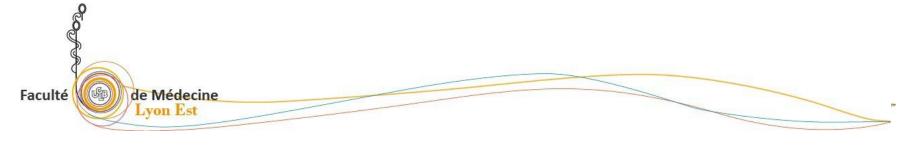
Principes et méthodologie des examens bactériologiques



UE18 – Microbiologie - Maladies infectieuses (MiMI)

Année Universitaire 2025-2026



OBJECTIFS:

Module du DFASM1 maladies infectieuses

Apprendre les maladies infectieuses (clinique, prévention et thérapeutique)

Les objectifs du cours de bactériologie de l'UE18 du FGSM3

- Comprendre les principes du diagnostic bactériologique
- Connaître les principales bactéries responsables d'infections
- Acquérir des connaissances sur les traitements par les antibiotiques



Comment les bactéries se développent-elles au laboratoire?

- Nécessité de milieux de culture
 - simples ou complexes
 - certaines bactéries sont très exigeantes pour croître
 - milieux liquides ou solides

- Nécessité de conditions atmosphériques adaptées
 - bactéries aérobies
 - bactéries anaérobies
 - etc.

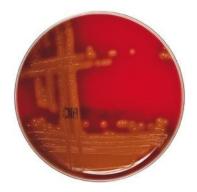


Les milieux de culture













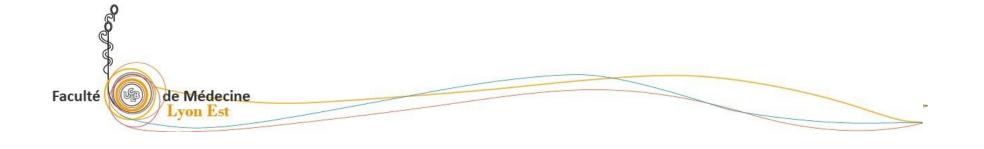






Délai de croissance au laboratoire

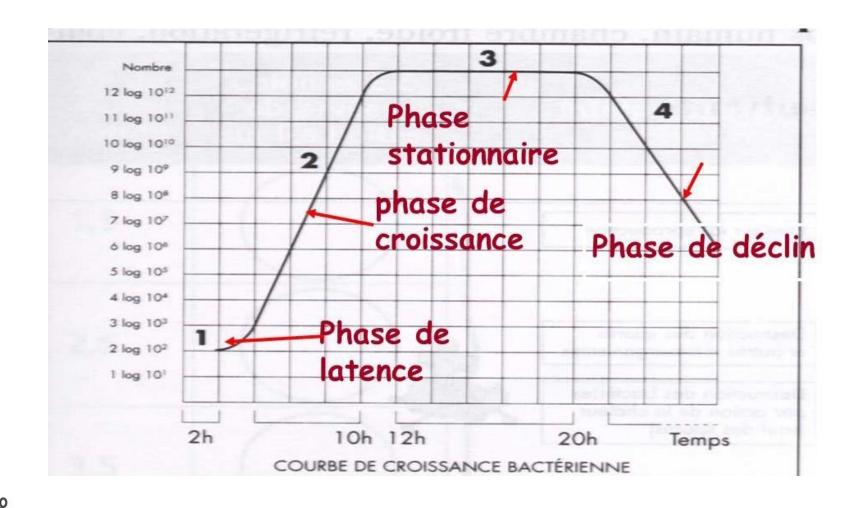
- Reproduction binaire (par scissiparité)
- Une bactérie mère engendre 2 bactéries filles
- Le délai de croissance dépend du temps de division
- Le délai d'obtention des résultats de diagnostic d'une infection dépend des bactéries en cause
 - à Escherichia coli peut atteindre 48 h (avec résultat antibiogramme)
 - à Mycobacterium tuberculosis peut atteindre 4 semaines



La courbe de croissance bactérienne

Faculté (

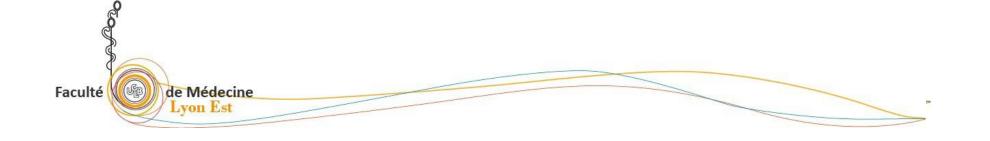
de Médecine Lyon Est



http://images.slideplayer.fr/3/1173901/slides/slide_12.jpg

Le dénombrement bactérien

- Permet de calculer le nombre de bactéries présentes dans un échantillon
- Est exprimé en Unités Formant Colonie par mL (UFC/mL)
- Le dénombrement entre comme critère de diagnostic de certaines infections:
 - respiratoires
 - o <u>Ex</u>: seuil significatif dans un LBA (lavage-broncho-alvéolaire): 10⁴ UFC/mL
 - urinaires
 - important dans les prélèvements avec flore commensale



Le diagnostic des infections

- Diagnostic direct : permet l'identification de la bactérie après culture
 - 1ère étape : le prélèvement (cf après)
 - 2^{ème} étape : quels résultats possibles à l'arrivée du prélèvement?
 - 3^{ème} étape: mise en culture + incubation
 - 4ème étape: identification + antibiogramme
 - Identification possible par PCR
 - Recherche d'antigènes directement dans le prélèvement
- Diagnostic indirect : sérodiagnostic
 - Augmentation significative du titre des anticorps



