

Principes de base des analyses de laboratoire

Dr Louise Poirier
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
Université de Montréal
21 octobre 2006

Le laboratoire de microbiologie

Gram
Ensemencement

Parasitologie

Bactériologie

Biologie
moléculaire

Sérologie
Virologie

Mycobactériologie



Cette présentation a été effectuée le 23 octobre 2006, au cours du Symposium "L'utilisation des analyses de laboratoire en santé publique" dans le cadre des Journées annuelles de santé publique (JASP) 2006. L'ensemble des présentations est disponible sur le site Web des JASP, à l'adresse <http://www.inspq.qc.ca/jasp>.

Principes de base des analyses de laboratoire

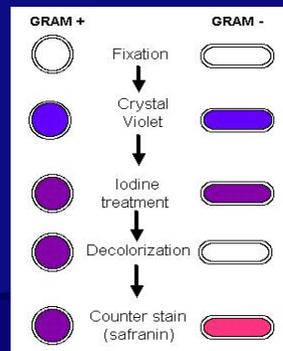
- Bactériologie
- Mycobactériologie
- Biologie moléculaire
- Épreuves sérologiques
- Parasitologie

Gram:

Coloration découverte en 1884.
Utilisé très fréquemment en microbiologie.
Résultat en +/- 20 minutes.



Hans Christian Gram
Bactériologiste danois
1853-1928



Gram:

Peut apporter des renseignements utiles :

Méningite bactérienne



Infections invasives à Streptocoque du groupe A



These large, dark, bull-like blisters are a diagnostic symptom of necrotizing fasciitis (also known as flesh-eating disease).



Gram

Avantage:

- non spécifique: toutes les bactéries présentes en quantité suffisante sont vues.

Désavantage:

- oriente mais est rarement diagnostique.
- faible sensibilité par rapport à la culture.

Gram des sécrétions pulmonaires d'un patient décédé d'une pneumonie nécrosante.



Bactériologie

Plusieurs pathogènes bactériens nécessitent un milieu de transport pour être détectés de façon optimale.

Le délai maximal entre le prélèvement et le traitement de l'échantillon doit être respecté.

Les protocoles de laboratoire sont conçus pour détecter les pathogènes usuels.

Il peut exister des divergences entre les laboratoires.

Exemple: Recherche de pathogènes dans les selles à HMR

Organismes recherchés sur toutes les selles:

Shigella sp.

Salmonella sp.

Yersinia sp.

E. coli O157

Sur les selles non formées seulement:

Campylobacter sp.

Sur demande seulement:

Vibrio sp.

Recherche de *C. difficile*

Pas de culture → recherche de toxine.

Sur demande seulement.

Fait seulement sur les selles non formées.

Exemple: sécrétions urétrales



Sécrétions urétrales dans le milieu de transport pour
TAAN *C. trachomatis* (et *N. gonorrhoeae*)



Écouvillon dans un milieu avec charbon pour la culture de
N. gonorrhoeae



(Écouvillon dans un milieu sans charbon pour la coloration
de Gram pour *N. gonorrhoeae*)

Gram



Culture pour *N. gonorrhoeae*



Gélose chocolat



Épreuves de sensibilité

Mycobactériologie

Ziehl ou Auramine (les mycobactéries ne se colorent pas au Gram)

