

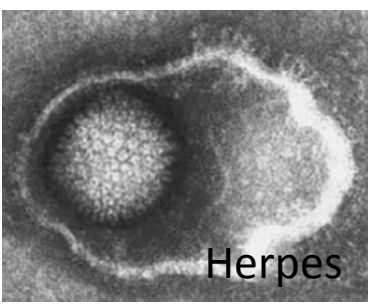


Microbiologie diagnostique

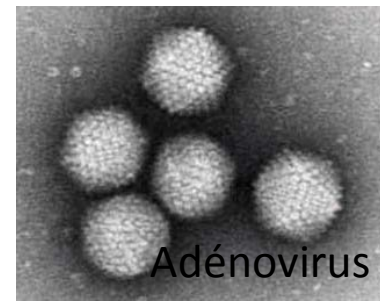
Laboratoire de Microbiologie pédiatrique
CHU Sainte-Justine

 **CHU Sainte-Justine**
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

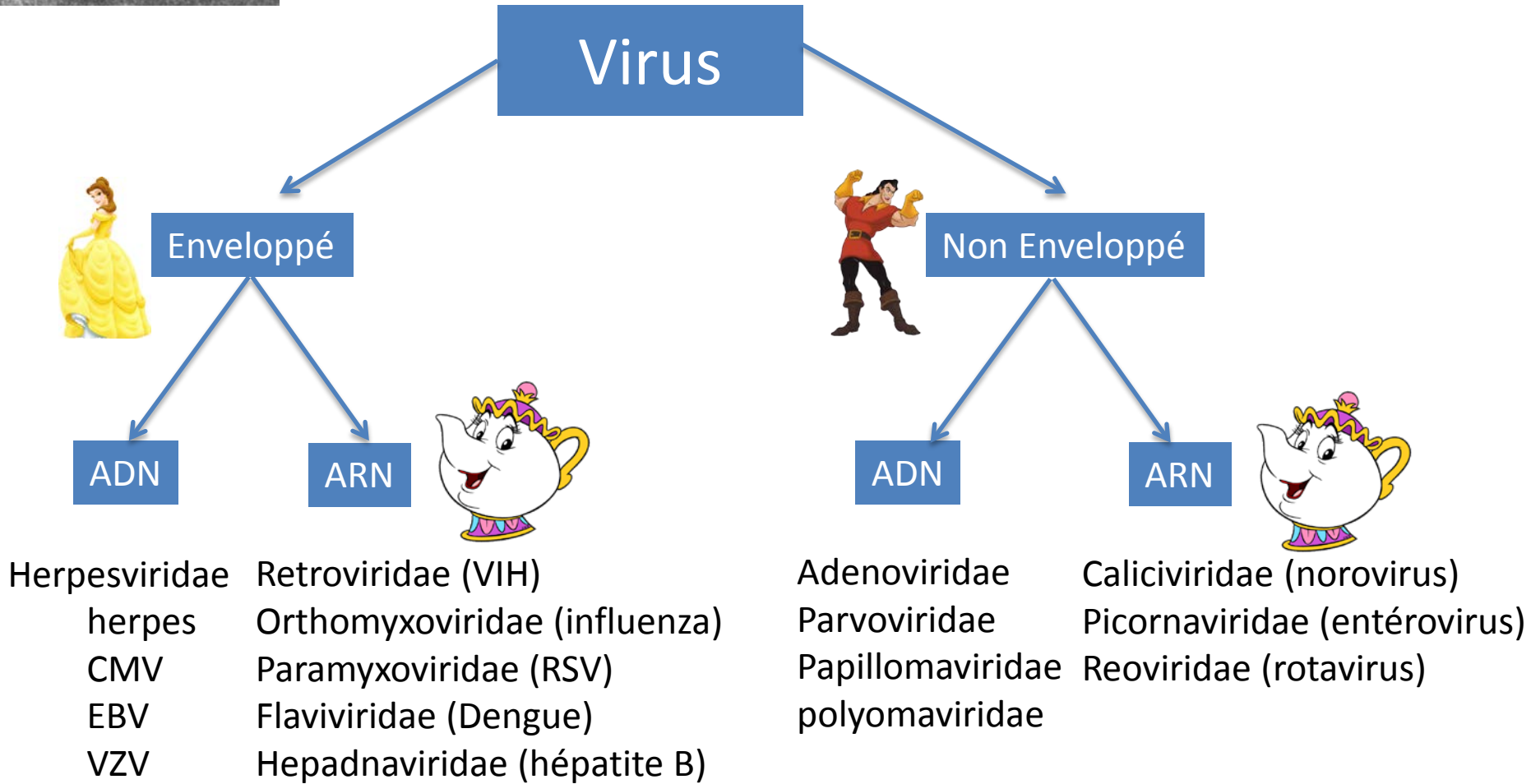
Université 
de Montréal



Herpes



Adénovirus



Bactéries aérobiques

Gram +

Cocci

Chainette

- Streptocoque α
 - pneumoniae
 - viridans
- Streptocoque β
 - groupe A, B, C, G
- Streptocoque γ
 - enterocoque

Amas

- Staphylocoque
 - aureus
 - coagulase negative

Batonnet

Sporulé

- Bacillus sp.
- Embranché**
- Propionibacterium
- Nocardia
- Diphthéroïde**
- Corynebacterium sp
- Régulier**
- listeria sp

Gram -

Cocci

Diplocoque

- Moraxella
- Neisseria sp
- Gonorrhée
- Meningocoque

Batonnet

Coccobacille

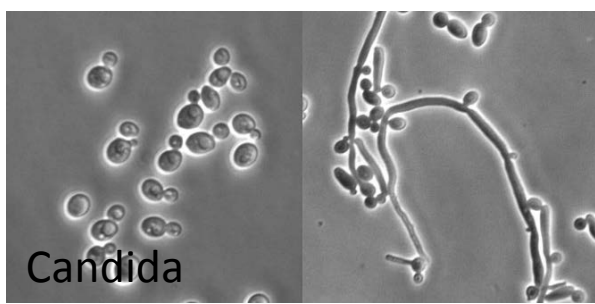
- Haemophilus
- HACEK

Fermenteur

- Entérobactérie
- Pasteurella
- Eikenella

Non Fermenteur

- Pseudomonas
- Stenotrophomonas
- Acinetobacter
- Burkholderia



Candida

Champignons

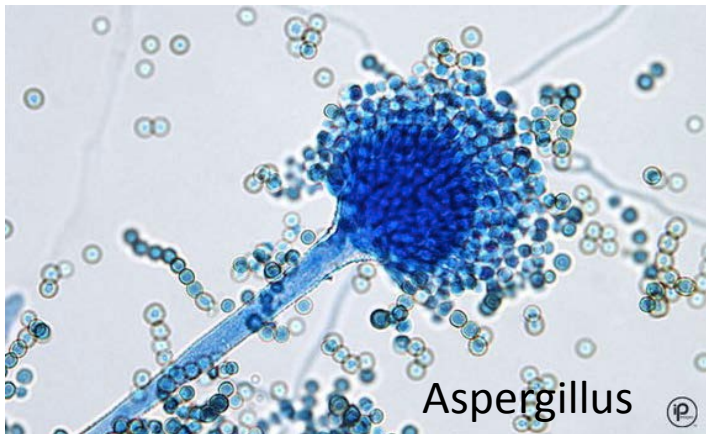
Levures

Candida
Cryptococcus
malassezia

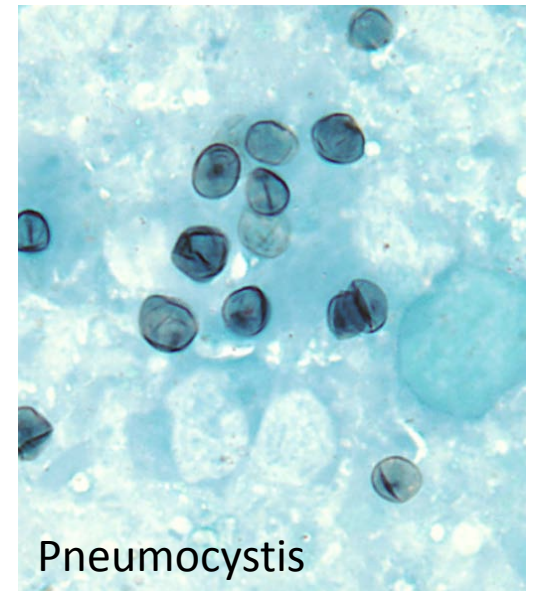
Filamenteux

Phaeohyphomyces
Hyalohyphomyces
Aspergillus
Penicillium
Zygomycetes
Rhizopus
Rhizomucor
Mucor

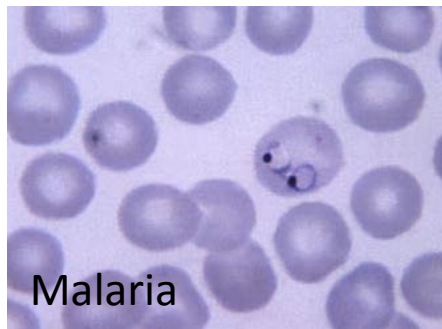
Pneumocystis



Aspergillus



Pneumocystis



Malaria

Parasites



Ascaris

Unicellulaire

Sanguin/tissulaire

Plasmodium

Toxoplasmosis

Trypanosoma

Digestif

Entamoeba

Giardia

Cryptosporidium

Dientamoeba

Cestode (ver plat)

Sanguin/tissulaire

Schistosoma

Douve

Echinococcus

Digestif

Taenia

Dyphyllobotrium



Taenia

Nématode (ver rond)

Sanguin/tissulaire

Filaire

Loaloa

trichuris

Toxocara

Digestif

Ascaris

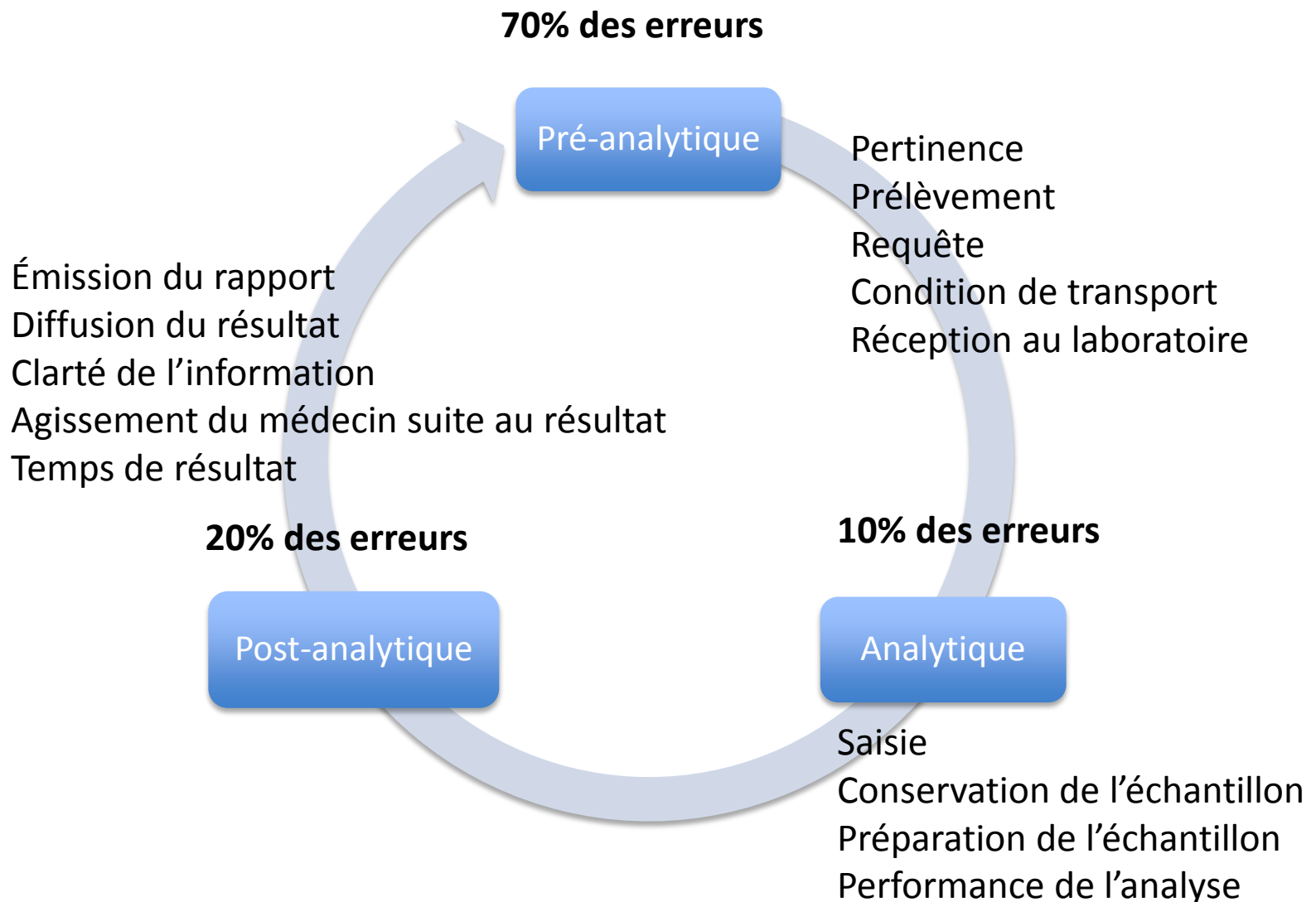
Strongyloides

Enterobius (oxyure)