L'apprentissage par l'exemple

I- Diagnostic d'une infection cutanée



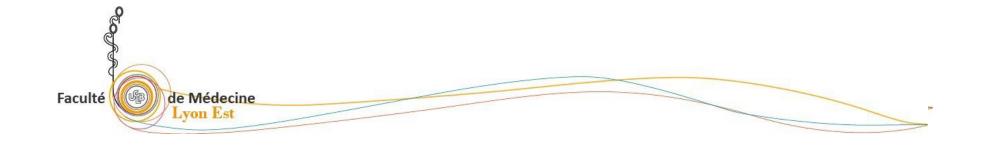


Diagnostic d'une infection cutanée

Contexte clinique :

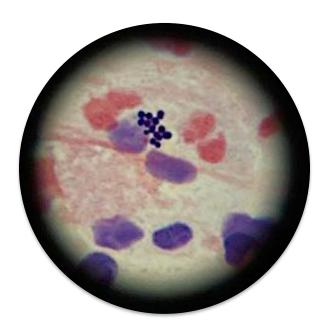
Jules, âgé de 20 ans, voulait recoudre son maillot de bain et s'est piqué le doigt avec une aiguille. Dans les 48 h, il a développé un abcès avec du pus au niveau de la piqûre.

Comment faire le diagnostic pour connaître la bactérie responsable?



J0 premiers résultats au laboratoire

 Prélever le pus avec un écouvillon eswab stérile



- A l'arrivée au laboratoire :
 - Examen direct: étalement du pus sur une lame pour coloration de Gram et observation au microscope
 - Dans cet exemple: cocci à Gram + (staphylocoque?)
 - Ensemencement de milieux de culture + incubation



Coloration de Gram

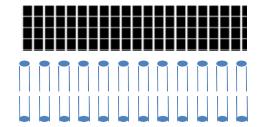
Lipopolysaccharides

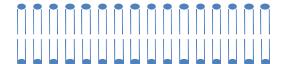
Phospholipides

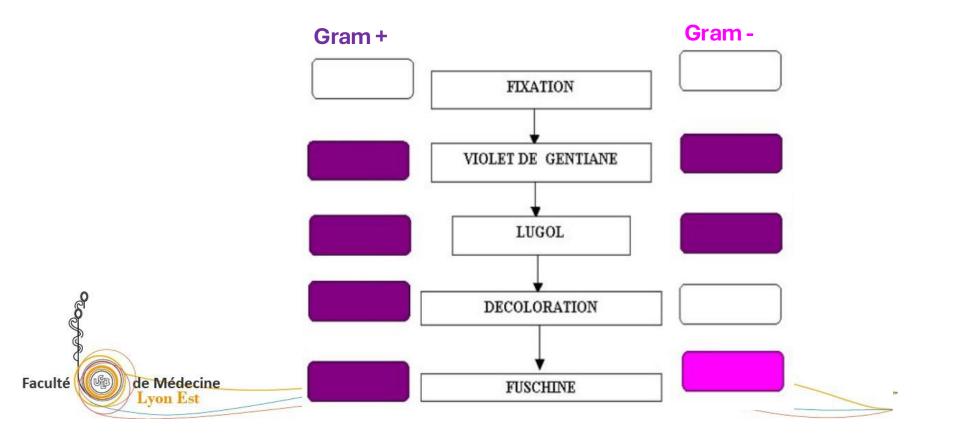
Porine

Peptidoglycane

Membrane plasmique





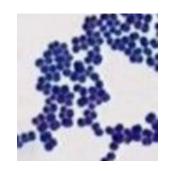


Exemples de Gram

Cocci Gram +

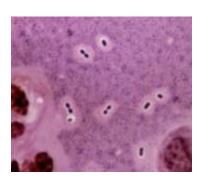
Staphylocoque doré

= Staphylococcus aureus Cocci Gram + en amas



Pneumocoque

= Streptococcus pneumoniae Cocci Gram + diplocoques



Streptocoque B

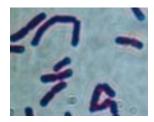
= Streptococcus agalactiae Cocci Gram + chainettes



Bacilles Gram +



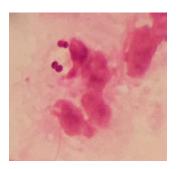
Listeria monocytogenes méningites



Bacillus cereusTIAC
Toxiinfections alimentaires collectives

Exemples de Gram

Cocci Gram -



Méningocoque

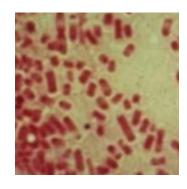
= Neisseria meningitidis méningites



Gonocoque

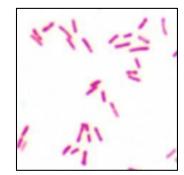
= Neisseria gonorrhoeae IST





Entérobactéries

Ex: Escherichia coli



Pseudomonas

Ex: Pseudomonas aeruginosa

=pyo



J1 Résultats au laboratoire après 24 h

- Examens des milieux de culture
 - Colonies sur gélose (hémolyse ß)
- Réalisation d'une identification
 - Identification Maldi Tof (résultat en 1h)
 - Ensemencement dans du plasma de lapin pour réaliser le test de la coagulase
- Ensemencement d'un antibiogramme
 - Milieu culture avec des antibiotiques et la bactérie
 - Incubation des milieux pendant 24 h





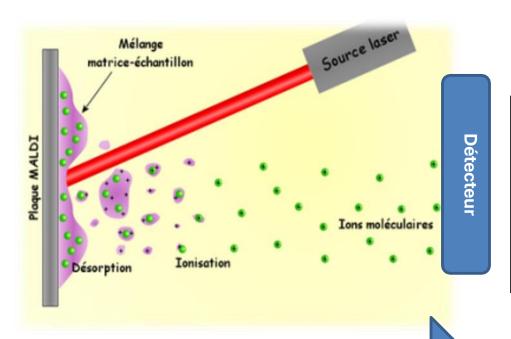


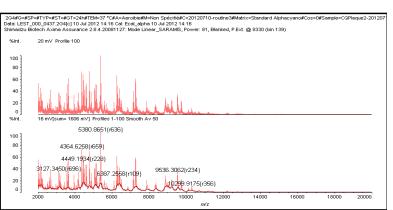
Maldi Tof

• Spectrométrie de masse par «Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation; and measure of Time of Flight»

