

Diagnostic biologique d'une Infection Bactérienne

Le diagnostic bactériologique est **un ensemble d'étapes** permettant de confirmer telle ou telle étiologie infectieuse d'origine bactérienne. Ces étapes sont **variées** et caractérisent **soit le diagnostic direct soit le diagnostic indirect**.

- ❖ **Diagnostic direct** : c'est la mise en évidence de la bactérie par isolement en culture ou de l'un de ses constituants qui signent le diagnostic de l'infection.
- ❖ **Diagnostic indirect** : correspond à la 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.

1. Diagnostic direct :

1.1. Examen macroscopique :

L'infection bactérienne peut s'accompagner d'une **modification visuelle ou macroscopique**, clairement perceptible à l'œil nu, qui signe une anomalie patente. On parlera alors de liquides : trouble, hématurique, xanthochromique, en eau de riz....

On notera aussi l'**odeur et la consistance** du prélèvement.

1.2. Examen microscopique :

L'examen microscopique a un intérêt diagnostique au delà d'un certain seuil. Souvent, on notera aucune anomalie macroscopique du prélèvement, d'où la nécessité de rechercher **des bactéries** et d'autres éléments (surtout cellulaires de type polynucléaire) au **microscope optique**.

1.2.1. Etat frais :

L'examen direct à l'état frais permet d'apprécier la morphologie des **bactéries**, leurs groupements, leur abondance ainsi que leur mobilité. Il permet également de visualiser la présence de certains éléments (**cristaux, parasites**) mais surtout d'apprécier la présence de **cellules** avec une appréciation **semi-quantitative** (rare, peu nombreux, assez nombreux, très nombreux) ou mieux **quantitative** (nombre de cellules par mm³ ou ml ou par champ).

Pour ce faire, une goutte d'une préparation est déposée **entre lame et lamelle** et **observée directement** au microscope optique au faible grossissement (X10 ou X40).

Autres microscopes :

Microscope à fond noir (*Treponema pallidum*) ; microscope à contraste de phase ; microscope électronique.

1.2.2. Examen microscopique après coloration :

Un frottis fin est obtenu à partir du produit pathologique, puis coloré permettant une **meilleure visualisation** des bactéries et/ou des éléments cellulaires.

- **Coloration simple:** Le frottis fin est traité par un seul colorant basique ex : le bleu de méthylène.
- **Coloration différentielle :** ex : coloration de Gram.
- **Colorations spéciales :**
 - ✓ **Coloration de Ziehl Neelsen :** mise en évidence des mycobactéries (bacilles acido-alcool-résistants),
 - ✓ **Imprégnation argentique :** ex : *Leptospira* ;
- **Autres colorations :**
 - ✓ **Immunofluorescence directe :** ex : *T.pallidum* ;
 - ✓ **Coloration des éléments bactériens :** spores (*Clostridium*), flagelles (*Vibrio*), capsules (*Streptococcus pneumoniae*).

1.3. Mise en évidence des antigènes bactériens :

- ❖ **Recherche des antigènes solubles :** ex : pneumopathie à *Legionella* ; méningite bactérienne purulente (*N.meningitidis* sérogroupes A,B,C,W,Y135, *E.coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*) ;
- ❖ **Recherche des antigènes du corps bactériens :** Ex : protéine A du *S.aureus*, antigène de la membrane externe de *C.trachomatis* (agglutination ; immunofluorescence directe)

1.4. Isolement en culture :

Divers milieux sont utilisés qui doivent satisfaire les besoins nutritifs et énergétiques des bactéries à cultiver.

En pratique, sont utilisés **plusieurs milieux solides (gélifiés)** avec une technique particulière d'ensemencement (isolement orthogonal ou en cadran) permettant l'**isolement** de clones bactériens sous la forme de **colonies**.

Des milieux liquides **d'enrichissement** sont également utilisés.

Après ensemencement, les divers milieux sont habituellement incubés dans une étuve en général à une température de 35 à 37°C en atmosphère aérobie ou anaérobie.

De très nombreuses espèces bactériennes cultivent **après 18 à 24 H d'incubation à 37°C**. Cependant d'autres espèces ont des délais d'incubation plus longs tel que **Mycobacterium tuberculosis** (temps moyen d'isolement de l'ordre de **21 jours**).

Les cultures sont examinées en notant : l'abondance ou le nombre de colonies, le nombre de morphotypes et la morphologie des colonies obtenues (**aspect, taille, pigmentation**), la présence ou non d'une hémolyse sur gélose au sang.

Remarque : l'isolement des bactéries du **genre Chlamydia se fait sur culture de cellules** de mammifères et non sur milieux gélosés classiques.