Flores bactériennes

Respiratoire	Cutané	Digestive	Vaginale
<i>Pathogène possible</i>	<i>Pathogène possible</i>	<i>Pathogène possible</i>	<i>Pathogène possible</i>
Haemophilus influenzae Streptococcus pyogenes Streptococcus pneumoniae Moraxella catarrhalis Staphylococcus aureus Neisseria meningitidis	Streptococcus pyogenes Staphylococcus aureus	Entérobactérie Entérocoque Bacteroides fragilis Clostridium difficile	Streptocoque pyogenes Streptocoque agalactiae Staphylococcus aureus Listeria Neisseria gonorrhoe Chlamydia trachomatis
<i>Commensal probable</i>	<i>Commensal probable</i>	<i>Commensal probable</i>	<i>Commensal probable</i>
Streptococcus viridans Neisseria sp Haemophilus sp	Staphylococcus coag neg Corynebacterium Propionibacterium Actinomyces Bacillus sp	Anaérobies autres	Streptococcus viridans Neisseria sp Lactobacillus Anaérobies autres
Nosocomiale			
Enterobactérie multiR ERV-SARM Clostridium difficile Non fermenteur			

Le cycle diagnostic



Tout commence par un BON prélèvement!

							
Milieu transport	Amies	UTM	LIM	TSB Salt	Cobas PCR Media	Aucun	Aucun
Utilisation	Analyses de Bactériologie	Analyses de Virologie	Dépistage de Streptocoque du groupe B chez les femmes enceintes	Dépistage de SARM / <i>Staphylococcus aureus</i>	Prélèvement cervical ou vaginal pour PCR <i>C. trachomatis</i> / <i>N. gonorrhoeae</i>	Prélèvement naso-pharyngé, conjonctival, salivaire ou urétral. À déposer dans milieu UTM (rose) ou Amies selon l'analyse demandée	Virologie seulement (prélèvement de gorge ou cutané), à déposer dans milieu UTM (rose)
GRM	50025909	50011636	50012284	50012753	50019521	50011779	5008011

- Tous ces écouvillons sont sécables et doivent donc être cassés puis laissés dans les tubes. Attention de ne pas toucher la partie inférieure au trait de cassure.
- Pour plus d'informations, référez-vous au répertoire des analyses du CHU Sainte-Justine au <http://www.chusj.org/fr/Labotest/Accueil/Analyses>

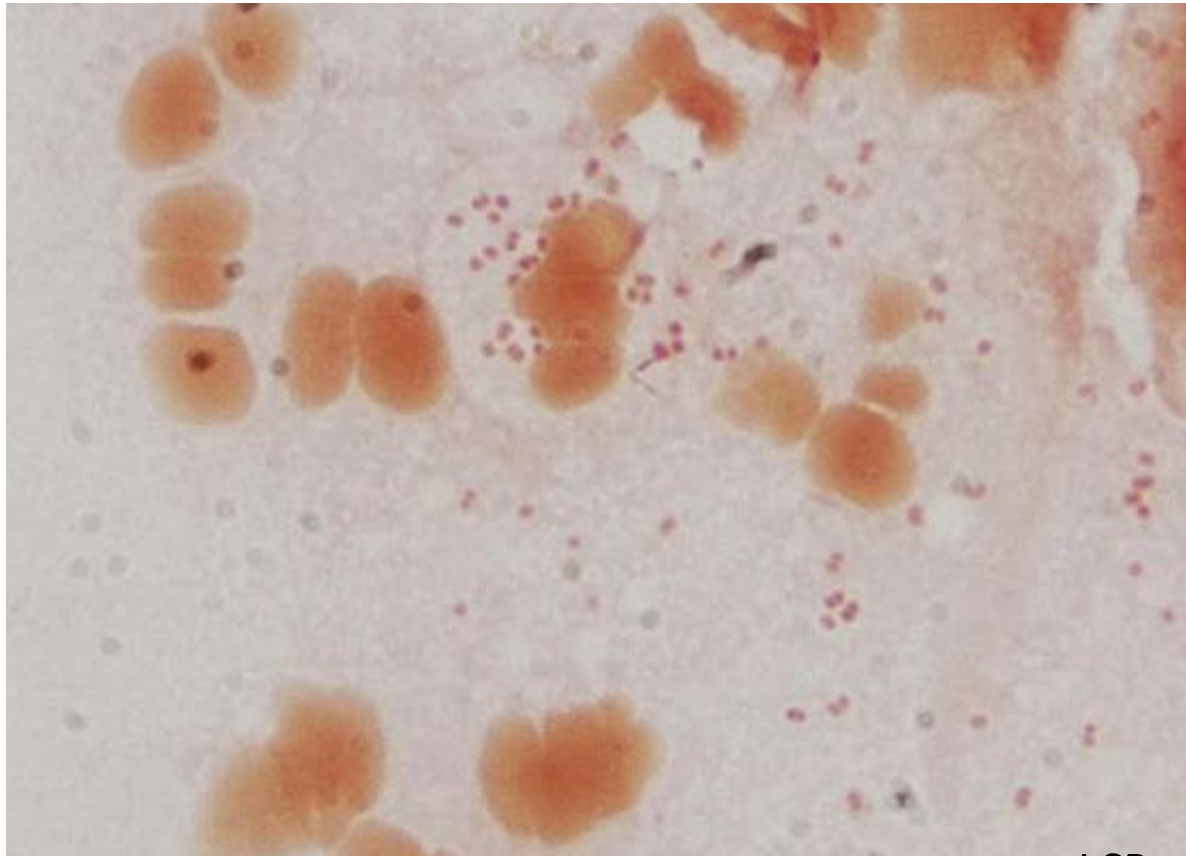
Bactériologie

Laboratoire de Microbiologie pédiatrique
CHU Sainte-Justine

Bactériologie

- Colorations
 - Gram
 - Calcofluor (KOH)
 - Ziehl/auramine
 - Giemsa
- Cultures
 - Géloses nutritives
 - Géloses sélectives
- Identification
 - Tests biochimiques
 - Maldi Tof
 - Séquençage (PCR 16S)
- Antibiogramme
 - Diffusion en disque
 - Diffusion en gradient
 - Dilution en agar
 - Dilution en bouillon

Coloration de Gram



LCR

Toute interprétation d'une culture débute par une compréhension de la coloration de Gram

- La bactérie retrouvée en culture a-t-elle été vue au Gram?
- Présence de cellules épithéliales vs polymorphonucléaires?
- Quelle est la qualité de l'échantillon prélevé?

Milieux de cultures



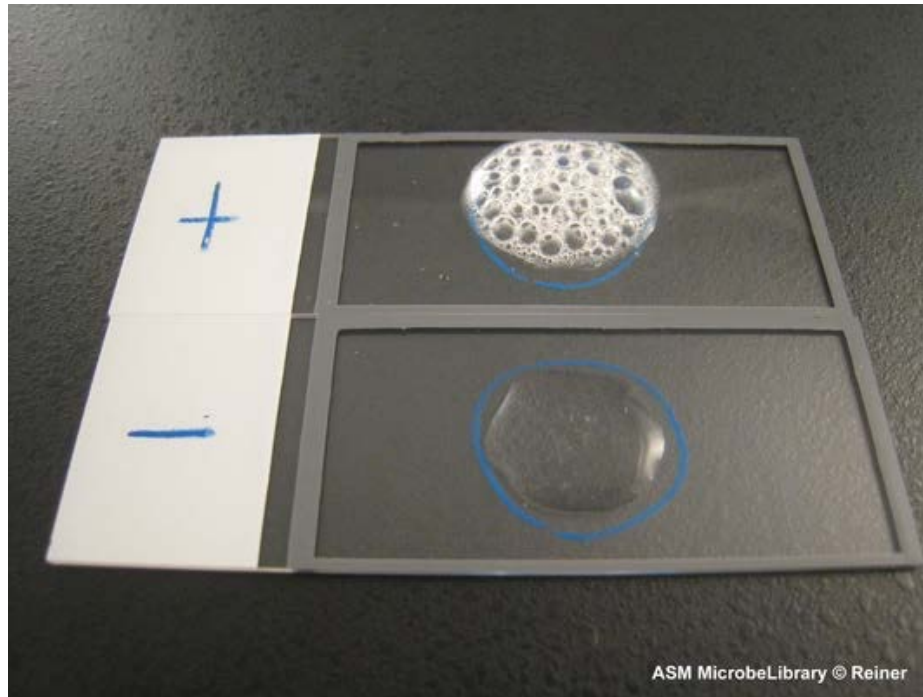
Beta hémolyse sur gélose sang

Les différentes géloses permettent de reconnaître certains critères d'identification

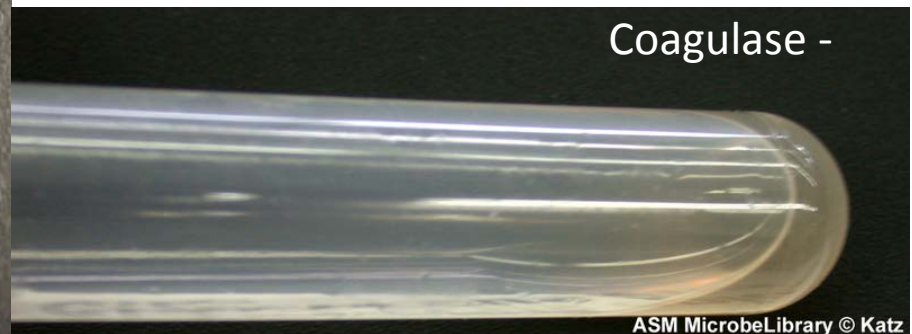
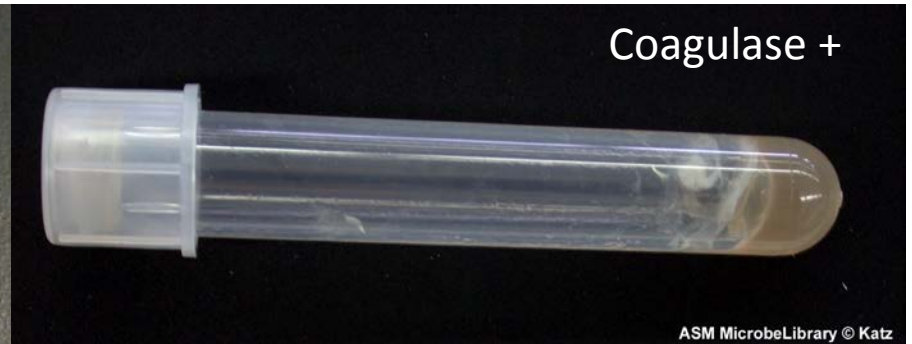
Ex. Hémolyse sur la gélose sang

Ex. fermentation du lactose sur gélose MacConkey (lactose +)

Tests biochimiques



Catalase



Coagulase

Des tests biochimiques de base permettent parfois une identification préliminaire ou finale

Ex. Cocci + Catalase + Coagulase + = *Staphylococcus aureus*

Ex. BGN Lactose + Indole + aspect sec = *Escherichia coli*

Méthodes d'antibiogramme

- Méthodes de test de sensibilité aux ATB:
 - Détection de bêta-lactamases (*Haemophilus/Moraxella*)
 - Diffusion en disques (Kirby-Bauer = KB) (*pneumocoque*)
 - Dilution en gélose (*SARM*)
 - Dilution en milieu liquide
 - Vitek (automatisé) (*entérobactérie, staphylocoque*)
 - Sensititre (automatisé) (*pseudomonas, acinetobacter*)
 - Diffusion en gradient (E-test) (*hémoculture, LCR, ESBL, AMPc*)
 - Moléculaire (*SARM, ERV*)