Ionisation de l'échantillon et mesure du temps de vol des ions







Séparation des ions selon le rapport m/z (Temps de vol)

de Médecine

Lyon Est

Faculté (

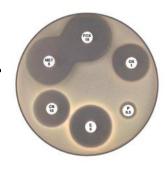
Spectre spécifique d'une espèce bactérienne Résultat en 1h

J2 Résultats au laboratoire après 48 h

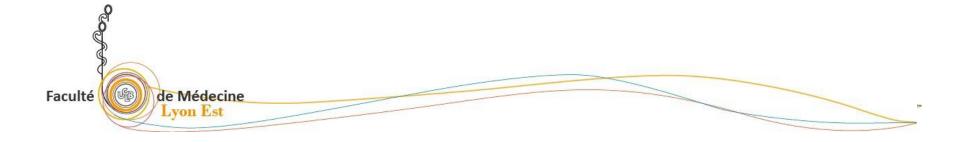
- Le plasma de lapin a coagulé :
 - C'est un Staphylococcus aureus
 - Test historique



- Résultats de l'antibiogramme
 - Sensible à l'oxacilline, la gentamicine, la vancomycine, etc.
 - Résistante à la pénicilline G

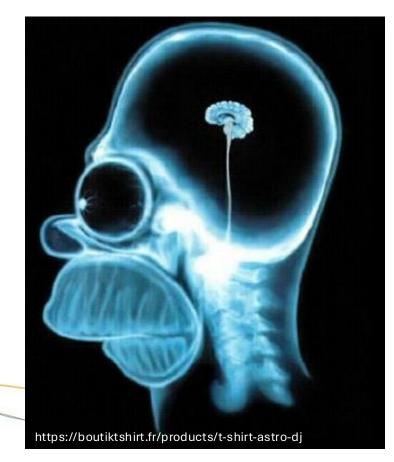


• L'analyse est terminée et les résultats sont communiqués



L'apprentissage par l'exemple

II- Diagnostic d'une méningite



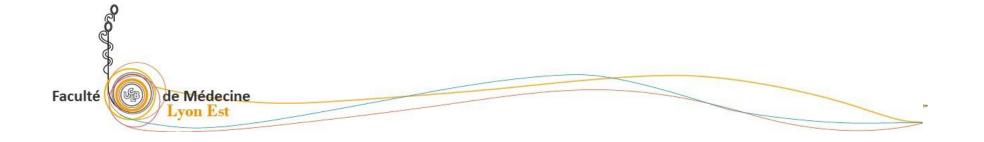


Le diagnostic d'une méningite bactérienne

• Contexte clinique:

Julien, âgé de 20 ans, se présente aux services des urgences de l'hôpital avec des céphalées très importantes, une photo-phonophobie, des vomissements en jets, une fièvre à 40°C. L'examen clinique met en évidence une raideur méningée et un purpura pétéchial.

 Comment faire le diagnostic pour connaître la bactérie responsable de cette méningite?



Quels prélèvements réaliser?



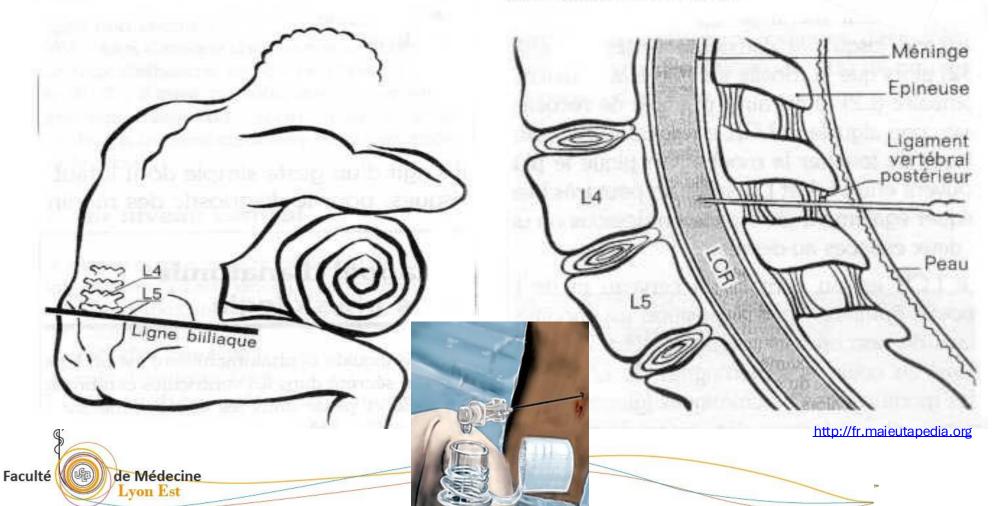
1. Ponction lombaire





Position du malade.

Ponction lombaire.



Examen = ponction lombaire

Contre indication

- hypertension intra-crânienne
- syndrome hémorragique

Recueil

- après asepsie, 3 tubes 1ml de liquide minimum
 - biochimie-cytologie: à J0

cellules (PNn/L), protéinorachie, glycorachie

- bactériologie
- virologie
- Transport: rapide, <30 min
 - bactéries fragiles





Un tube de LCR pour la bactériologie

- Analyse à J0
 - Examen direct : coloration de Gram
 - Si présence de cocci à Gram négatif, suspicion de méningocoque (Neisseria meningitidis) ⇒Appel service clinique
 - PCR multiplex (bactério + viro)
 - Ensemencement des milieux de culture
- Résultats à 1: identification confirme Neisseria meningitidis
- Résultats à J2 : antibiogramme
- Déclaration obligatoire ARS
 - Dès J0 pour le méningocoque





2. Hémocultures

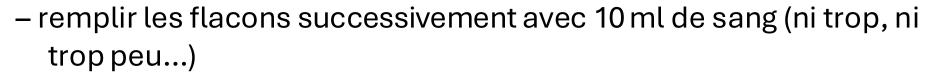
- Doivent être prélevées face à tout patient fébrile
- Problèmes:
 - taux de positivité faible (<5%)
 - risque de contamination élevé (3 à 10%)

⇒ d'où difficultés d'interprétation



Comment réaliser une ponction veineuse?