Colore la paroi de toutes les mycobactéries

Ziehl

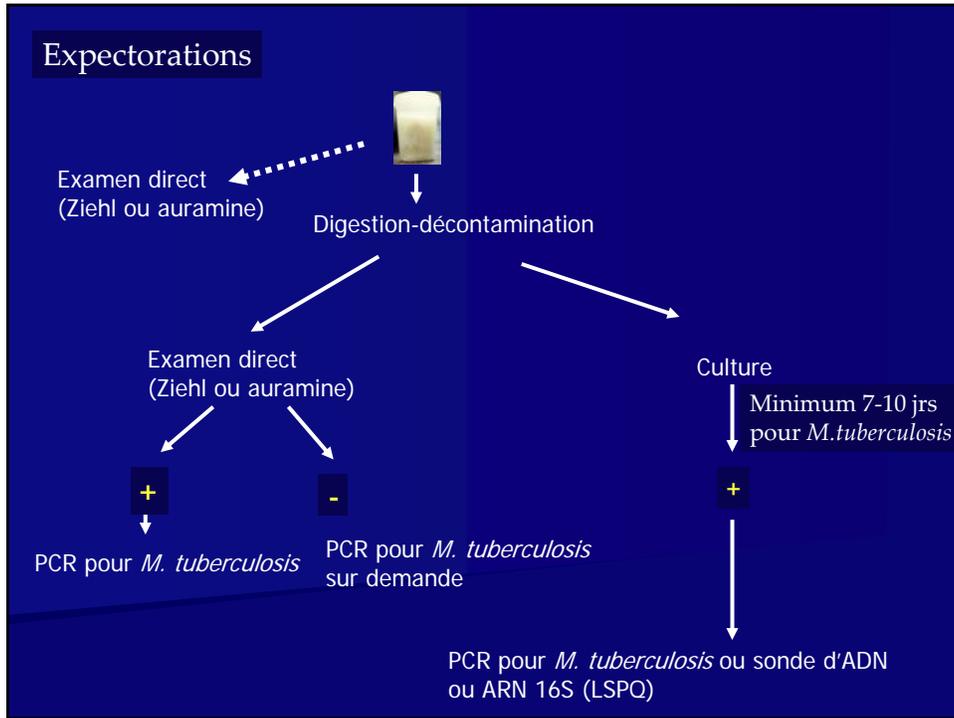
Auramine

Coloration à la safranine

Fluorescence



Détection plus facile (plus faible grossissement)
Moins spécifique si non expérimenté



Biologie moléculaire

Techniques d'amplification des acides nucléiques (TAAN)

Utiles pour les pathogènes difficilement cultivables ou dont la croissance est lente.

Utiles pour les pathogènes qui survivent mal aux conditions externes.

Plus rapide que la culture, mais l'obtention du résultat dépend de la fréquence de l'analyse.

PCR ou « Polymerase chain reaction » (amplification génique par la polymérase)