Culture virale

Laboratoire de Virologie

CHU Sainte-Justine



CHU Sainte-Justine
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

Université 
de Montréal

Transport et entreposage

- Les virus enveloppes sont extrêmement labiles (ex. VIH, RSV, parainfluenza, HPMV, influenza...) et le RSV semble particulièrement plus labile que les autres virus
- Temperature froide (4C) et un pH neutre (medium de transport) avec proteines, antibiotiques et anti-fongiques, indicateur de pH
- Demeurent stable entre 1 et 3 jours dans ces conditions
- HSV est enveloppé mais peut survivre jusqu'à 4 heures sur le plastique
- Les virus enveloppes (ex. HSV) vont diminuer leur nombre a chaque cycle de gel-degel alors que les virus non-enveloppes (ex. Enterovirus et adenovirus) ne vont pas diminuer leur nombre apres un cycle de gel-degel
- Entreposage pour moins de 30 jours de culture virale doit se faire à 4C



Milieu UTM (universal transport media)

UTM-RT MEDIUM FORMULATION

Hank's Balanced Salts (Stabilisateur, pH, ions)

Bovine Serum Albumin (Nutritif)

L-Cysteine (Nutritif)

Gelatin (Nutritif)

Sucrose (Cryoprotecteur)

L-Glutamic Acid (Nutritif)

HEPES Buffer (Stabilisateur)

Vancomycin (antibiotique)

Amphotericin B (antibiotique)

Colistin (antibiotique)

Phenol Red (indicateur de pH)

pH 7.3 +/- 0.2 @ 25°C



Salle de culture cellulaire



Les échantillons sontensemencés sur des lignées cellulaires spécifiques

“Roller Drum”



Les tubes sont incubés dans des incubateurs à l'aide de rouleaux à tambour pour accélérer la croissance

Laboratoire de Virologie

CHU Sainte-Justine



CHU Sainte-Justine
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

Université 
de Montréal

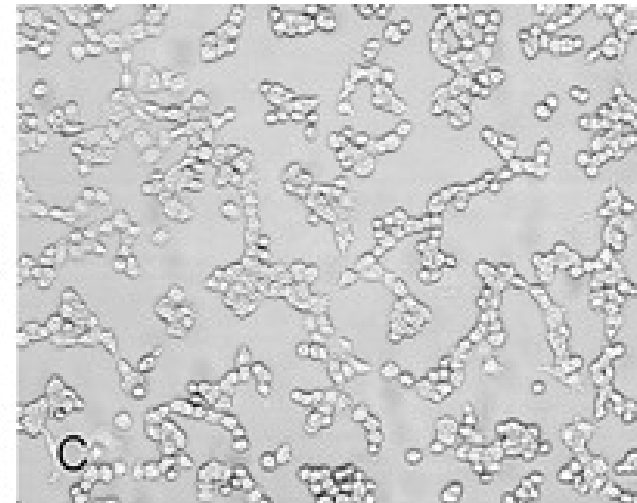
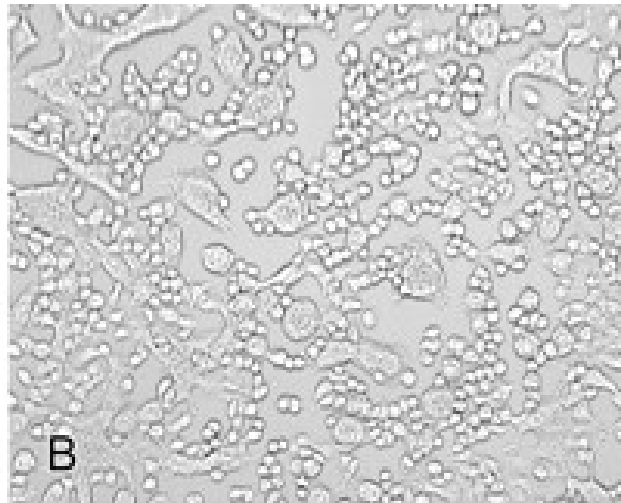
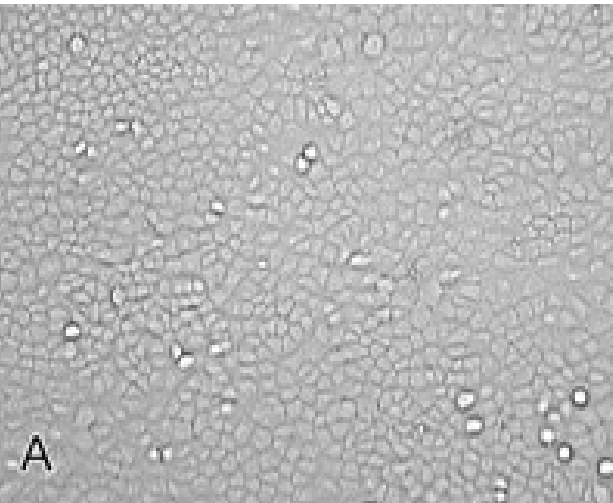
Culture virale

- Chaque virus aura un Effet Cytopathique (ECP) spécifique
- Certaines lignées cellulaires permettront la croissance de virus spécifiques alors que d'autres permettront la croissance de plusieurs virus
- En présence d'un ECP, l'identification du virus sera confirmée par une technique d'immunofluorescence spécifique au virus suspecté
- Les tubes sont gardés pour 10-14 jours, parfois 21 jours pour CMV





A549



HSV-2

Adénovirus

Laboratoire de Virologie

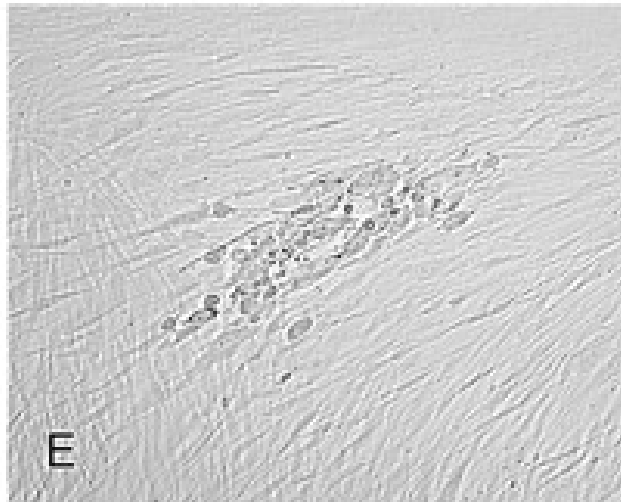
CHU Sainte-Justine



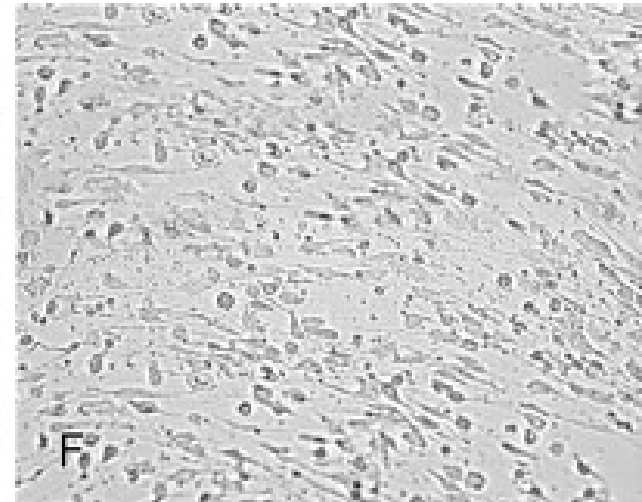
CHU Sainte-Justine
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

Université 
de Montréal

Fibroblastes MRC-5



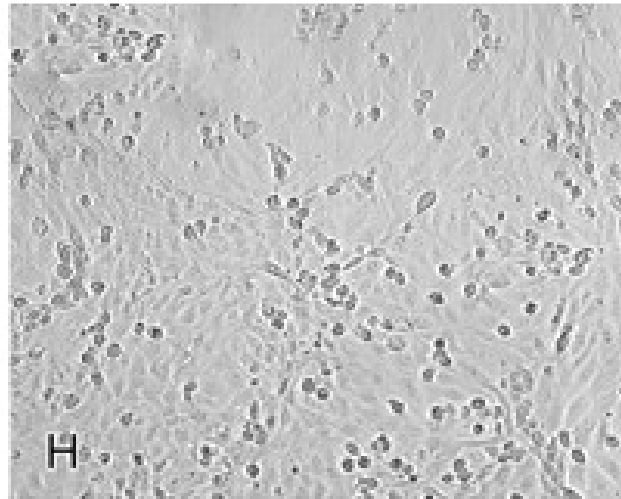
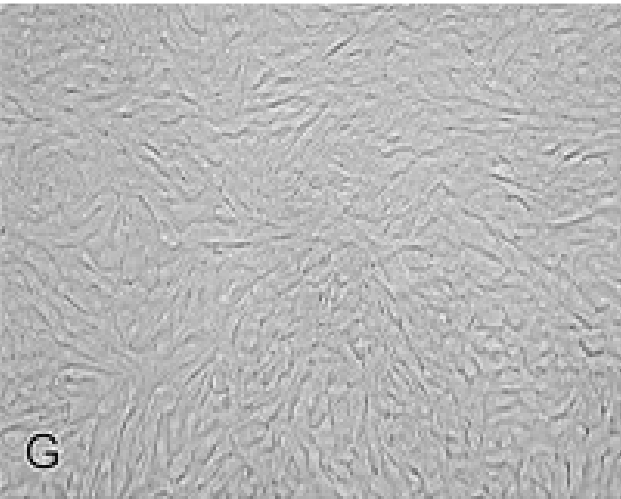
CMV



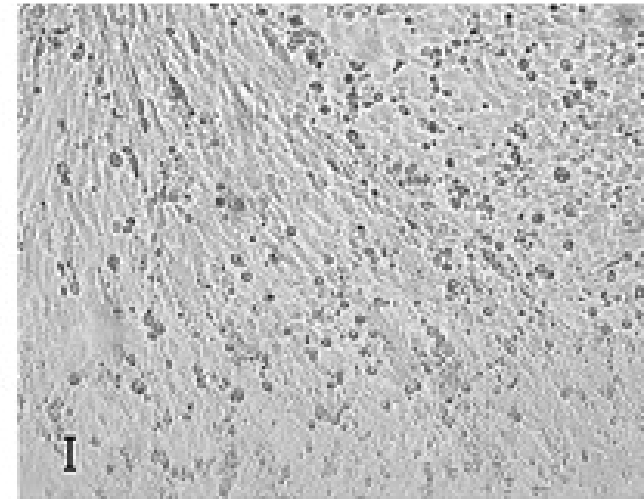
Rhinovirus



Rein de singe Rhesus



Enterovirus



Influenza A



Résumé culture virale

- Utile pour monitorer la sensibilité et spécificité des tests antigéniques et de biologie moléculaire
- Les méthodes de cultures rapides sont sensibles et très utiles
- La culture en tube traditionnelle devrait être utilisée pour les patients plus immunosupprimés afin de dépister une vaste gamme de virus et de reconnaître la présence de virus vivants
- Conserver les souches de patients immunosupprimés pour évaluer la sensibilité aux antiviraux
- Culture cellulaire est utile pour les premières et les dernières souches d'influenza de la saison



Les tests antigéniques

Laboratoire de Virologie

CHU Sainte-Justine



CHU Sainte-Justine
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

Université 
de Montréal

Virus Entériques

- Pour les virus entériques, ils constituent la seule option valable en plus du PCR
- EIA adenovirus sur selle est nettement plus sensible que la culture mais attention aux faux positifs (surtout décrit dans les NICU)
- EIA rotavirus a une excellente sensibilité clinique alors que le PCR rotavirus a une excellente sensibilité analytique mais serait peut-être trop sensible au point de vue clinique
- En raison de la baisse de prévalence, la spécificité du EIA rotavirus est appelée à diminuer beaucoup
- EIA norovirus ont tous une faible sensibilité entre 60-70% en comparaison avec le PCR, serait plus utile pour investiguer une éclosion