- Avant toute antibiothérapie
- Ponction veineuse
 - asepsie +++
 - mise en place de l'aiguille et ponction



- Éviter de prélever sur matériel en place sauf si
 - recherche d'une infection sur matériel : hémocultures différentielles





Prélèvement: paramètres importants

!!!! Le volume doit être suffisant

Adulte

- Densité bactérienne # 1UFC/ mL sang
- Paires d'hémocultures : flacon aérobie + anaérobie
- 40 à 60 mL soit 3 paires d'hémocultures en une fois sauf endocardite infectieuse

Enfant

Faculté (

- Densité bactérienne plus élevée, diminuant avec l'âge
- 1seul flacon pédiatrique
- 1à 2 mL

de Médecine

À adapter en fonction du poids

Risque élevé de contamination

- Origine des bactéries contaminantes :
 - mains du personnel
 - bouchons protecteurs des hémocultures
 - flore cutanée du patient ++++
 - environnement
- d'où:nécessité d'asepsie+++



http://bertrandbuchs.blog.tdg.ch



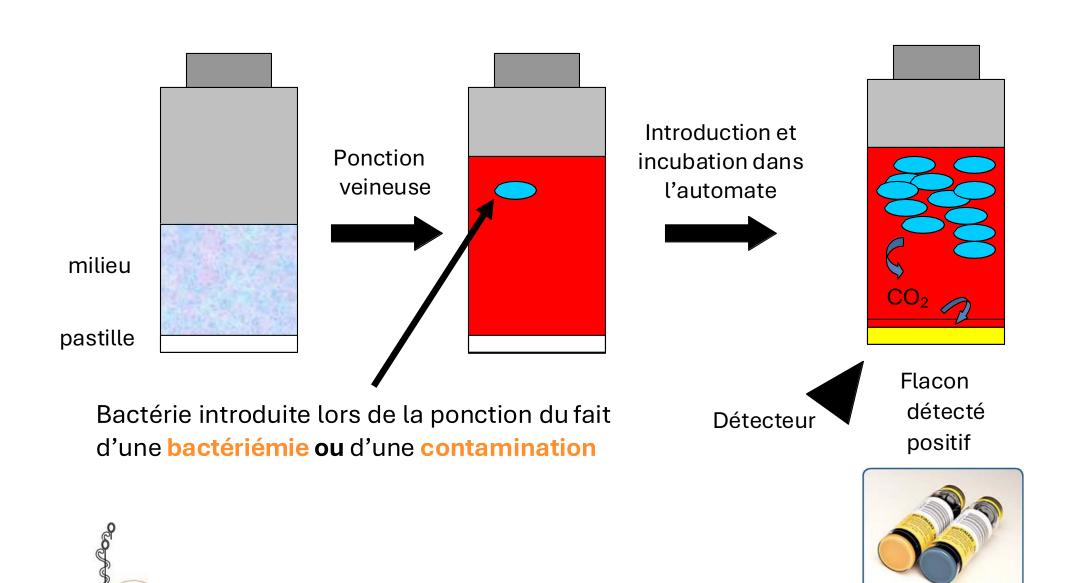
http://www.guide-tattoo.fr



http://www.wikilinks.fr



Hémocultures - Principe de détection



Faculté (

de Médecine Lyon Est http://www.biomerieux-usa.com

Le parcours d'une hémoculture au laboratoire

- A l'arrivée : mise dans un incubateur
- Pas d'examen direct à J0 !!!!

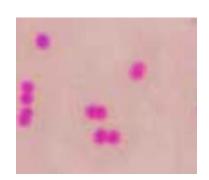


- Dans le cas de Julien, 16 h après le début de l'incubation, les 2 paires d'hémocultures sont détectées positives
- A partir du flacon d'hémoculture positif :
 - J0 Examen direct : Coloration de Gram :
 - Cocci à Gram négatif pour 3 flacons ⇒ appel du service clinique
 (⇒ suspicion de Neisseria meningitidis)
 - Cocci à Gram positif pour 1 flacon
- Ensemencement sur milieux de culture + réalisation de l'antibiogramme

Au laboratoire, 24 h et 48H après

Pour 3 flacons

- J+1: Colonies sur milieux de culture
 - Coloration de Gram : cocci à Gram négatif
 - Maldi Tof ⇒ Neisseria meningitidis
 - Sérogroupage ⇒ sérogroupe B
- J+2:
 - Antibiogramme : sensibilité et résistance
 - Le résultat complet peut être rendu







Pour le 4^{ème} flacon d'hémoculture,

- C'est un cocci à Gram positif,
- Identifié comme Staphylococcus epidermidis
- 1 flacon sur 4, germe de la peau
- C'est un contaminant!!!