Code génétique: ADN



PCR

A C G G C A T C T G T C T C A C T A G A T C G C A T
T G C C G T A G A C A G A G T G A T C T A G C G T A

M. tuberculosis

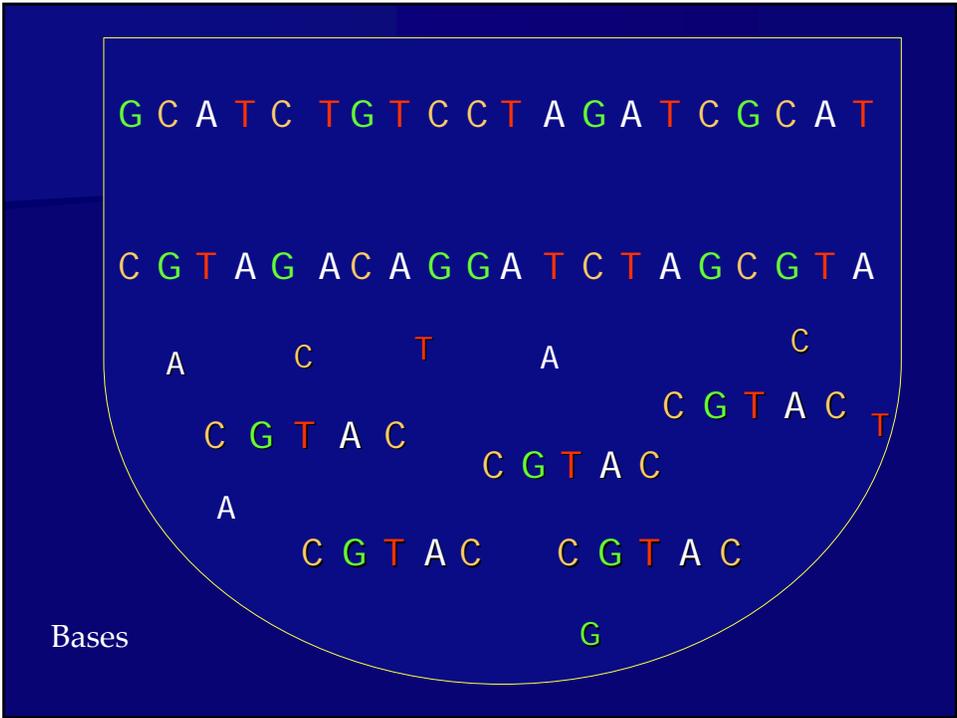
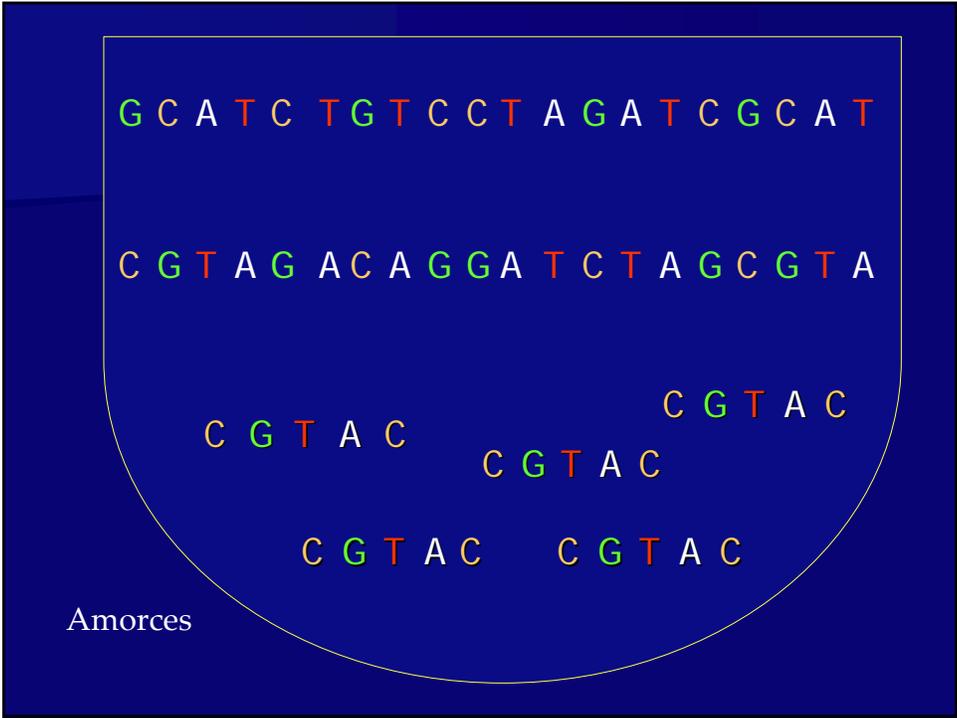
C A T C T G T C C T A G A T C G C
G T A G A C A G G A T C T A G C C