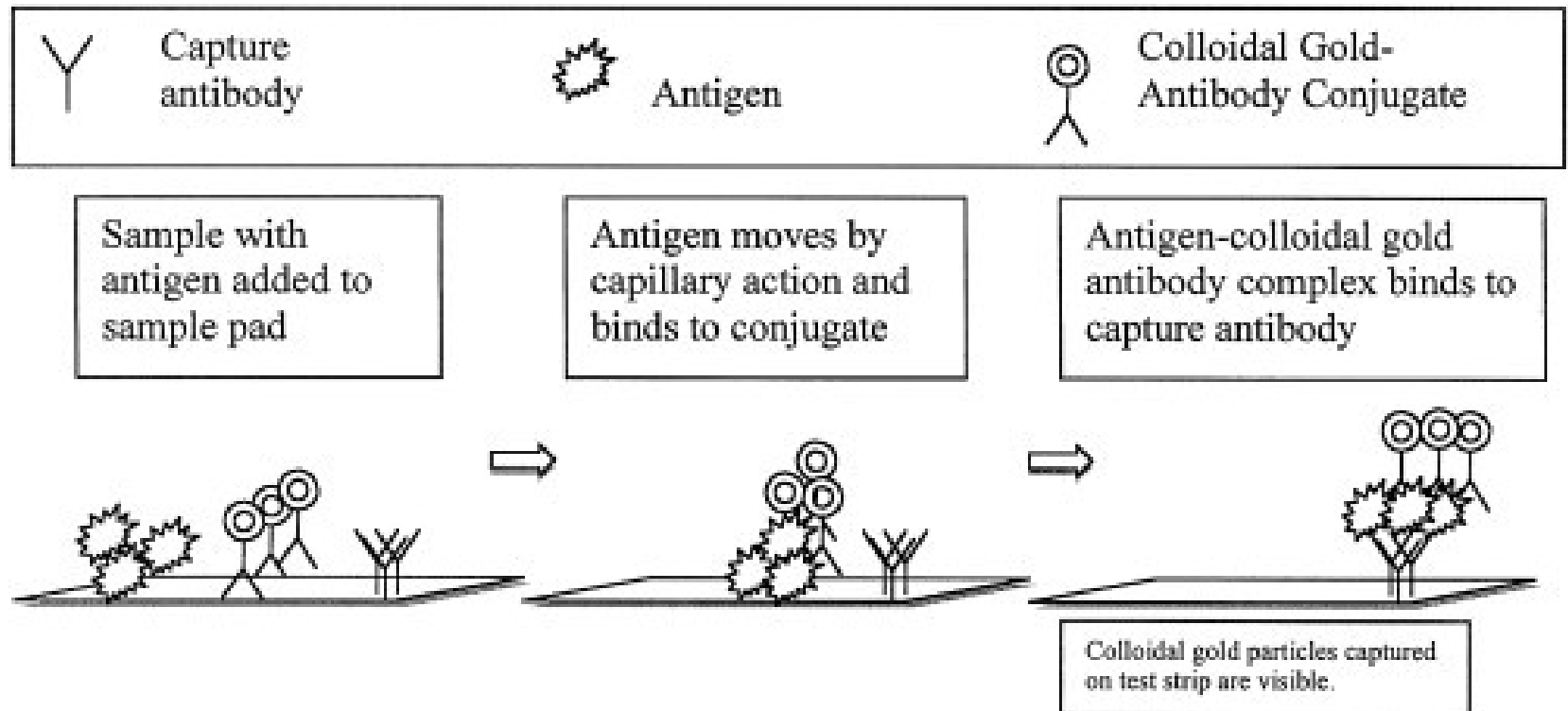
Virus Respiratoires

- Plusieurs études ont démontré une meilleure sensibilité chez les enfants que chez les adultes en raison de la plus grande charge virale excrétée
- La sensibilité varie énormément mais semble être de l'ordre de 50-75% alors que la spécificité serait de l'ordre de 85-95%
- Ces tests sont possiblement utiles pendant la saison des virus respiratoires si le résultat est positif en raison d'une bonne VPP
- Un test négatif se doit d'être confirmé par culture ou PCR
- Lorsque la saison des virus respiratoires est terminée, la VPP et la VPN chutent drastiquement rendant ces tests complètement inutiles
- Un contrôle de qualité et un entraînement du personnel est nécessaire malgré la facilité d'exécution des ces tests
- Le résultat est très rapide



Immunochromatographie

(principe de base de plusieurs tests rapides)



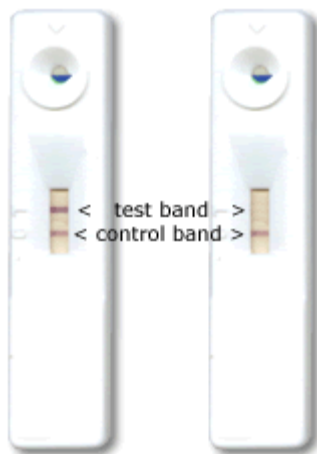
Sofia

Tests Rapides



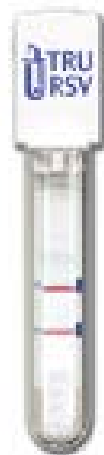
Directigen influenza A et B ou RSV

Binax now Influenza A et B ou RSV



Positive
Result

Negative
Result



One step influenza A

Le PCR temps-réel

Laboratoire de Virologie

CHU Sainte-Justine



CHU Sainte-Justine
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

Université 
de Montréal

Préparation des acides nucléiques

- L'étape la plus longue du processus diagnostic
- Différentes techniques
- Extraction d'acides nucléiques est la technique la plus fréquemment utilisée
- But est de libérer les acides nucléiques, briser les structures secondaires, conserver la qualité des acides nucléiques tout en se débarrassant des agents inhibiteurs et interférents

Techniques d'extraction

- Lyse cellulaire (chimique, mécanique)
- Inhibiteurs de Dnase et RNase
- Protéase
- Extraction organique ou inorganique

Mélange réactionnel (Master Mix)

- Tampon pour neutraliser le pH et optimiser l'action de la polymérase (TrisHCl)
- Mg^{2+} essentiel à la polymération
- K^+ ou NH_4 pour stabiliser le pH et les hybrides ADN/ADN
- Polymérase
- Nucléotides (dNTPs)
- Amorces
- Sondes
- Adjuvants (glycérol, DMSO, BSA) pour optimiser l'efficacité et réduire l'amplification non spécifique
- ROX (fluorophore de référence)

... et on ajoute notre échantillon extrait...

Real-time PCR

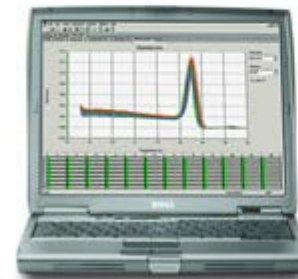
- Thermocycler temps-réel
- Ordinateur
- Optique pour excitation et la collection de la fluorescence
- Logiciel d'analyse



Icycler, Biorad

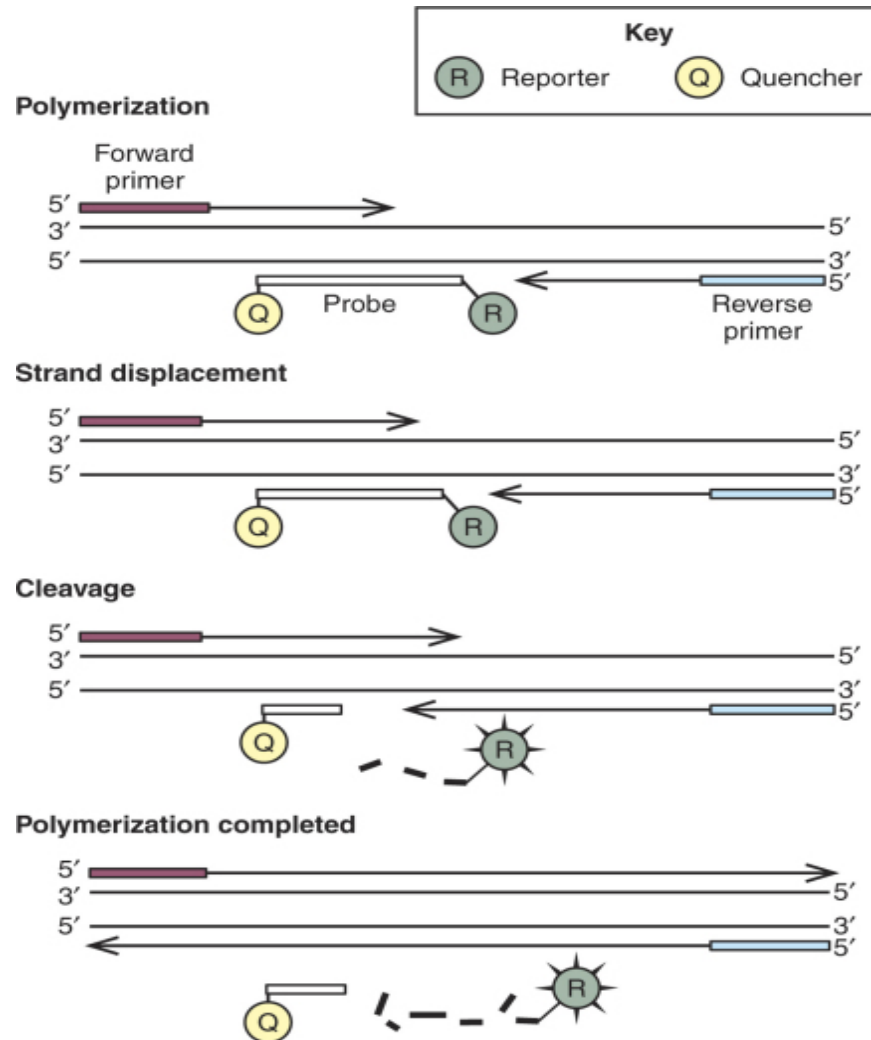


Lightcycler, Roche

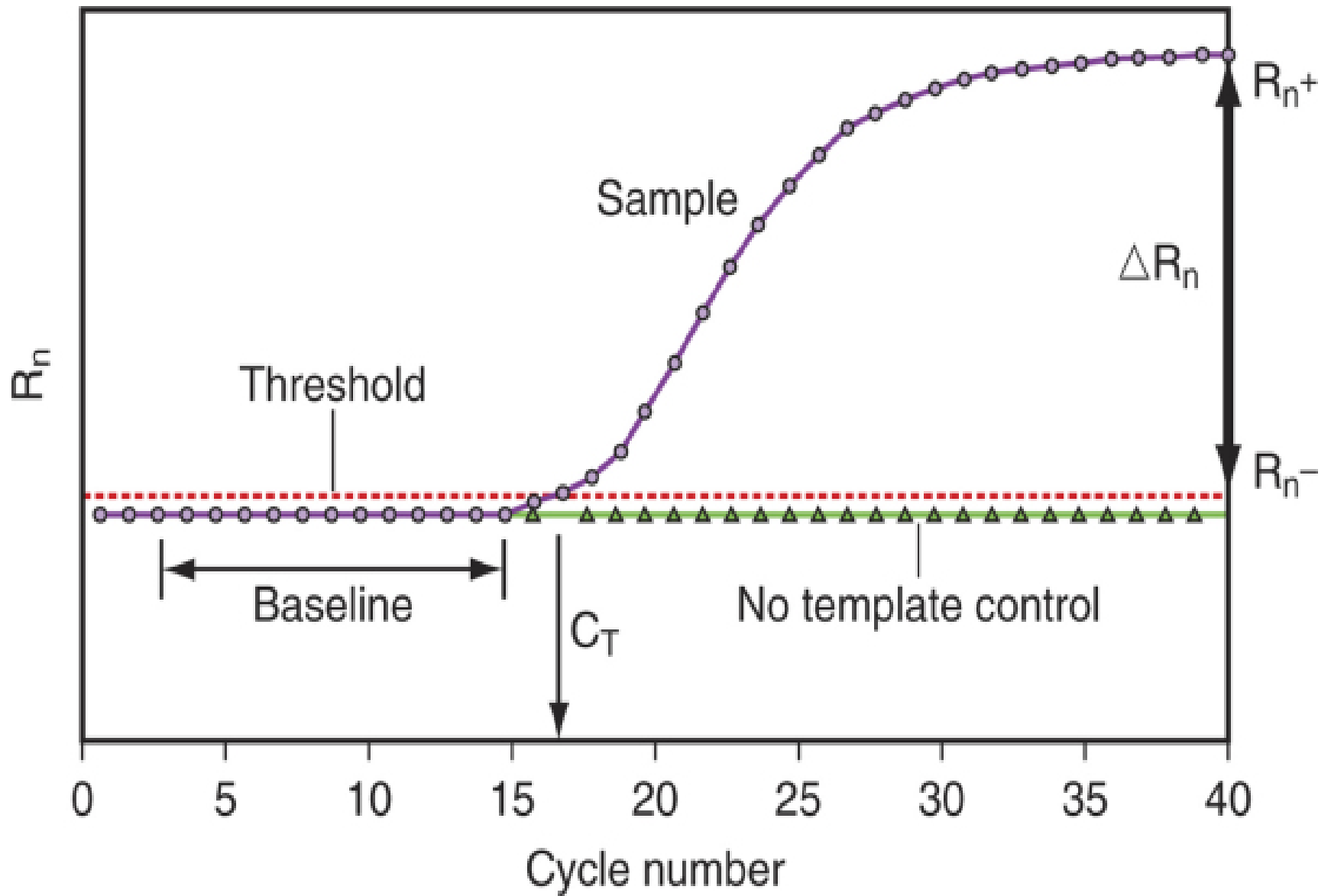


ABI 7500

Taqman (sonde hydrolyse)



Real-time PCR



Faux Résultats

Faux positifs	Faux négatifs
Contamination croisée de spécimens	Dégradation des acides nucléiques
Contamination des réactifs par amplicons	Présence d'inhibiteurs
Erreur d'aliquotage	Erreur de master mix
Amplification non spécifique	Réactifs expirés
Calibration du lecteur optique	Erreur du thermocycler (mauvaise programmation)
Erreur de transcription des résultats	Erreur d'aliquotage
	Présence d'une mutation dans la région spécifique d'amplification
	Compétition par primer-dimer
	Compétition par contrôle interne
	Erreur de transcription des résultats

Toujours reviser la littérature et genbank afin de mettre nos primers à jour...

