de la protéinorachie et Glycorachie :

- Protéinorachie : les valeurs normales se situent entre 0,10 et 0,45 g/L. Une protéinorachie très élevée oriente vers une méningite bactérienne. Elle varie de 1 à 5 g/L lors de méningites purulentes.
- Glycorachie doit toujours être exprimée en fonction de la glycémie. Une Glycorachie normale est égale à 65% de la glycémie (valeur normale = 0,6 g/L). Une hypoglycorachie oriente vers une méningite bactérienne.
- Chlorurorachie : Taux normal : 110-120 meq/L. En cas de suspicion de méningite tuberculeuse, le dosage des chlorures montre une hypochlorurachie.

5.4. Mise en culture

Dans les méningites bactériennes, la culture est obligatoire. Au laboratoire, une culture est réalisée immédiatement en fonction de l'orientation des examens microscopiques ou de l'orientation clinique :

- **Cytologie normale** : Quelque soit le nombre d'éléments, le LCR estensemencé sur milieux de cultures adaptés aux bactéries recherchées. En effet, au tout début d'une méningite bactérienne, il est possible de constater un nombre normal. Donc, le LCR estensemencé en quadrant sur gélose chocolat, incubée 5 jours à 37°C sous 5% de CO₂ et sur gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose.

- **Cytologie anormale et absence de germes à l'examen direct** : La mise en culture du LCR sur gélose chocolat, incubée 5 jours à 37°C sous 5% de CO₂ et sur gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose, et complétée par l'ensemencement d'un bouillon cœur-cerveille. Ces deux milieux sont incubés 5 jours à 37°C.

- **Présence de germes à l'examen direct** : La morphologie, le groupement et la coloration de Gram permettent d'orienter le diagnostic. L'examen direct par coloration de Gram est généralement positif à partir 10⁴- 10⁵ UFC/ml. En conséquence, en plus de l'ensemencement classique, une culture quantitative doit être réalisée par ensemencement au râteau de 100µL de LCR pur, et de dilutions au 1/10 et 1/100 du LCR, sur gélose chocolat incubée à 37°C sous de CO₂ (**Fig. 10**).

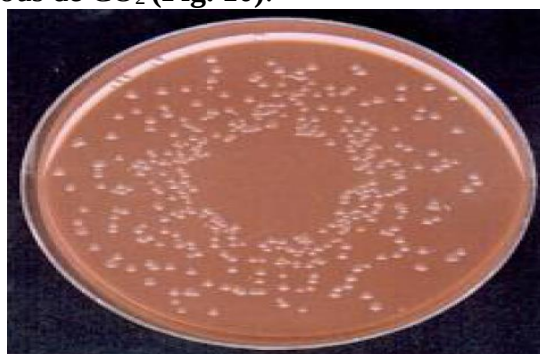


Figure.10: Numération de germes dans le LCR après ensemencement au râteau (méningite à *E.coli* 10⁵UFC/ml)

5.5. Lecture et interprétation

Le tableau n°06 montre les résultats normaux et les résultats pathologiques du LCR :

Tableau 06 : Tableau de lecture des résultats du LCR.

Paramètres	LCR normal	LCR purulent	LCR lymphocytaire
Aspect	Claire	Trouble	Clair
Eléments/mm ³	< 5	>10	>10
Type d'éléments		50% Polynucléaires	50% Lymphocytes
Protéinorachie	<0,4 g/l	>0,4 g/l	>0,4 g/l
Orientation	Normal	Méningite bactérienne	Méningite virale Méningite à <i>Listeria</i> Méningite tuberculeuse