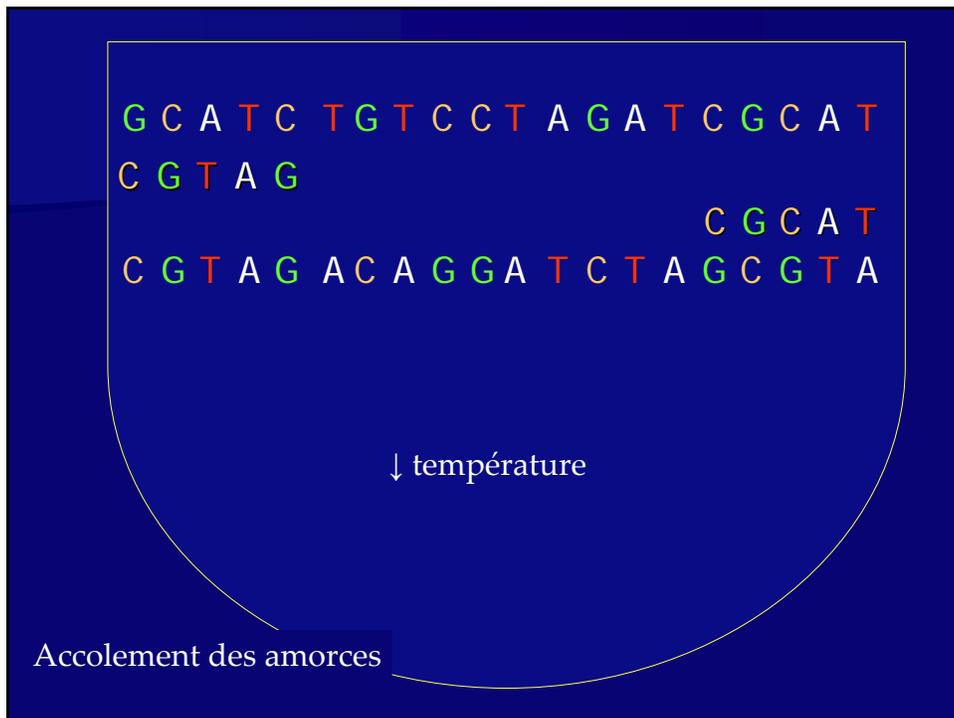
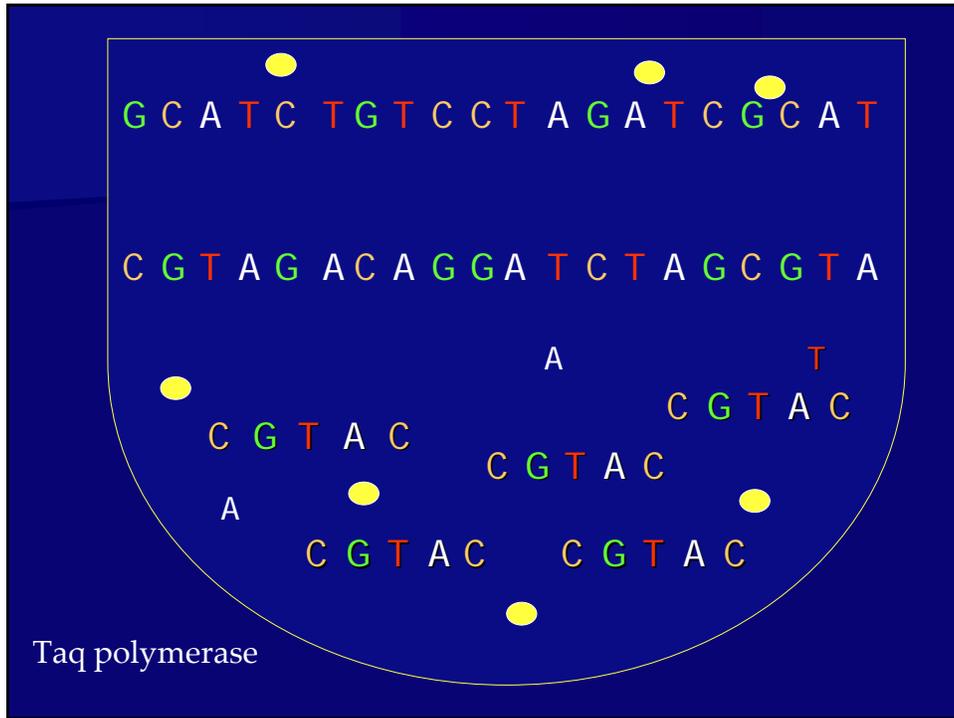
C A T C T G T C C T A G A T C G C
G T A G A C A G G A T C T A G C G