Sérologie

Laboratoire de Virologie

CHU Sainte-Justine



20 décembre 2017

Tubes



Tube doré
(sérum)



Tube sec
(sérum)



Tube EDTA (anticoagulant)
(PCR sanguin)

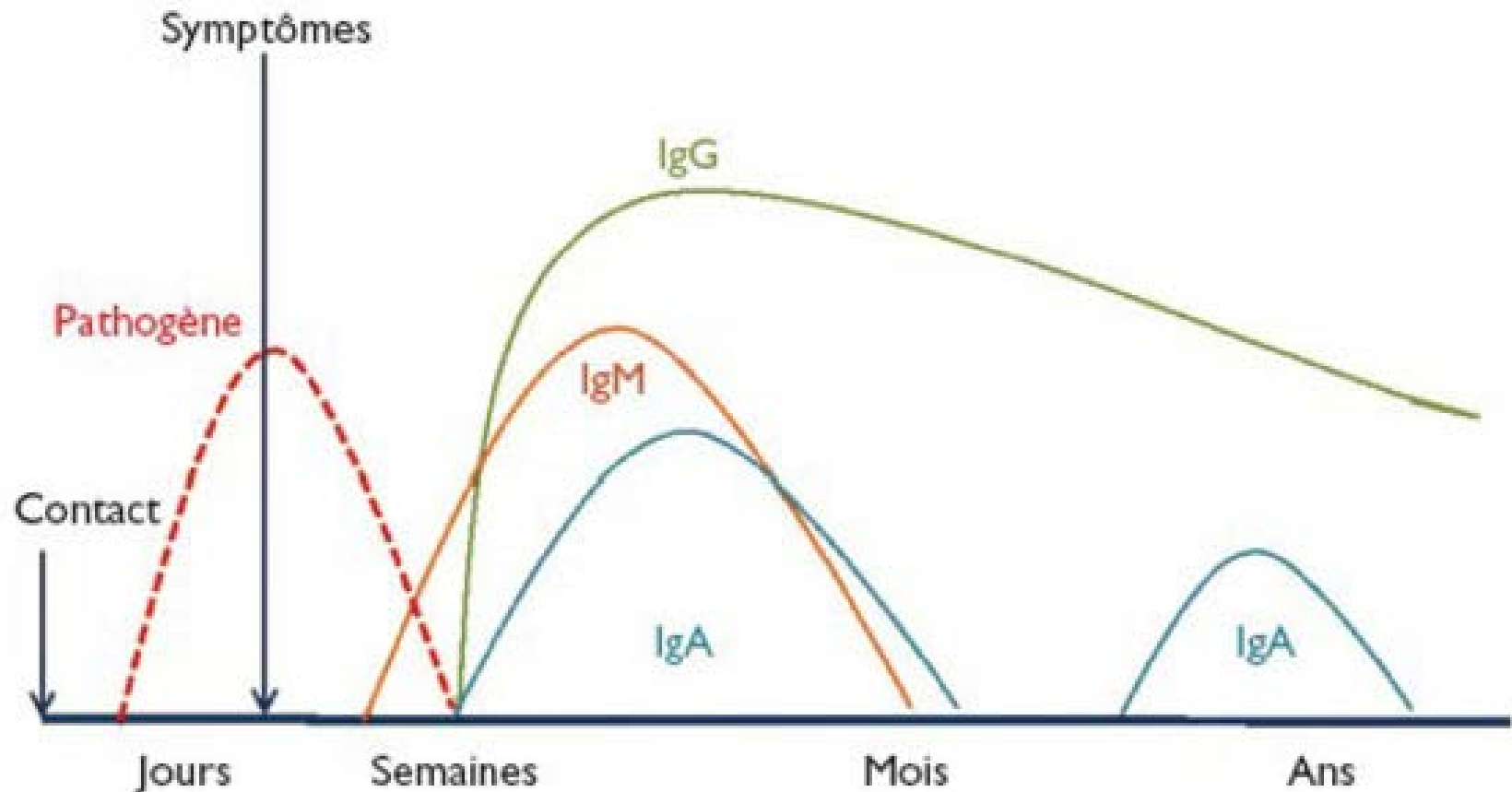


Sérologie

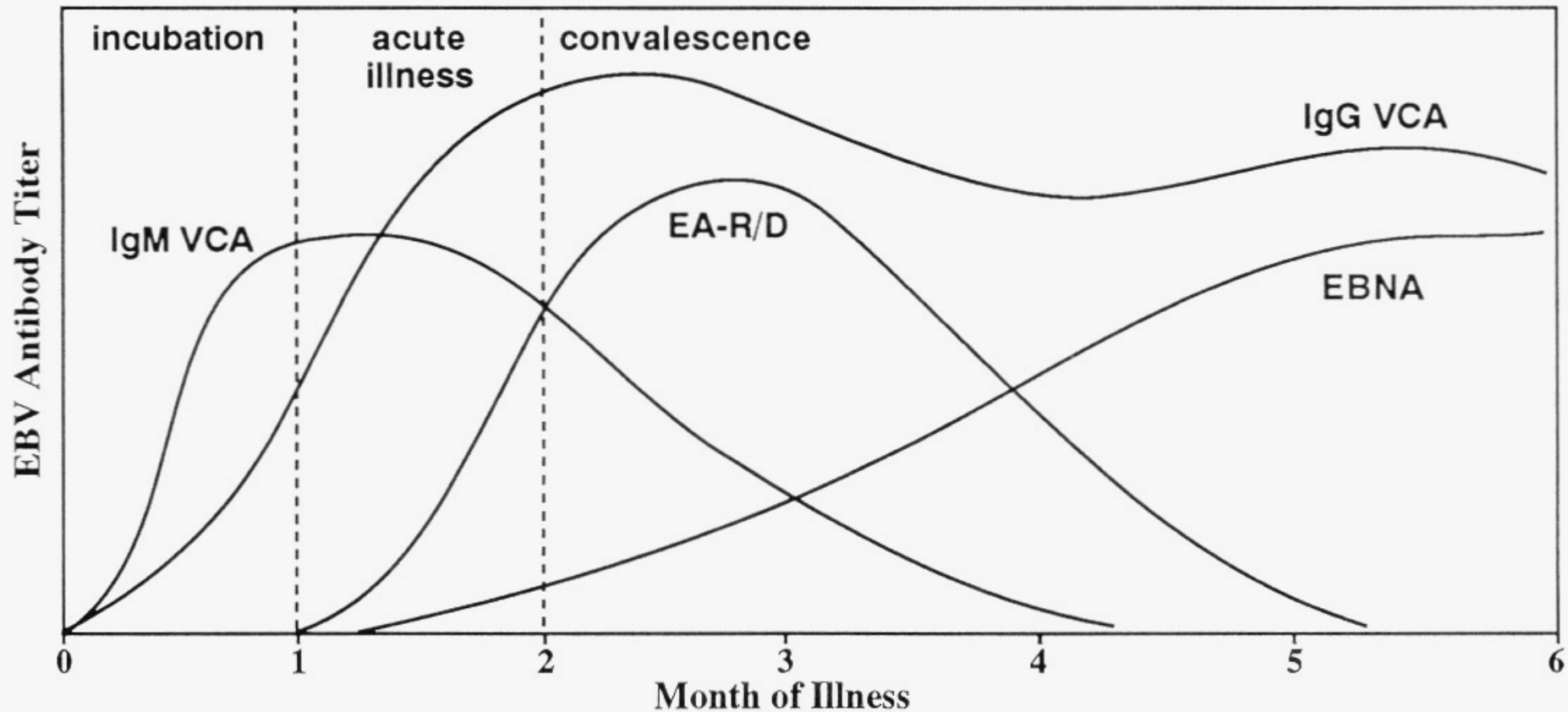
- Toujours se demander ce que l'on veut savoir
- Demander les IgM lorsque nécessaire
- Connaître les limites des sérologies IgM
- Savoir quand répéter les sérologies
- La séroconversion IgG est le gold standard
- Ne pas répéter un IgG qui a déjà été positif (sauf rares exceptions...!)



Réaction immunitaire humorale



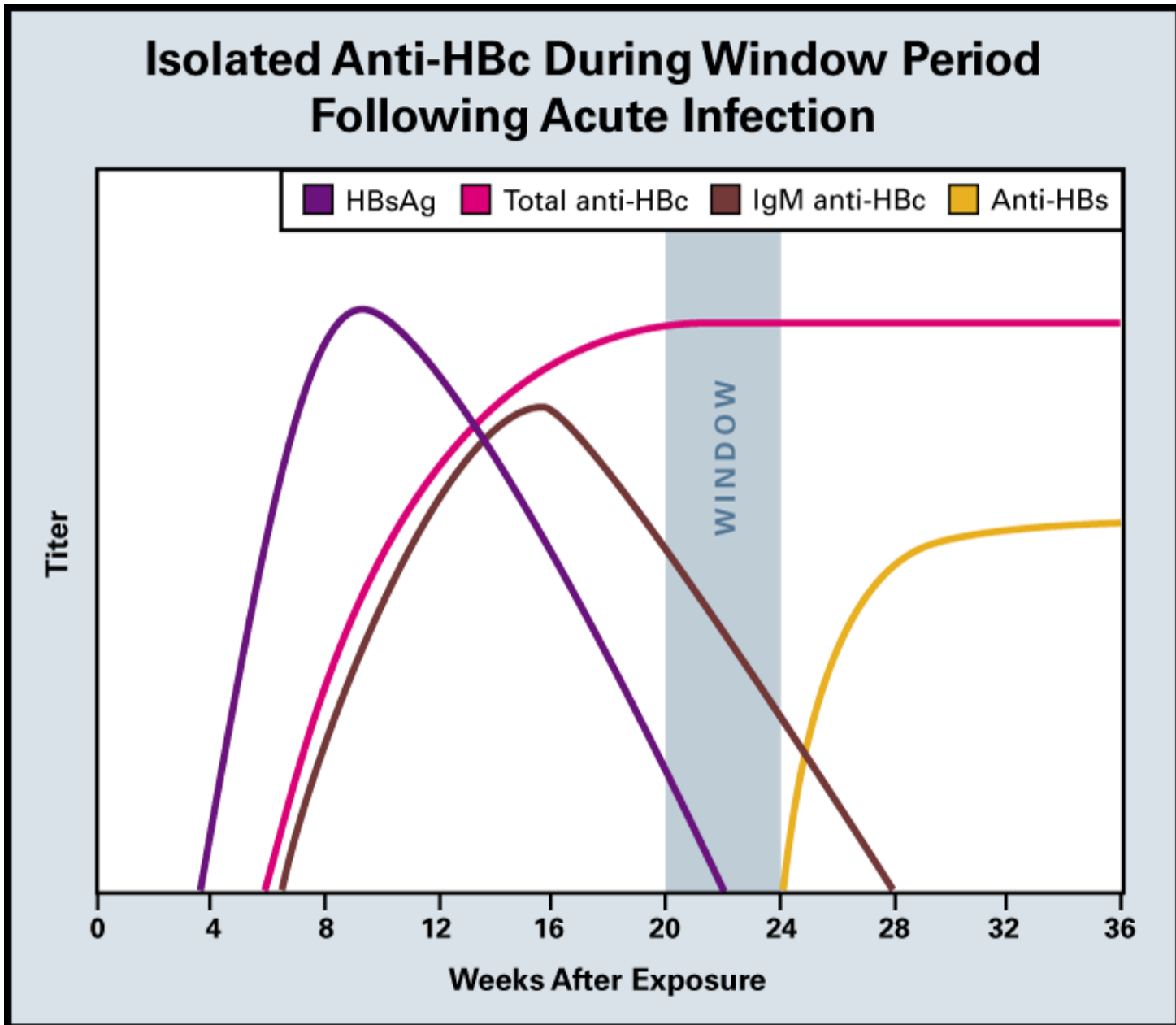
Réponse immunitaire EBV



CHU Sainte-Justine
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

Université 
de Montréal

Réponse immunitaire hépatite B



Pièges en sérologies infectieuses

- La présence d'IgM spécifiques contre un pathogène n'implique pas obligatoirement une infection récente, aiguë ou active
- La séroconversion en IgG spécifiques détectée en début d'une infection est la seule preuve sérologique d'un contact récent avec le pathogène
- Il est souvent préférable de rechercher le pathogène par un test direct à partir d'un prélèvement adéquat plutôt que de rechercher les anticorps indirectement produits par un test sérologique
- Le diagnostic microbiologique est composé de techniques très variées qui doivent être utilisées dans un cadre clairement défini en fonction du contexte clinique. La pertinence et la précision de l'interprétation dépendent de **la probabilité prétest**, des renseignements cliniques et de la discussion du cas entamée entre le laboratoire et le médecin