Interprétation

Bactériémie

Staphylococcus coagulase négative et autres bactéries de la flore cutanée : corynébactéries, *Propionibacterium*



Interprétation en fonction du contexte

- Nbre flacon+ / nbre d'hémoc
- Facteurs de risque : Matériel
- Contexte clinique

S. aureus
S. pneumoniae
Entérobactéries
P. aeruginosa
C. albicans
Streptocoques
Méningocoque



a priori pathogènes



Àretenir sur les hémocultures

- La ponction veineuse doit :
 - éviter au maximum toute contamination (risque de faux +)
 - recueillir un volume de sang suffisant (risque de faux -)
- Quand hémoc se positive J0 : ED, J1 : culture, J2 : ATBg
- Interprétation en fonction de la bactérie, du nombre de flacons et du délai de pousse
- Antibiothérapie probabiliste adaptée au contexte et à l'ED puis réadaptée en fonction de l'antibiogramme
- Toujours rechercher la porte d'entrée



Place de la PCR dans le diagnostic des méningites

Contexte clinique :

Appelé au domicile de Julien, le Dr Juliette évoque le diagnostic de méningite à méningocoque devant les signes cliniques et le purpura. Elle lui pratique à juste titre une injection de **Ceftriaxone** et appelle le SAMU pour transférer Julien à l'hôpital. Toutes les analyses bactériologiques (hémocultures et PL) demeureront stériles (rôle des antibiotiques).

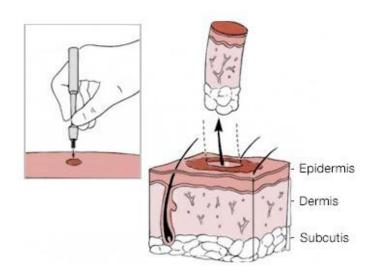




reannecy.org/documents/.../Pédiatrie/purpura%20fulminans.ppt

PCR spécifique N. meningitidis

- A partir des prélèvements suivants :
 - LCR
 - Biopsie cutanée sur les lésions purpuriques
 - Non réalisable à partir des hémocultures



Exemple de PCR syndromique LCR (J0)



Contexte LCR	*Méningite
Leucocytes	>25
Hématies	0
Gram	{ <n_af_res_qcgn}< td=""></n_af_res_qcgn}<>
Culture	[EC ;], Culture stérile sur milieux spécifiques après 7 jours d'incubation, résultat définitif.
AF_LCR_WASP_INFO	Leucocytes = >25. Hematies = 0 Gram = quelques cocci à Gram négatif
AF_LCR_WASP_INFO	Leucocytes = NR. Hematies = NR Gram = NR
N°MAX-LCR	BMAX24-09-83
EXT MAX LCR	*COMPLETED
Méningo A LCR	négatif
Méningo B LCR	PRESENCE d'ADN de N.meningitidis groupe B
Méningo C LCR	négatif
Méningo W LCR	négatif
Méningo X LCR	?
Méningo Y LCR	négatif
PCR E coli K1 Biof	Négative
PCR Haemoph Biof	Négative
PCR Listeria Biof	Négative
PCR Méningo Biof	POSITIVE
PCR Strepto B Biof	Négative
PCR Pneumocoque Biof	Négative
PCR CMV Biofire	NEG
PCR Enterovirus Biof	Négative
PCR HHV6 Biofire	Négative
PCR Parechov Biofire	Négative
PCR HSV1 Biofire	Négative
PCR HSV2 Biofire	Négative
PCR VZV Biofire	Négative
PCR Cryptocoque Biof	*Négative
Conclusion PCR Biofi	{ <n_mb_lcrbiof_neimen}< td=""></n_mb_lcrbiof_neimen}<>

BioFire® FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel





ÉVALUER

LES TECHNOLOGIES DE SANTÉ

RAPPORT D'EVALUATION

Intérêt des techniques d'amplification des acides nucléiques (TAAN) multiplex dans la prise en charge médicale des infections neuroméningées

des infections ningées Détaillées dans le cours sur les syndromes méningés Détaillées dans le cours

Validé par le Collège le 16 janvier 2025

L'apprentissage par l'exemple



III- Diagnostic des

Infections sexuellement transmissibles (IST)



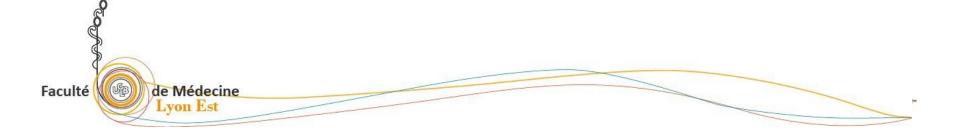
Diagnostic d'IST

Contexte clinique :

Julot, âgé de 30 ans, n'est pas sage. Il a eu de multiples relations sexuelles à risque, donc non protégées. Les virologues découvrent que Julot est porteur du virus VIH, agent du SIDA.

Lors du bilan initial, on recherche 3 IST dues à des bactéries : gonocoque, *Chlamydia*, et syphilis.

Ne pas oublier de rechercher toutes les IST virales VIH, hépatites B et C



Recherche d'une infection à Neisseria gonorrhoeae (= gonocoque)

Prélèvement J0

- avant tout traitement et si possible au laboratoire
- Homme: écoulement urétral ou urine 1er jet



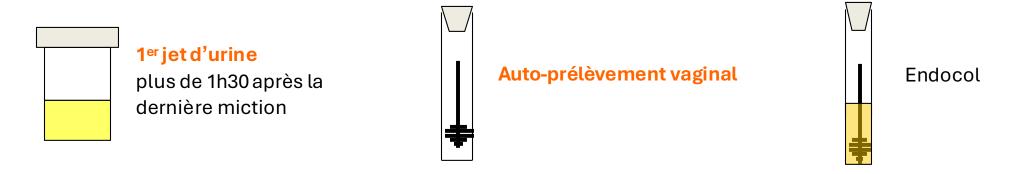
- Femme: écoulement urétral ou urine 1er jet ou endocol
- transport immédiat au laboratoire car fragile
- Examen microscopique Jo: Gram
 - diplocoques à Gram négatif intra-leucocytaires
- Mise en **culture** : milieux riches (résultat 11)
- Faire un antibiogramme (résultat J2)



http://www.microbe-edu.org

Recherche d'une infection à Chlamydia

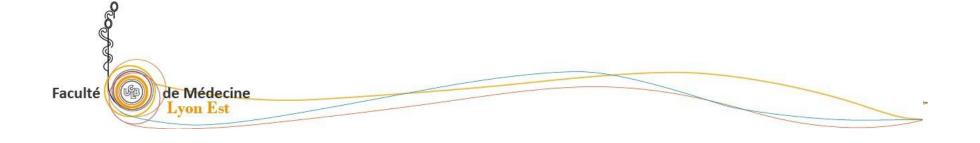
• Prélèvements: il faut des cellules



Diagnostic direct :