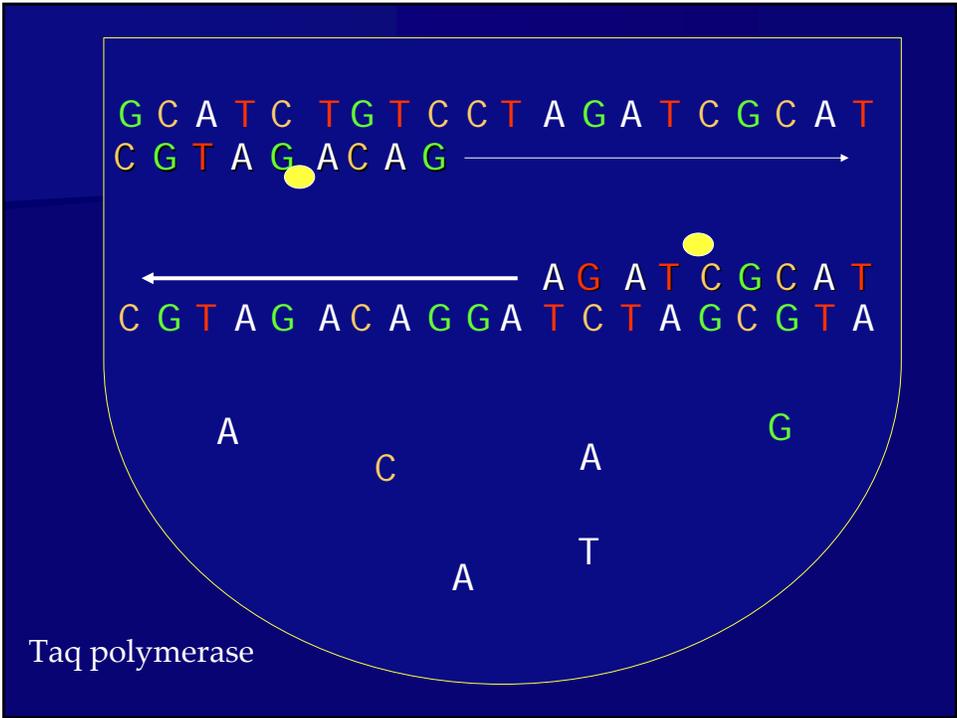
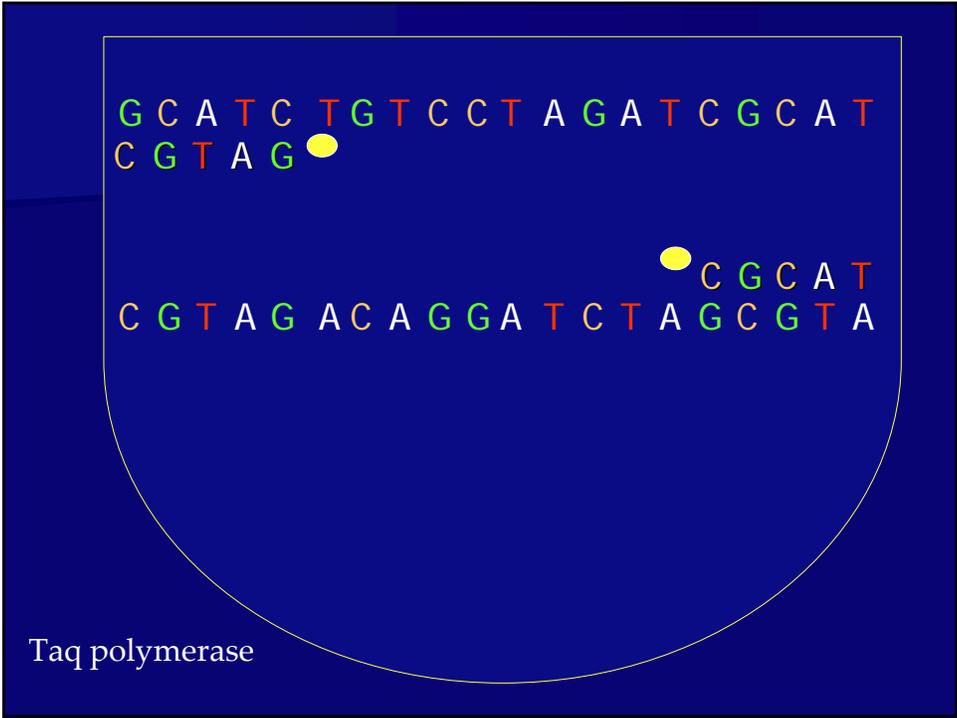
↑ température

