Fiche : TP Virtuels en bactériologie

Au laboratoire...

La demande

- **Renseignements généraux**
 - Patient identifié
 - Service
 - Nom du prescripteur
 - Nom du prélever
- **Renseignements cliniques +++**
 - Terrain
 - Fièvre
 - Infection suspectée
 - Prise d'antibiotiques +++
- **L'échantillon**
 - Localisation, heure, quantité
 - Urine 1er jet, milieu de jet, sonde ?
 - Ponction

De plus en plus d'automates dans les laboratoires :ensemencer, cytomètre de flux, colorateur, spectromètre de masse, automate hémocultures.

J0 : Réception de l'échantillon

- **Aspect macroscopique**
- **Etudes microscopiques**
 - Etat frais (cellules, germes, mobilité)
 - Cytologie (numération PNN...), formule (ponctions)
 - Coloration de Gram, morphologie (cocci, bacilles), groupement (chainettes, amas)

- Attention : pas d'examen microscopique pour les hémocultures -> directement incubés dans les automates.

- **Mise en culture**

- Géloses ; Milieux variés : ordinaires, au sang, au sang cuit, sélectifs, chromogènes...
- Bouillons enrichissement (10j) pour les bactéries plus dures à cultiver (prélèvements bloc ortho, ponctions...)
- Incubation à 37°C
- Différentes atmosphères : aérobie, anaérobie, CO2
 - 18-24h pour les bactéries usuelles
 - 1-5j anaérobies et autres plus rares
 - 1 semaine - 3 mois pour les mycobactéries

Appréciation semi-quantitative et quantitative des bactéries, identification des bactéries isolées.

J1 : Identification

- **Identification rapide**

- Spectrométrie de masse : MALDI TOF
 - Au bout de 4h pour les hémocultures

- **Biologie moléculaire** dans des cas particuliers (24h) : bactéries mal cultivables ou IST

- L'étude du génotype par PCR est utile à toutes les étapes du diagnostic.
- Possible identification moléculaire de la résistance aux ATB mais moins large que la recherche phénotypique (ATBiogramme)
- Limites PCR : coût, faux positifs, faux négatifs (si infection poly microbienne), pas d'antibiogrammes pour tous les antituberculeux

J2 : Antibiogramme

- Milieu gélosé ou liquide

=> La qualité d'un échantillon est primordiale :

- son insuffisance -> faux négatifs
- Sa mauvaise réalisation -> faux positifs (contaminants).

On ne trouve que ce qu'on cherche et on ne peut pas rechercher toutes les bactéries.

Ex : diagnostic d'une endocardite (il faut prolonger l'incubation des hémocultures), ou la recherche de mycobactéries (tuberculose).

TP1 : ECBU

Lors d'un premier épisode d'infection urinaire chez une femme (hors grossesse), sans ATCD particulier :

- bandelette urinaire seulement (leucocytes, nitrites)
- Pas d'ECBU prescrit
- Traitement probabiliste

Réalisation

- Urines du matin de préférence avant toute antibiothérapie
- Hygiène des mains
- Toilette soignée et désinfection du périnée et méat urinaire
- Recueil du **milieu de jet** (car il faut éliminer les bactéries de l'urètre)
- Pot stérile : Acheminement rapide (<2h), conservation possible 4°C
- Ou tube contenant un milieu de transport (boraté) : homogénéiser, transport à température ambiante

L'acheminement au labo est <24h

Etapas d'un ECBU au laboratoire

J0

Examen macroscopique

- Limpide : normal
- Trouble : réaction inflammatoire,...
- Hématique

Examen microscopique

- Leucocyturie : cytologie (numération des éléments)
 - Cellule de Malassez : lame creusée d'une chambre de comptage de volume connue
 - Maintenant au cytomètre de flux
 - **Leucocyturie significative >ou= 10⁴/mL**

- Cylindres ? Amas leucocytaires
- Cristaux ?
- Germes ?