1.5. Identification des bactéries :

- **Tests rapides d'orientation** : coloration(Gram), catalase, oxydase ;
- **Ensemencement d'une galerie biochimique adaptée** : galerie classique ou galerie prête à l'emploi type API ;
- **Recherches complémentaires** : Détermination de la structure antigénique par des réactions d'agglutinations à l'aide d'immuns sérums spécifiques : Salmonella, Streptococcus, E.coli.
- **Antibiogramme** : L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a un but thérapeutique mais également diagnostique. Elle se fait sur milieu Mueller Hinton (bactéries non exigeantes) ou Mueller Hinto + sang (bactéries exigeantes)
- **Biologie moléculaire** :

La mise en évidence du **génome** permet de caractériser la bactérie en cause soit à partir **des colonies** ou même directement à partir **des prélèvements**. Certaines techniques de biologie moléculaire permettent de mieux caractériser les souches (Intérêt épidémiologique).

Ex : PCR (polymerase chain reaction) ; l'hybridation ; le séquençage.

2. Diagnostic indirect ou sérologique :

Il vise à **décélérer et à quantifier la présence des anticorps spécifiques** produits par l'organisme en réponse à l'infection bactérienne.

Les anticorps sont surtout recherchés dans le **sang** mais peuvent également être décelés dans d'autres liquides : **LCR, liquide articulaire**.

Le choix de la technique utilisée est conditionné par le délai d'apparition des anticorps mais aussi par sa **sensibilité** et sa **spécificité**.

De nombreuses techniques sont disponibles :

- ❖ **Réactions d'agglutination** : particules de latex, ou hémagglutination ;
- ❖ **Réaction de fixation ou de déviation du complément** : c'est une technique qui utilise la propriété que possèdent certains composants du complément de se fixer sur les complexes antigène-anticorps. L'activation du complément qui en résulte provoque l'hémolyse des érythrocytes.
- ❖ **Techniques immuno-enzymatiques type EIA ou ELISA** : détection des anticorps par des antiglobulines (anti-anticorps) liées à une enzyme. L'addition du substrat de l'enzyme donne **une réaction colorimétrique dont la densité optique** est déterminée au spectrophotomètre.
- ❖ **Immunofluorescence indirecte (IFI)**: détection des anticorps en utilisant des anti-anticorps (antiglobuline) fluorescents avec lecture au microscope à fluorescence

Exemples d'infections bactériennes au cours desquelles la recherche d'anticorps permet de poser le diagnostic :

- ❖ **Brucellose** : plusieurs techniques :
 - Séro-agglutination lente de Wright (SAW) = méthode de référence de l'OMS ;
 - Epreuve à l'Ag tamponné (EAT) ou card- test ou épreuve de l'antigène coloré au rose Bengale) ;
 - ELISA ; IFI
- ❖ **Infections à Chlamydia** : micro-immunofluorescence ; EIA
- ❖ **Syphilis** : TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination Assay) ; VDRL (Veneral Disease Research Laboratory)
- ❖ **Leptospirose**: ELISA; Micro-agglutination Test(MAT) ou sérodiagnostic de Martin et Petit

Diagnostic biologique d'une Infection virale

Diagnostic direct :

- A. Recherche directe du virus en microscopie électronique**
- B. Recherche des antigènes viraux dans les prélèvements biologiques** : par immunofluorescence directe ; par technique immuno-enzymatique (EIA ou ELISA).
- C. Isolement du virus** :

- Inoculation à l'animal (souriceau nouveau-né ; lapin ; cobaye ; arthropodes hématophages)
- Inoculation à l'œuf de poule embryonné ex : virus de la grippe
- Culture cellulaire (cellules de mammifères) avec observation d'un **effet cytopathique caractéristique** (changements morphologiques typiques des cellules dus à la multiplication des virus) et identification du virus (détection des antigènes ; détection d'une activité enzymatique ; détection du génome)

D. Recherche du génome viral par techniques de biologie

moléculaire directement dans les prélèvements : amplification génique ; hybridation.

Diagnostic sérologique :

Recherche d'**antigènes** mais surtout détection et quantification d'**anticorps spécifiques** par différentes techniques :

- ❖ Immunofluorescence indirecte ;
- ❖ Techniques immuno-enzymatiques type ELISA (ex : VIH) ;
- ❖ Réaction de fixation du complément
- ❖ **Inhibition de l'hémagglutination** (ex : virus de la grippe) : réaction basée sur la propriété du virus de se fixer à la surface des certaines hématies par l'intermédiaire d'hémagglutinines. Lorsque le virus est ainsi entouré d'anticorps il n'a plus d'accès à la surface de l'hématie : il y a inhibition de l'hémagglutination.

Remarque : exemple de la recherche d'antigènes viraux :

- **Antigène HBs** témoin d'une infection par le virus de l'hépatite B
- **Antigène p24** : témoin d'une infection par le VIH

Recherche et/ou quantification d'anticorps spécifiques: exemples :

VIH ;

Hépatites virales : A ; B ; C ; D.

Rubéole

Epstein Barr Virus (EBV)