C A T C T G T C C T A G A T C G C

G T A G A C A G G A T C T A G C G







CATCTGTCCTAGATCGC
GTAGACAGGATCTAGCG

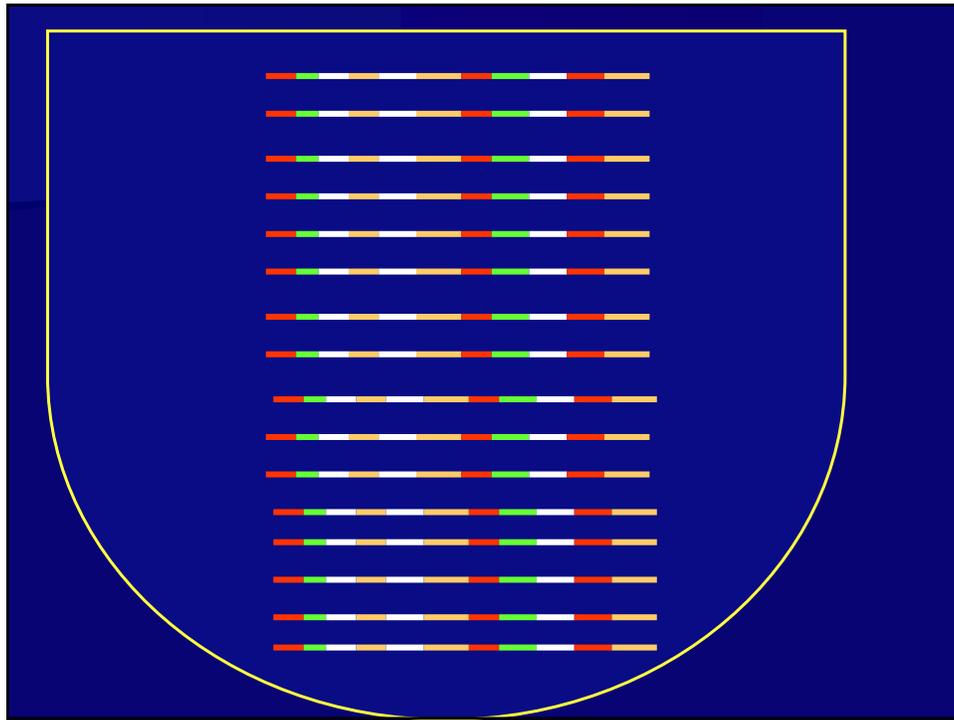
CATCTGTCCTAGATCGC
GTAGACAGGATCTAGCG

CATCTGTCCTAGATCGC
GTAGACAGGATCTAGCG

CATCTGTCCTAGATCGC
GTAGACAGGATCTAGCG

CATCTGTCCTAGATCGC
GTAGACAGGATCTAGCG

CATCTGTCCTAGATCGC
GTAGACAGGATCTAGCG



M. tuberculosis

	Respiratoire Ex. direct +	Respiratoire Ex. direct -
Sensibilité	> 95%	+/- 75 %
Spécificité	> 95%	> 95%

N. gonorrhoeae:

La spécificité de la PCR (Amplicor™– Roche) est sous-optimale, ce qui affecte les résultats dans une population de faible prévalence (faux positifs) et oblige à un test de confirmation.

La technique n'est pas approuvée pour les spécimens ano-rectaux et pharyngés.

La sensibilité des TAAN par rapport aux méthodes « conventionnelles » varie selon les pathogènes.