Impact de la probabilité pré-test

		Maladie	
		oui	non
Test	pos	a	b
	neg	c	d

Sensibilité: $a / a+c \times 100$ = fréquence des vrais positifs

Spécificité: $d / b+d \times 100$ = fréquence des vrais négatifs

VPP: $a / a+b$ = probabilité qu'un test + indique une infection

VPN: $d / c+d$ = probabilité qu'un test - indique une non-infection



Si on a une prévalence de 20%, une sensibilité 98% et une spécificité 99%...

		Maladie	
		Oui	Non
Test	pos	196	8
	neg	4	792

VPP=98%

VPN=98%



Si on a une prévalence de 2%,
une sensibilité 98% et une
spécificité 99%...

Maladie

Test

Oui

Non

VPP= 66%

pos

20

10

VPN= 100%

neg

0

970

Laboratoire de Virologie

CHU Sainte-Justine



20 décembre 2017

Si on a une prévalence de 0,2%,
une sensibilité 98% et une
spécificité 99%...

Maladie

Test

Oui

Non

VPP=20%

pos

2

10

VPN= 100%

neg

0

988

Laboratoire de Virologie

CHU Sainte-Justine



20 décembre 2017

Techniques sérologiques

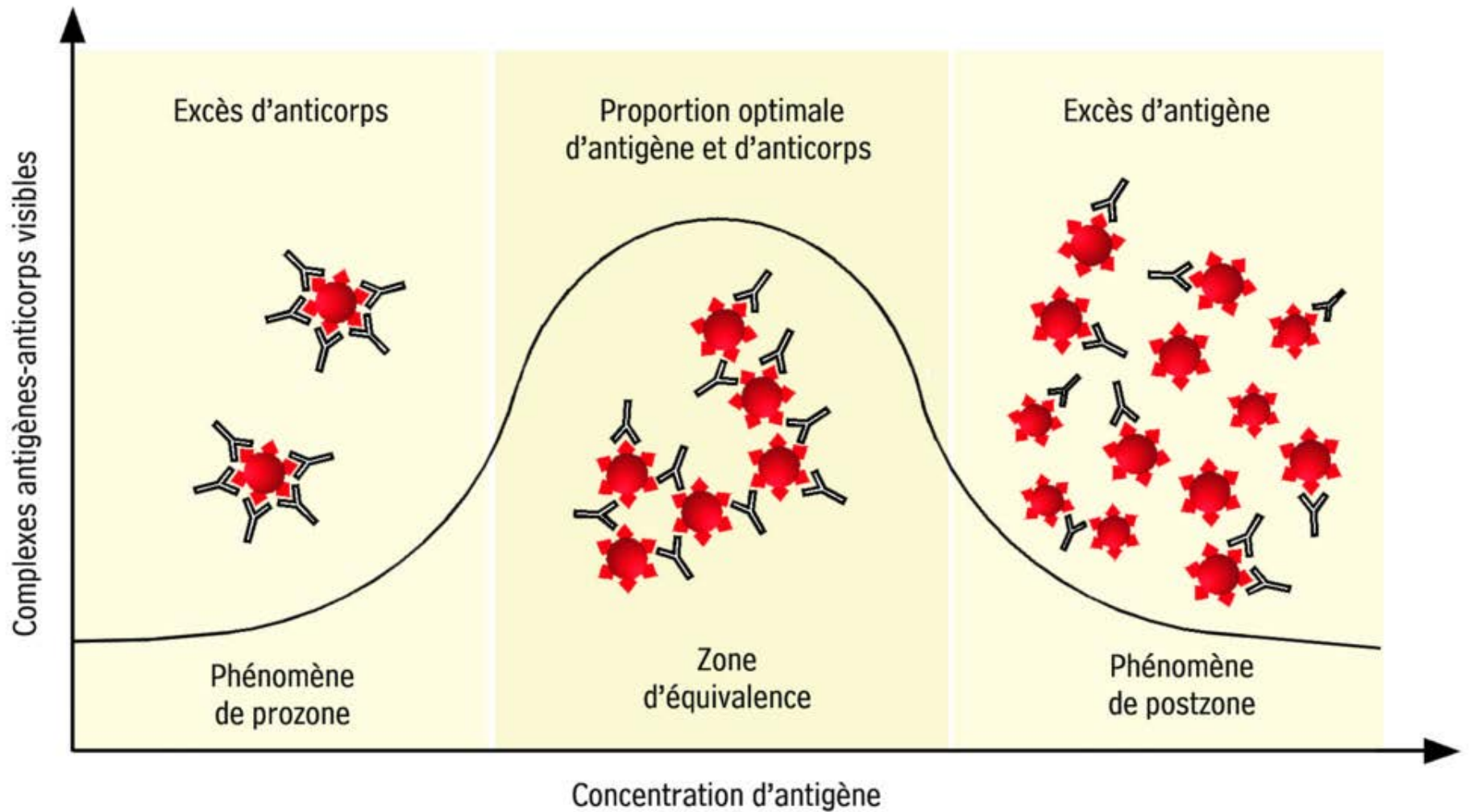
- Précipitation
- Agglutination (ex. RPR, monotest)
- Fixation du complément
- Inhibition hémagglutination
- Neutralisation
- Immunofluorescence (ex. EBV, bartonelle)
- Western Blot et Line Blot
- EIA et CMIA

Agglutination

- Réaction entre anticorps et antigène produisant une agrégation particulaire
- Augmentation de la sensibilité en couplant les antigènes à des particules de gelatine, latex, erythrocytes...
- RPR, VDRL, Monospot, tularémie, brucella
- Facile à réaliser, peu dispendieux
- Lecture subjective
- Sensibilité très limitée
- Effet prozone
- Faux positif avec facteur rhumatoïde

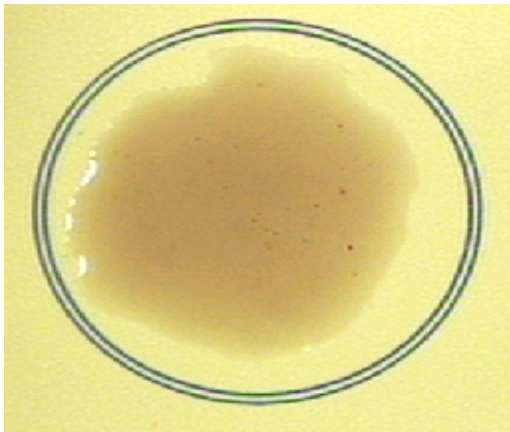


Effet prozone

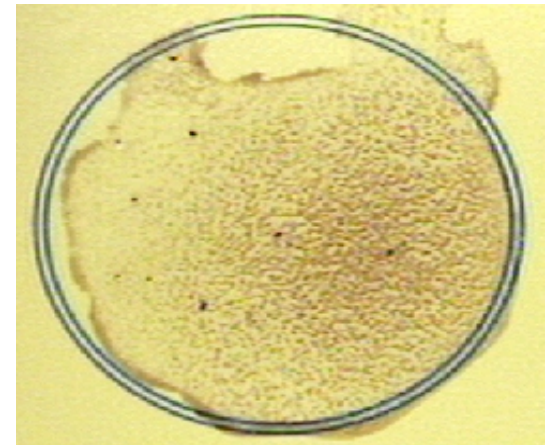


Monotest

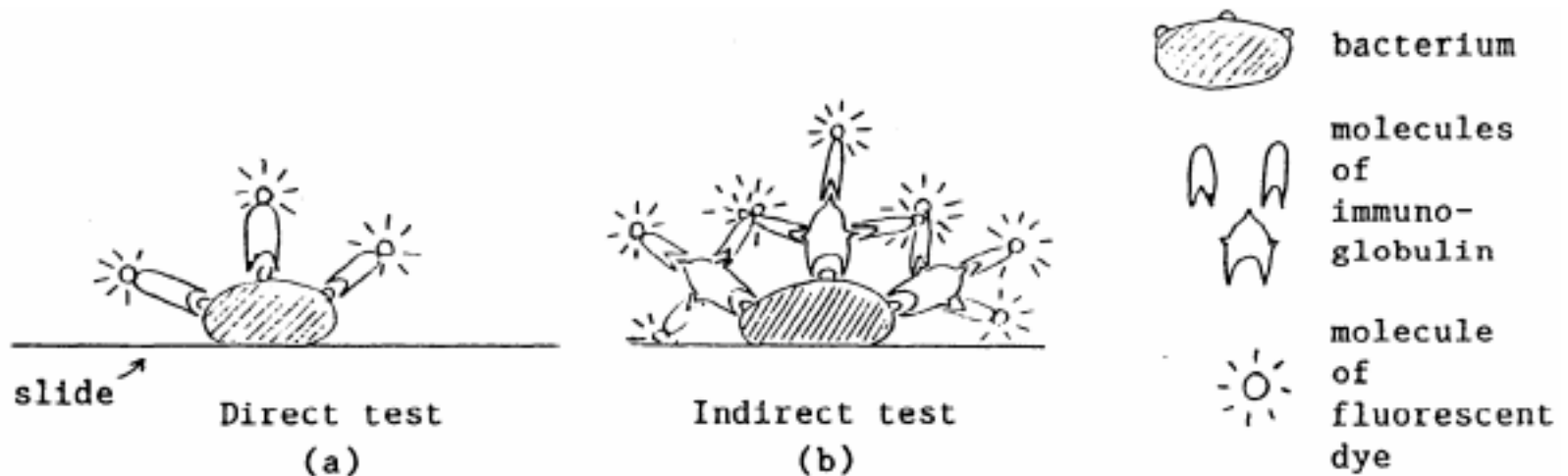
Agglutination (-)



Agglutination (+)