- PCR:+++

(meilleures sensibilité et spécificité sur urines de 1er jet +++)



Recherche d'une syphilis due à Treponema pallidum

- Si syphilis active, diagnostic direct à partir des lésions
- Pour le cas de Julot, diagnostic INDIRECT : sérologie.
 - recherche d'anticorps anti-tréponème par deux techniques complémentaires
- En pratique : diagnostic sérologique systématique





L'apprentissage par l'exemple

IV- Diagnostic d'une infection bronchopulmonaire





Diagnostic d'une infection bronchopulmonaire

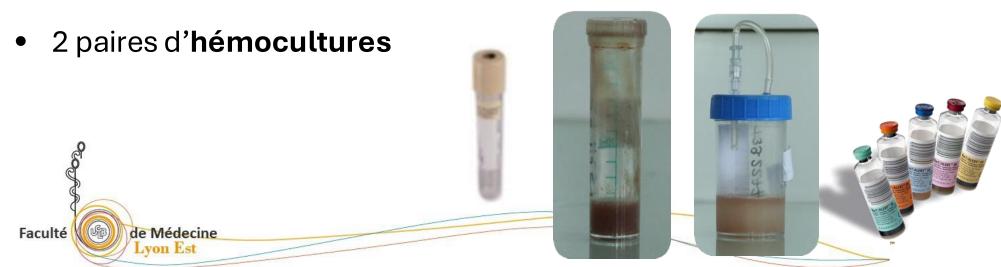
Contexte clinique :

Juan-Carlos, retraité de 70 ans, fumeur à 55 paquets-année, revient d'Ibiza où il a passé 4 semaines de vacances. Il est fébrile à 39°C, tousse fortement et est très dyspnéique. Admis aux urgences, la radio pulmonaire met en évidence une pneumonie lobaire inférieure gauche. Comme son état pulmonaire se dégrade, il est transféré en réanimation où il est mis sous ventilation mécanique.

Comment identifier la bactérie responsable de cette pneumonie?

Quels prélèvements à réaliser?

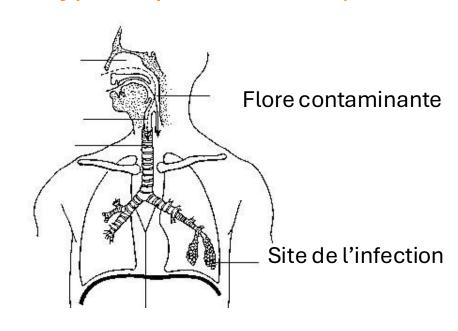
- 2 bactéries suspectées
 - Streptococcus pneumoniae: 1ère étiologie PAC (Pneumonie Aiguë Communautaire),
 70 ans, fièvre
 - Legionella pneumophila: 70 ans, tabagique, voyage, réanimation
- **Urines** : recherche d'antigènes urinaires légionelles et pneumocoques
- 1 prélèvement pulmonaire



Prélèvements pulmonaires

Objectifs:

 Certaines bactéries de la flore sont responsables de pneumonie ⇒ Interprétation en fonction du nombre de bactéries (seuil dépend du type de prélèvements)





Notion de seuil (bactériologie)

= distinguer colonisation / infection

		Seuil = (Leucocytes) + X bactéries /mL	Risque de contamination par flore commensale
✓	Expectoration	10 ⁷	
✓	Aspiration par sonde d'intubation – à l'aveugle	10 ⁵	Flore
\checkmark	LBA – sous fibroscopie	104	
✓	Mini LBA – à l'aveugle – double cathéter	10 ³	
✓	Prélèvement distal protégé (PDP) - Sous fibroscopie avec brosse ou cathéter	10 ³	Site de l'infection

Pas de seuil pour Legionella, Mycobacterium tuberculosis (pas de portage sain)

Pour Juan-Carlos





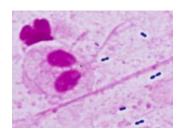
Jo: 1^{ers} résultats en moins de 2h

- Ag urinaires légionelles négatifs
- Ag urinaires pneumocoques positifs
 - ▲ Appel service clinique





Expectorations



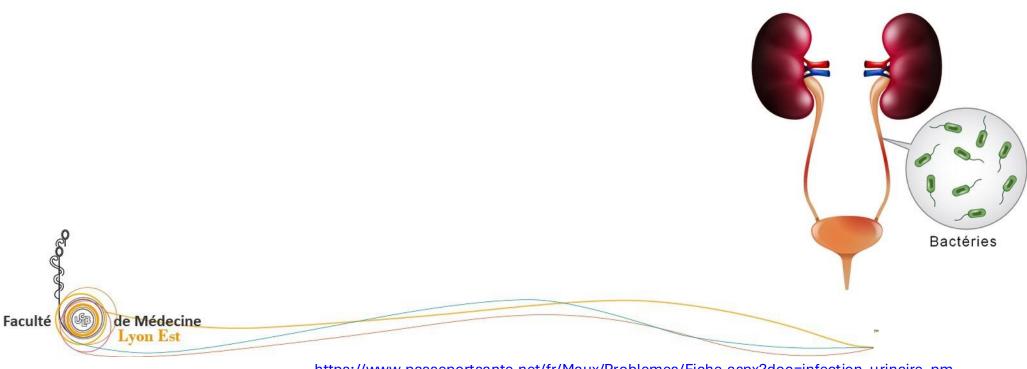
- Recueil: rinçage bucco-dentaire à l'eau, effort de toux (+/- kiné)
- J0: examen Direct
 - Coloration de Gram : Cocci à Gram positif, Bacilles à Gram négatif
 - Dénombrement de leucocytes / cellules épithéliales :
 - >25 leucocytes et <25 cellules épithéliales