<i>Chlamydia trachomatis</i>	PCR > autres méthodes
<i>Bordetella pertussis</i> (coqueluche)	PCR > culture
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PCR < culture
SARM	PCR = Culture ?

Épreuves sérologiques

Épreuves sérologiques:

Détection d'anticorps

Indications

1. Diagnostic d'une maladie aigue

Utiles pour les microorganismes pour lesquelles la détection est impossible ou très complexe.

2. Statut immunitaire

Épreuves sérologiques:

Détection d'anticorps

EIA (Enzyme Immuno Assay)

Recherche d'IgM contre l'hépatite A

1.  fixé au fond d'un puits



2. + sérum du patient



3. + anticorps anti IgM couplé à un marqueur colorimétrique





Intensité de la couleur = densité optique (D.O.) = chiffre

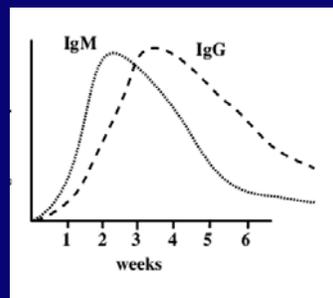
Seuil de positivité pré-déterminé pour chaque analyse.

Détection d'anticorps

Cinétique

IgM apparaissent en 3 à 5 jours et persistent 4 - 6 mois

IgG apparaissent quelques jours plus tard et sont détectables à vie.



Détection d'anticorps

Ceci doit être modulé en fonction du microorganisme en cause et de la technique utilisée.

Exemples:

Toxoplasmose: IgM peuvent persister jusqu'à 1 an

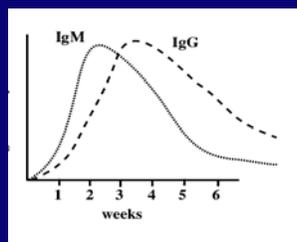
Anti HBs peuvent diminuer sous le seuil de détection après plusieurs années.

Détection d'anticorps

L'apparition des anticorps en fonction des symptômes est variable.

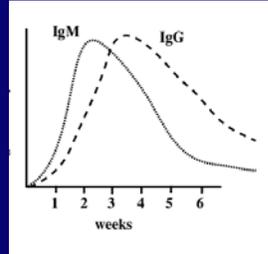
Exemple:

Parvovirus B19



Éruption

Rubéole



Éruption

Pour diagnostiquer une maladie aigue:

- Détection des IgM
- Séconversion:

CMV	11 janvier IgG négatif	→	6 février IgG positif
-----	---------------------------	---	--------------------------

Exemples de pathogènes pour lesquelles la détection des IgM sont disponibles:

Hépatite A
Hépatite B
Oreillons
Rougeole
Rubéole
Parvovirus B19
Cytomégalovirus
EBV
Toxoplasmose
Virus du Nil occidental

Détection d'anticorps

Pour diagnostiquer une maladie aigue:

Parfois la mesure des anticorps totaux sur un seul sérum est suffisant.

Exemple:

Lymphogranulome vénérien (LGV)

Causé par des sérotypes différents (vs urétrite et cervicite) de *Chlamydia trachomatis*.

Mesure des anticorps ne différentie pas entre les sérotypes causant un LGV et les autres sérotypes de *C. trachomatis*.

Cependant taux d'anticorps plus élevé dans le cas d'un LGV (maladie invasive)

Détection d'anticorps

- Toujours préciser sur la requête le pathogène recherché et l'objectif de l'analyse: infection aigue vs statut immunitaire.

Ex.: Demande de sérologie d'hépatite A sans autre précision.

- La détection du pathogène est en général préférable à la détection d'anticorps.

Ex. Influenza

Parasites intestinaux à déclaration obligatoire

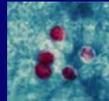
Giardia lamblia



Cyclospora cayetanensis



Cryptosporidium parvum



Cryptosporidium parvum: nécessite une coloration spéciale.
(Kinyoun)

Lorsqu'un pathogène précis est recherché, l'indiquer sur la requête, avec le contexte clinique et/ou épidémiologique.