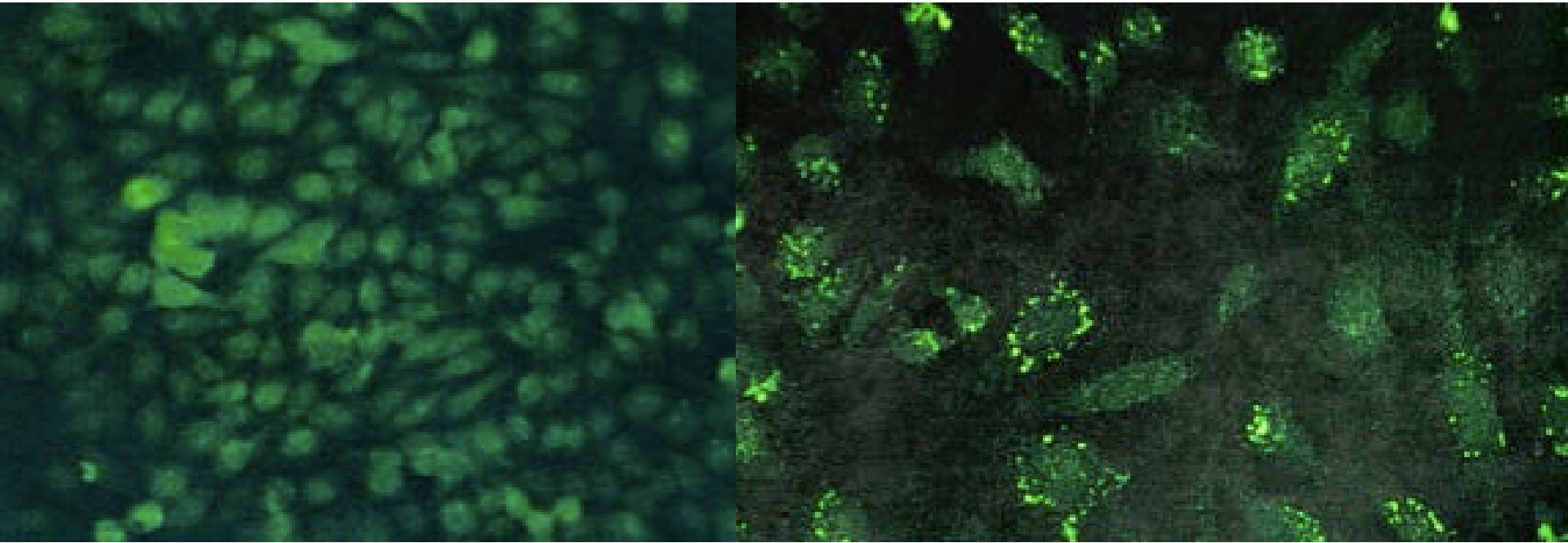


Immunofluorescence



- Permet de visualiser la structure cellulaire à laquelle s'attache les anticorps
- Augmente la spécificité surtout pour les sérologies qui réagissent beaucoup avec les structures cellulaires (Bartonella, EBV)
- Considéré le gold standard pour EBV
- Permet de cibler plusieurs antigènes exprimés sur les cellules infectées par le virus
- Fastidieuses à réaliser
- Nécessite un microscope à fluorescence
- Expertise des technologistes car subjectifs++

Immunofluorescence



Négatif

Sérologie bartonella IgG
EuroImmun

Positif

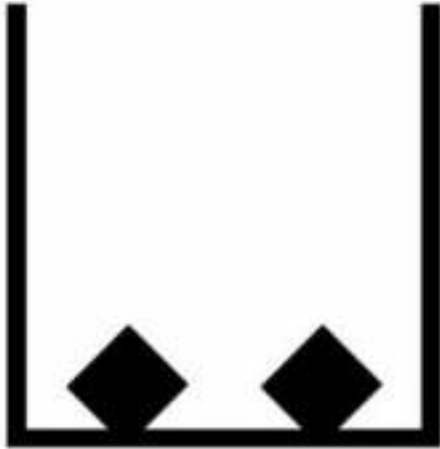
Laboratoire de Virologie
CHU Sainte-Justine



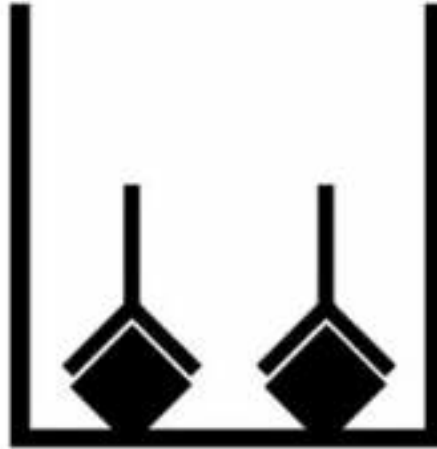
 **CHU Sainte-Justine**
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

Université 
de Montréal

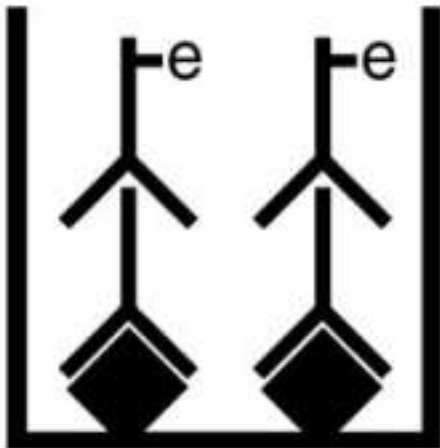
Step 1
Specific antigen is attached to
a solid-phase surface



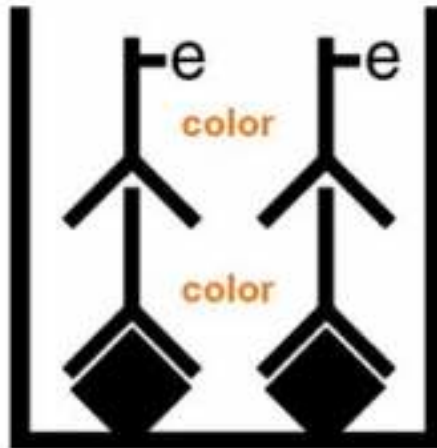
Step 2
Test specimen is added, which may
or may not contain the antibody



Step 3
An enzyme-labeled antibody
specific to the test antibody is
added (conjugate)



Step 4
Chromogenic substrate is added,
which in the presence of the
enzyme, changes color.



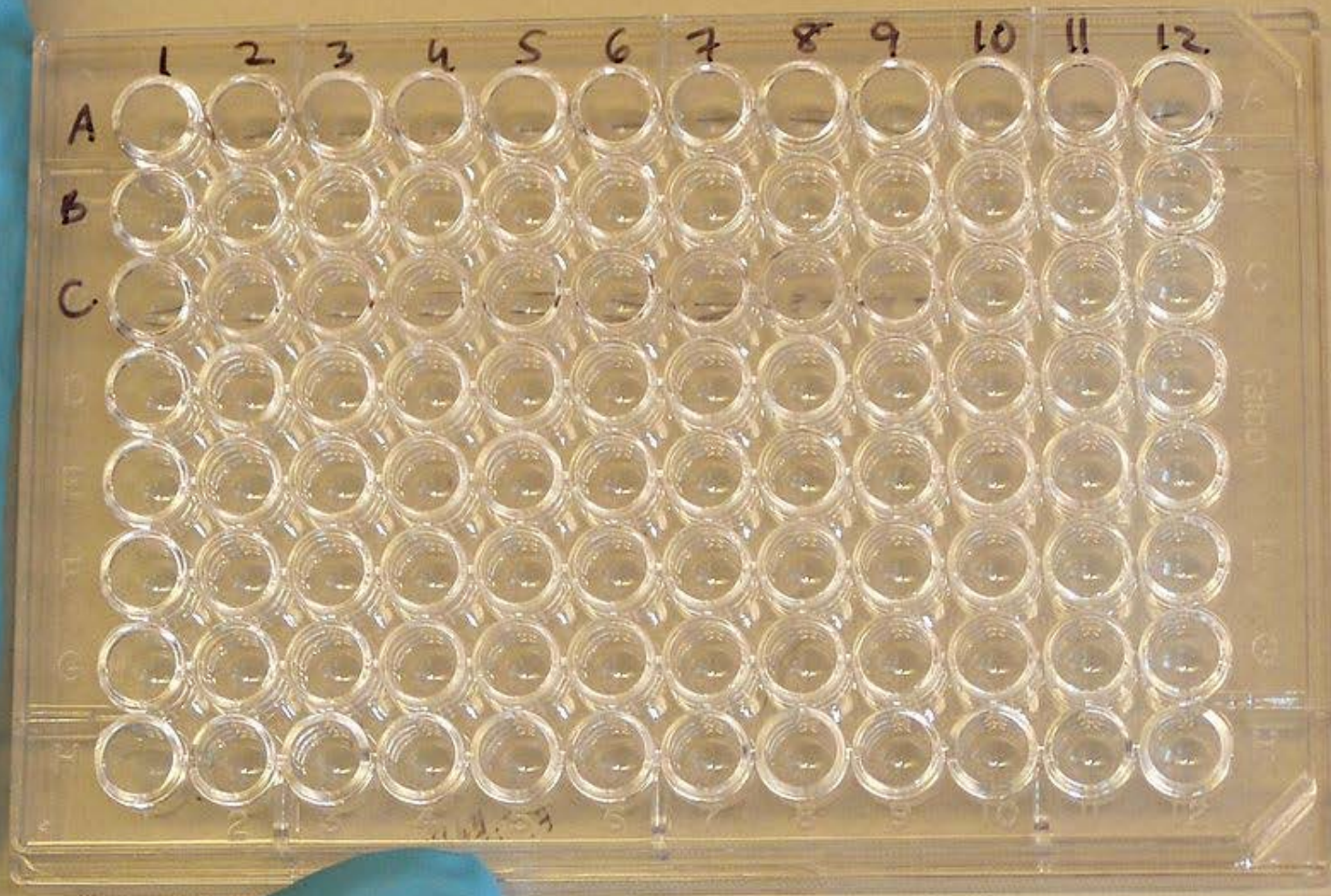
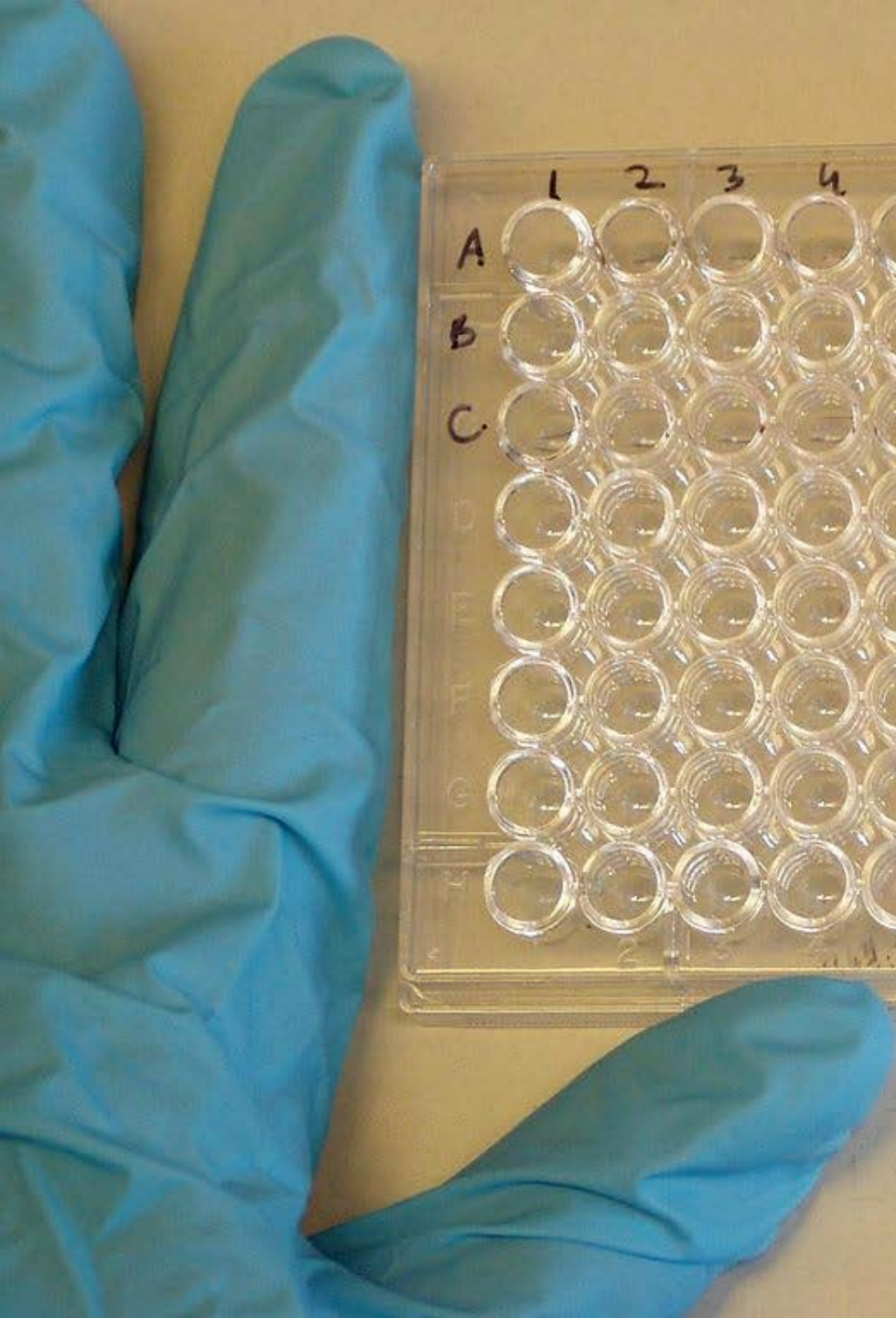
EIA