Coloration de Gram : si la leucocyturie est significative

- recherche de pathogènes pour guider une antibiothérapie précoce
- Pour les bactéries usuelles (mycobactéries exclues) :

Etapas :

- 1) Préparation du frottis et fixation à l'éthanol
- 2) Violet de gentiane colore toutes les bactéries
- 3) Lugol : stabilise la coloration
- 4) Rinçage rapide à l'eau
- 5) Décoloration pendant **15s**
- 6) Recoloration à la fuchsine **30s**

Mise en culture

Identifier certains pathogènes et étude de la sensibilité aux antibiotiques.

On ensemence une gélose avec une euse (10mL) et incubation à 37°C.

A RETENIR

Leucocyturie significative $\geq 10^4$ / mL

Bacilles Gram -

- E Coli (entérobactérie) -> 1ere cause d'infection urinaire
- Autres entérobactéries

Cocci Gram +

- Amas : *Staph. Saprophyticus*
- Chainettes : entérocoques (streptocoques de la flore digestive, patientes âgées)

Polymicrobien : contamination probable (présence de cellules épithéliales)

J1

Lecture de la culture et dénombrement des colonies bactériennes

- Culture mono microbienne ?
- Adéquation examen microscopique et culture ?
 - Ex : E.Coli test rapide à l'indol

-> Résultats de la culture : 1 bactérie donne 1 colonie

Seuil (Bactériurie) des bactéries responsables d'infections urinaires communautaires

Homme : $\geq 10^3$ UFC/mL pour toutes les bactéries

Femme : 10^3 UFC/mL pour E. Coli et S. Saprophyticus et 10^4 pour tous les autres germes

- Identification par MALDI-TOF : analyse du spectre protéique des bactéries, par rapport à une base de données

Réalisation de l'antibiogramme

- Par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques)
- Mesure de l'activité **bactériostatique** de différents ATB sur une bactérie donnée
- Le diamètre du disque est proportionnel à la CMI

J2 Lecture de l'antibiogramme

Concentrations critiques :

- basse c : concentration de l'ATB obtenue dans le plasma à posologie recommandée dans le RCP (caractéristiques du produit)
- Haute C : concentration maximale qui peut être obtenue dans le plasma par augmentation de la posologie (seuil de toxicité)
- sensible S : succès thérapeutique si traitement à posologie recommandée
 - $CMI < c$
- résistant R : échec thérapeutique quel que soit le type de traitement et la dose
 - $CMI > C$

- ZIT : zone d'incertitude technique

Conclusion

Infection urinaire communautaire (IUC) = Leucocyturie ($\geq 10^4/\text{mL}$) et bactériurie significatives (seuils de bactériurie)

La majorité des IUC sont **monomicrobiennes**, E.Coli est la principale espèce responsable

TP2. Hémocultures

Bactériémie : présence de bactéries dans le sang.

- Le sang est normalement stérile
 - Hors bactériémies physiologiques, symptomatiques et transitoires (lavage des dents, digestion)
- Les bactériémies et fungémies résultent de décharges à partir d'un foyer infectieux non contrôlé
- Peut s'accompagner de sepsis ou de choc septique
- Pb de santé publique
 - Mortalité élevée
 - Incidence en augmentation

Prélever les hémocultures

- Pour affirmer l'existence d'une **infection**
 - Devant une **fièvre**
 - Autres signes suspectant une infection
- Pour avoir la documentation bactériologique de l'infection et donc prescrire une antibiothérapie optimale (adaptée au germe et la moins large possible)
 - Antibiothérapie initialement probabiliste sera éventuellement modifiée : antibiothérapie documentée.

FP/FN

- FP :
 - Contamination possible au moment du prélèvement
 - **Fréquent : 5-10% des hémocultures**
 - Surtout de la flore cutanée :
 - SCN : *S. Epidermidis*, *S haemolyticus*
 - *Corynebactérium*
 - *Cutibacterium*
- FN :

- Patient déjà mis sous ATB
- Volume de sang prélevé insuffisant
- Bactérie qui ne pousse pas dans les flacons d'hémoculture
 - Ex : *Mycobacterium tuberculosis* : flacons spéciaux

Fréquence, rendement

- Les hémocultures sont le prélèvement bactériologique **le plus fréquent**
- Mais **rendement faible** : seulement environ 5-10% des hémocultures prélevées sont positives, car :
 - ATB préalable
 - Volume de sang prélevé insuffisant
 - Excès d'hémocultures prélevées

Comment prélever ???