Cellules épithéliales	Leucocytes	interprétation	culture
> 25	< 25	salivaire	non
> 25	> 25	douteux	oui
< 25	> 25	purulent	oui

- Résultats culture : 10⁷ bactéries par mL (seuil ≥10⁷/mL)
 - J1 Identification: Streptococcus pneumoniae, J2 antibiogramme

L'apprentissage par l'exemple

V- Diagnostic d'une infection urinaire

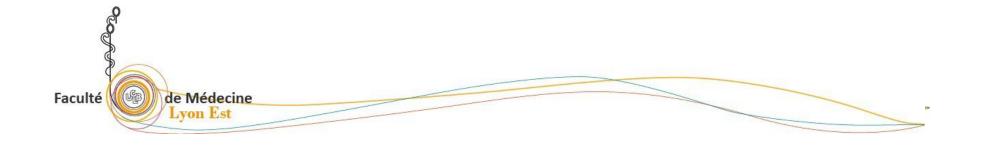


Diagnostic d'une infection urinaire

Contexte clinique:

Julie, 20 ans, a déjà fait plusieurs infections urinaires. Elle vient à votre cabinet décrivant un nouvel épisode de ce type, caractérisé par des brûlures mictionnelles et une pollakiurie.

Comment diagnostiquer au laboratoire cette infection urinaire?

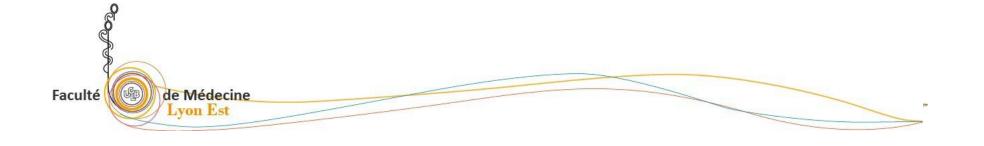


ECBU

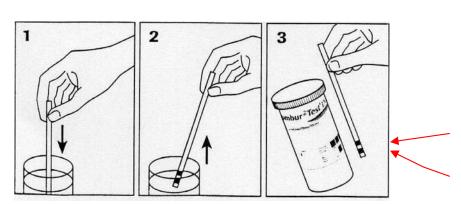
Examen Cyto-Bactériologique des Urines

Recueil des urines

- Avant traitement antibiotique
- Toilette du périnée : savon antiseptique, rinçage + séchage
- Urine de milieu de jet dans le poudrier stérile
- Transport au laboratoire rapidement à + 4°C ou dans tube avec conservateur (borate)



Bandelette urinaire (dans le service)



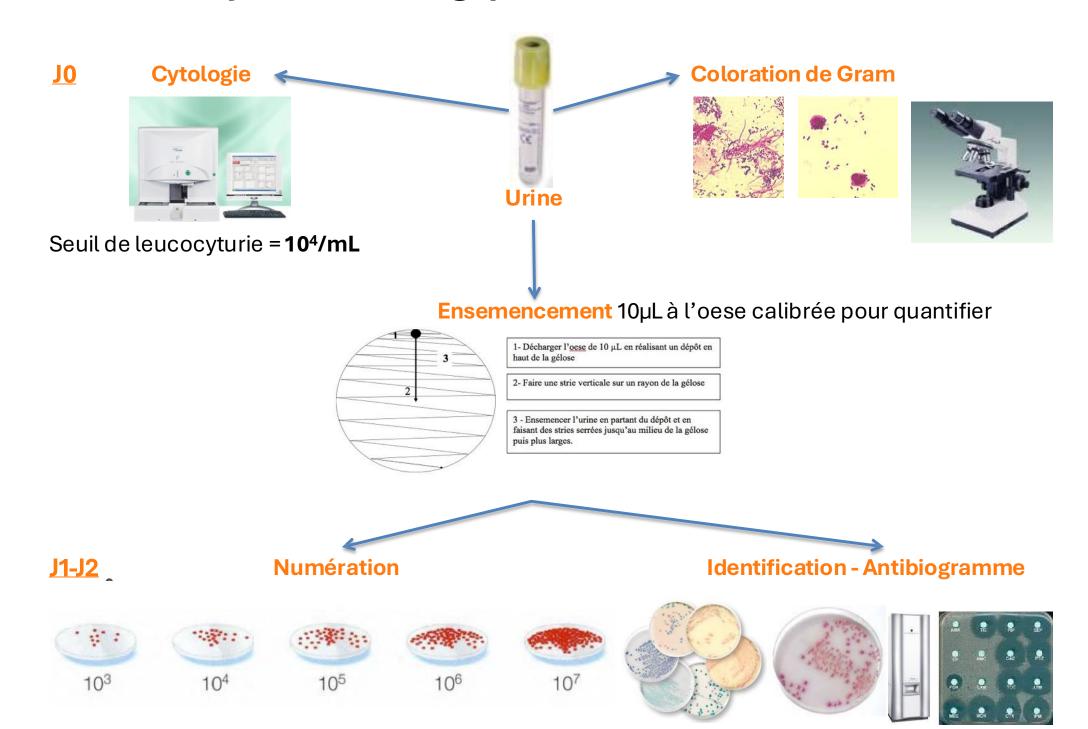


Leucocytes (leucocyte estérase)

Nitrites = entérobactéries

- Chez la femme symptomatique : bonne VPN (> 95%)
 - Faux positifs: contamination par flore vaginale, trichomonose
 - DONC si BU : rechercher en priorité une autre étiologie
- Chez l'homme symptomatique : bonne VPP (~90%)
 - BU+:
 - orientation diagnostique en faveur d'une IU
 - **ECBU** pour identification et antibiogramme
 - BU : ne permet pas d'exclure une IU DONC ECBU
- Pas si < 2 mois

Examen Cyto-Bactériologique des Urines = ECBU

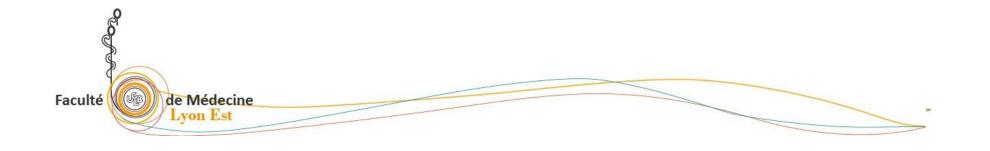


Interprétation d'une ECBU

• Seuil de **leucocyturie** : >10⁴/mL

• Seuils de bactériurie :

Espèces bactériennes	Seuil de significativité (UFC/ml)	
	Homme	Femme
E. coli, S. saprophyticus	≥ 10 ³	≥ 10 ³
Entérobactéries autres que <i>E. coli</i> , entérocoque, <i>C. urealyticum</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	≥10 ³	≥10 ⁴



Résultats pour Julie

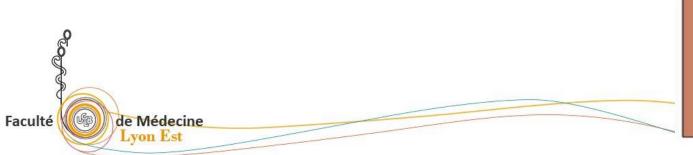
- Cystite récidivante
- J0 Bandelette urinaire : positive
- ECBU
 - J0:10⁵ leucocytes/mL
 - J1: 10⁶ UFC/mL Staphylococcus saprophyticus
 - J2:antibiogramme



L'apprentissage par l'exemple

VI- Diagnostic d'une diarrhée bactérienne



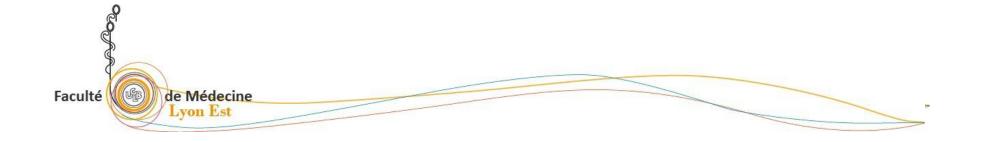


Diagnostic d'une diarrhée bactérienne

Contexte clinique:

Judith, 20 ans, est partie en Inde avec une association humanitaire. Contrairement aux conseils reçus, elle a mangé des pâtisseries, des légumes frais, n'a pas pelé les fruits qu'elle mangeait et bu de l'eau au robinet. Du coup, elle développe une diarrhée très importante glairo-sanglante. Pas d'autres cas dans l'entourage

 Comment identifier la bactérie potentiellement responsable de cette infection?



J0 premiers résultats au laboratoire

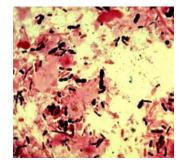
• Examen macroscopique des selles





PCR multiplex (bactério + Viro)

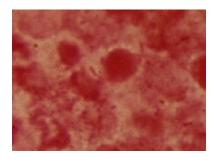
Examen microscopique des selles : flore, leucocytes et mucus ?
 orientation étiologie (non fait en routine)



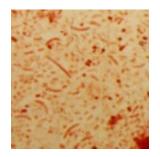
normal

de Médecine

Faculté (



Muco-sanglant



Liquide

APPROCHE MOLÉCULAIRE



https://www.bd.com/fr-fr/offerings/molecular-diagnostics/hais/bd-max



CLODIF PCR	*NEG
PCR CAMJC	*POS
PCR SALM	*NEG
PCR SHIG	*NEG
PCR COLI ETEC	*NEG
PCR COLI EHEC	*NEG
PCR PLHESI	*NEG
PCR VIBCPV	*NEG
PCR YERENT	*NEG
PCR ADV Selles	*NEG
PCR ASTRO	*NEG
PCR NORO	*NEG
PCR ROTA	*NEG
PCR SAPO	*POS

Exemple de PCR syndromique sur les selles sans lien avec le cas clinique proposé

ÉVALUER LES TECHNOLOGIES DE SANTE

RAPPORT D'ÉVALUATION

Intérêt des techniques d'amplifications des acides nucléiques (TAAN) multiplex dans la prise en charge médicale des infections gastro-intestinales

Au total, la HAS considère que l'identification d'agent infectieux par technique d'amplification des acides nucléiques (TAAN) présente un intérêt clinique pour les patients dans la prise en charge médicale des infections gastro-intestinales, que ce soit en ville ou à l'hôpital.

Les modalités de prise en charge des IGI par TAAN multiplex (indications et types de panels à utiliser) sont présentées dans l'algorithme décisionnel (cf. Figure 2).

Résultats à 24H00 et 48H00

- Culture des selles 11
 - Rechercher une aiguille dans une botte de foin!
 - d'où isolement sur milieux sélectifs
 - Identification Maldi Tof





- Clostridium difficile

de Médecine

Faculté (





Campylobacter





JE RETIENS:



Multiples outils pour le diagnostic bactériologique

Je dois retenir :

- Les méthodes de diagnostic pour les principales maladies infectieuses bactériennes
- Les délais moyens d'obtention des résultats (J0, J1, J2).
- L'importance du dialogue clinico-bactériologique

MOTS EN ANGLAIS

- stool examination and culture
- mucus, blood pus in the stool
- bacteraemia
- blood culture
- meningitis
- lumbar puncture
- spinal fluid
- STI: sexually transmitted disease



Contacts si questions

- sophie.jarraud@univ-lyon1.fr
- anne.tristan@univ-lyon1.fr