- Avant toute ATB
- Protocole de prélèvement
 - Identification correcte des flacons
 - Désinfection des mains, peau, bouchons des flacons
 - **Ponction veineuse périphérique** (pas sur cathéter : plus de contaminants)
 - Volume de remplissage des flacons correct (**8-10mL par flacon**)+++
- La bactériémie est continue (constante), à concentration faible, avec quelques variations dans le temps : le moment du prélèvement n'est pas important.
- Volume de sang total prélevé suffisant : CAPITAL pour la sensibilité = **40 à 60 mL**
- Recommandé de prélever tous les flacons d'hémoculture au cours d'**une seule** ponction veineuse
 - Augmente la spécificité (diminue le risque de contamination par 2 ou 3)
 - Une hémoculture = 1 flacon aérobie + 1 flacon anaérobie
- 2 ou mieux 3 hémocultures (4 à 6 Flacons) : volume total = 40-60 mL
- Attention, non validé pour **endocardite** :
 - Faire 2 ou 3 prélèvements différents

- Si hémocultures négatives après 48-72h, répéter
- **Enfant :**
 - Concentration bactérienne plus forte 100 - 1000 bactéries / mL
 - Diminue avec l'âge
 - Volume de sang total à prélever à adapter au **poids de l'enfant**
 - Flacons pédiatriques (plus petite quantité de sang)

Diagnostic des infections de DIV (dispositif intra vasculaire)

- Méthode des **hémocultures appariées**
 - Permet un diagnostic sans ablation du DIV
 - Prélever en moins de 10 min
 - Une hémoculture périphérique
 - Une hémoculture sur le DIV, sans purge préalable
 - Incuber en même temps
 - Culture **plus précoce sur Hémoculture DIV avec delta > 2h** : argument en faveur d'une infection du DIV

Ensuite

- Les mettre à **incuber le plus vite possible**
 - Automates d'incubation d'hémoculture
 - Faisable aussi en garde le plus souvent : Labos d'urgence
- Si pas possible : garder à **T ambiante**
- Incubation à **35°C** sera poursuivie pendant **5 jours** (sauf cas particuliers)

Les automates d'incubation sont des systèmes automatisés de culture et de détection microbienne.

-> **FLACON DÉTECTÉ POSITIF PAR L'AUTOMATE**

- Examen à l'**état frais** (mobilité) et coloration de **Gram** : communication rapide au clinicien
- Vrai + ou Contamination ?
 - Confronter avec la clinique

- Type de bactérie
 - BGN ou CGN à priori Vrai +
- Ensemencement gélose : **identification (MALDI-TOF)** à partir de colonies le lendemain ou le soir même
- Antibiogramme
 - Fait le jour même : staphylocoques, BGN
 - Fait le lendemain : autres bactéries

TP3. Biologie moléculaire PCR

PCR = polymérase chain reaction

En bactériologie : ADN (en virologie ADN et ARN)

- 1) Choix d'une cible spécifique (portion de gène) de la bactérie recherchée et d'un couple d'amorces oligonucléotidiques qui va se fixer aux deux extrémités de cette cible
- 2) Amplification de cette cible (1 milliard de copies)
- 3) Permettant sa détection

En amont : extraction de l'ADN à partir du prélèvement

- prélèvement de bonne qualité
- Mieux : tube spécifique pour la PCR non ouvert
- Bien conservé (4°C, ou mieux -20°C)
 - A cause des ADN nucléases
- Extraction de bonne qualité : manuelle ou par des automates

En aval : détection

Méthode traditionnelle : électrophorèse en gel d'agarose

- vitesse de migration dépendant de la taille
- Visualisation : GelRed
- Méthode longue et peu sensible
- Risque de contamination (ouverture du tube)

Aujourd'hui : PCR en temps réel

- Amplification et détection couplées
- Détection au cours de la PCR, à chaque cycle d'amplification, sans ouverture du tube
- Suivi en temps réel du déroulement de l'amplification

- Inclusion d'une sonde fluorescente spécifique de l'amplifiat (avec émission de fluorescence uniquement quand elle est hybridée) dans la réaction PCR
- Quantité de fluorescence émise proportionnelle à la quantité d'amplifiat produit

Tests commercialisés

- Tests en série pour automates de PCR
 - Chlamydia/Gonocoque
 - M genitalium
- **Tests unitaires rapides** de réalisation très simples
 - Applications :
 - Chlamydia / N. Gonorrhoeae (IST)
 - Mycobacterium tuberculosis (et résistances à la rifampicine)
 - Clostridium difficile (+ toxines A et B)
 - Sp B (prélèvement vaginal peu de temps avant la grossesse)
 - SARM (à partir d'une hémoculture positive à staphylocoque : CGP amas)
 - BHRé (ecouvillon rectal) -> EPC et ERG

La PCR multiplex

Possibilité dans une réaction PCR de détecter plusieurs cibles (plusieurs bactéries)

- plusieurs couples d'amorces
- Techniquement, plus complexe et difficile à optimiser
- Diminution de sensibilité par rapport à PCR « mono »

PCR syndromique

- Regrouper plusieurs PCR multiplex dans un même test
- Recherche possible de 15-20 germes
- Bactéries, virus, champignons, parasites les plus fréquents dans une pathologie infectieuse donnée

- Pathologies : méningo-encéphalites, gastro, infections respiratoires communautaires ou nosocomiales...
- Exemple : **FilmArray Panel** pour la méningite / encéphalite. Elle recherche des bactéries (des méningites), des virus, et des levures. Elle est mise en place dans de nombreux hôpitaux.

Avantages de la PCR par rapport à la culture

- possibilité de détecter des **bactéries difficilement ou non cultivables**
- Possibilité de détection **même si prise d'ATB préalable**
- **Rapidité** (de 1 à 5h) : ex : dépistage du portage vaginal de Sp B au plus près de l'accouchement
- Sensibilité **souvent >** à la culture (mais parfois inférieure, notamment dans la tuberculose, où l'ADN est difficile à extraire)
- Excellente **spécificité**, mais pas de 100%

Faux positifs de la PCR

- sensibilité à la contamination : un faux positif reste possible +++
- Spécificité 96-99% : **1-4% de FAUX POSITIFS**
 - Extraction (surtout si manuelle)
 - Réalisation du test : Technicien qui tousse au moment de pipeter le LCR
 - Donc interpréter le résultat **en fonction de la probabilité diagnostic pré-test**

Pour la tuberculose : la PCR est top pour confirmer un diagnostic positif, mais nul quand le test est négatif de base. Aucun intérêt de réaliser une PCR sur un examen extra-respiratoire négatif !!!

Autres avantages de la PCR sur la culture

- Possibilité de **diagnostic syndromique** rapide
- Possibilité de détection rapide de certaines **résistances**
 - Tuberculose et R à la rifampicine
 - Identification des SARM devant une hémoculture positive à Staphylocoque
 - Détection rapide des EPC et ERG (BHRé) dans écouvillon rectal

- Possibilité de détection de la bactérie mais aussi de **facteurs de virulence**
 - Toxines A et B du Clostridium difficile
 - Recherche de la shigatoxine de E. Coli entérohémorragique

Inconvénients de la PCR par rapport à la culture

- **Coût ++**
- ADN : bactéries vivantes ou mortes ?
 - Attention au patient déjà traité par ATB, il est parfois déjà en guérison
- Seules les bactéries **ciblées** peuvent être détectées
- Pas de possibilité de réaliser un Antibiogramme complet

Conclusion : futur de la Biologie Moléculaire

- **PCR-séquence « 16S universelle »** : existe déjà, quelques labos utilisent cette technique
 - Indication typique : Pus profond avec PNN et culture stérile
 - Amorces universelles gène ARN ribosome 16s (toutes les bactéries !)
 - Séquençage amplifiant : chaque bactérie a une séquence spécifique
- **NGS (Next Generation Sequencing)** -> Futur !
 - Dans un prélèvement (possible multibactérien)
 - Séquençage à haut débit de **tous les ADNs de microorganismes**
 - Identification et quantification de **tous** les germes présents
 - Détection des gènes ou mutations de R aux ATB