Immunométrique ou direct
Classiquement appelé ELISA

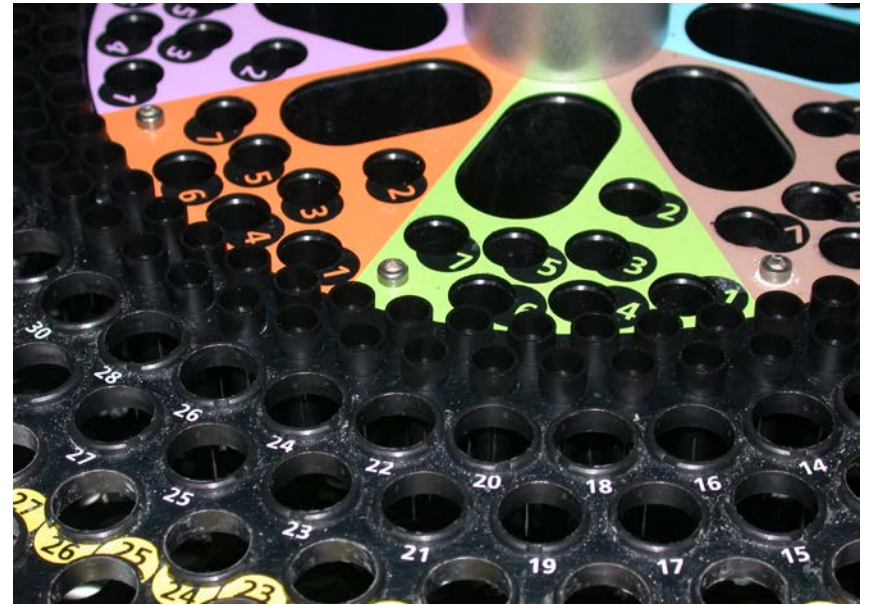


CHU Sainte-Justine
Le centre hospitalier
universitaire mère-enfant

Université 
de Montréal



ELISA automatisé



Appareil Triturus



EIA chemiluminescent

- Excellente sensibilité
- Utilisé par plusieurs automates dont Architect
- Production de lumière suite à la réaction chimique d'oxydation



Chemiluminescent Magnetic Immunoassay (CMIA): A chemiluminescent label conjugated to the antibody or antigen, and it produces light when combined with its substrate. This method is very similar to MEIA, though the chemiluminescent reaction offers high sensitivity and ease of measurement. A noncompetitive sandwich format yields results that are directly proportional to the amount of analyte present.

FIGURE 2-9 Abbott ARCHITECT® chemiluminescence label for CMIA

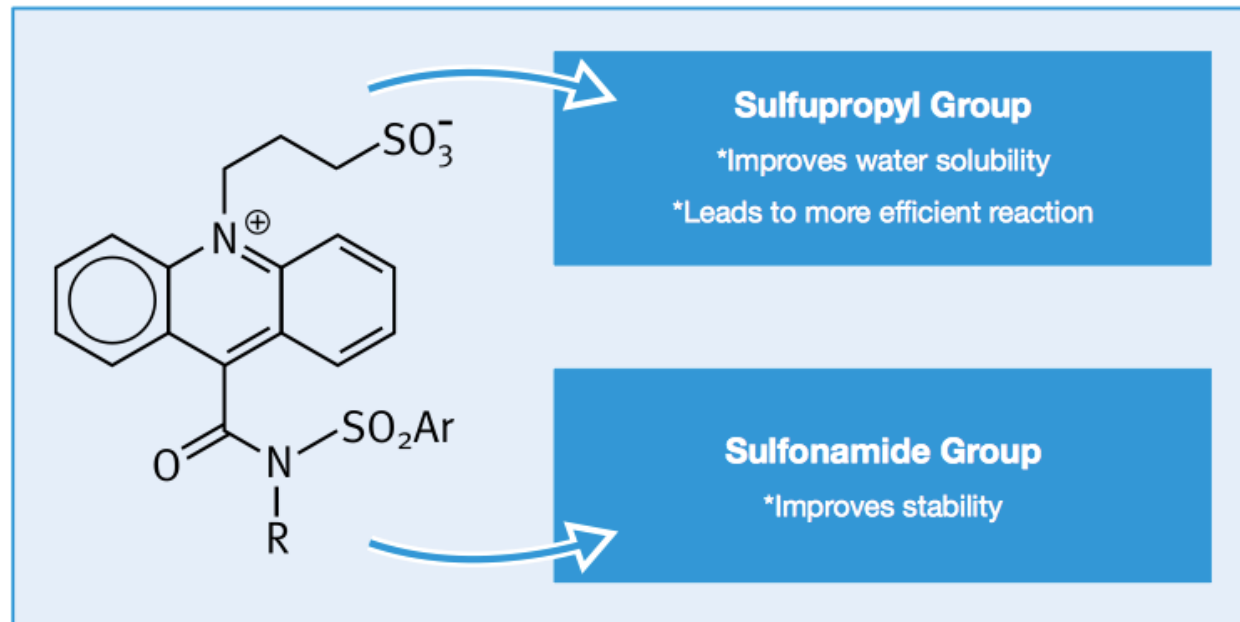
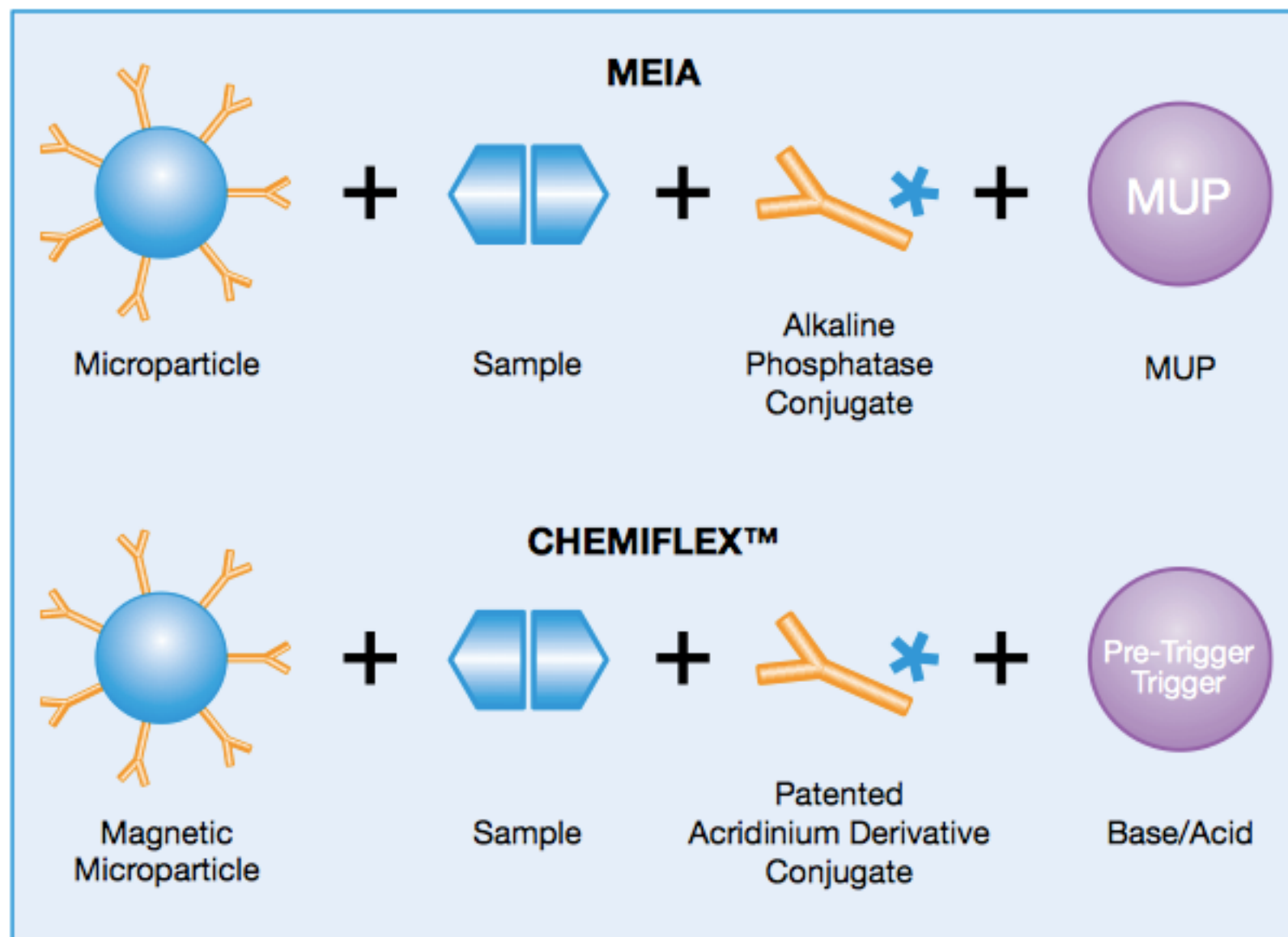


FIGURE 2-10 Comparison of MEIA and Chemiflex methods



Problèmes pré-analytiques

Étapes pré-analytiques

- Centrifugation le plus rapidement possible après le prélèvement
 - Élimine les globules rouges et toutes particules en suspension pouvant perturber les différentes réactions

Aspects macroscopiques du sérum

- Ictérique
 - Perturbation des lecteur de DO
- Hyperlipémique
 - Néfaste pour la réaction antigène-anticorps
 - Modifie les conditions de pipetage par augmentation de la viscosité
 - Idéalement être à jeun depuis 8 heures
- L'hémolyse
 - L'hémoglobine peut perturber la réaction antigène-anticorps ou altérer la qualité du signal mesuré

Conservation des échantillons

- Congelé à -20°C
- Pas de cycle gel et dégel successif

Hémolyse

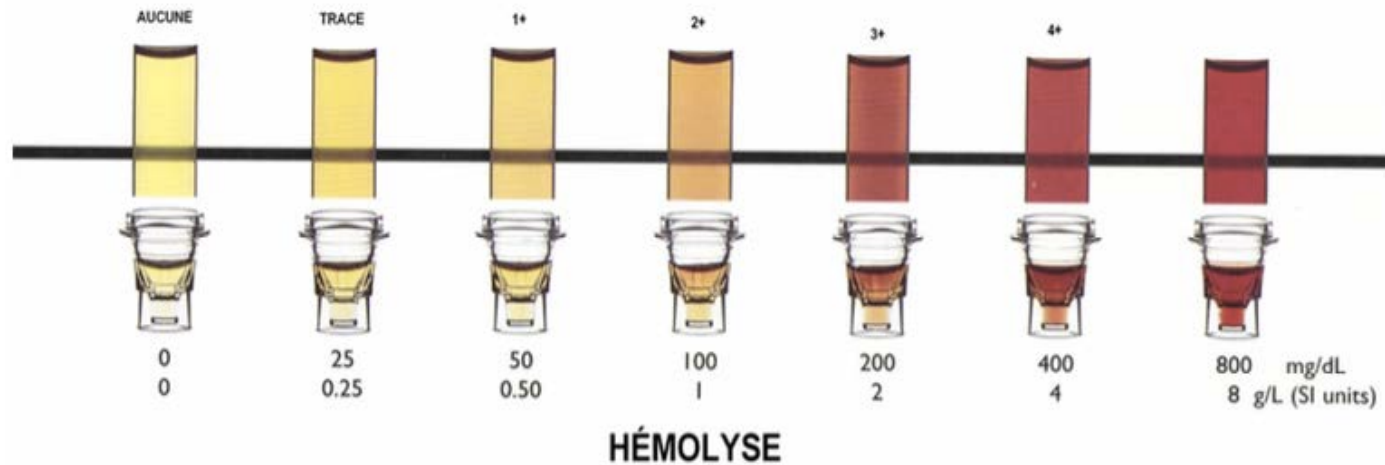


Figure 1

L'hémolyse peut être causée par :

- Garrot laissé plus d'une minute ;
- Présence d'alcool au site de ponction ;
- Inversion trop brusque des tubes ;
- Prélèvement dans une zone hémorragique (hématome) ;
- Prélèvement difficile ;
- Collapsus prolongé ;
- Prélèvement au moyen de cathéter ou canule ;
- Aspiration exagérée d'un prélèvement à la seringue ;
- Aiguille de trop petit calibre.

En conclusion

- Toujours savoir ce que vous demandez...
- Questionner la pertinence
- Savoir ce que vous ferez du résultat avant de demander l'analyse
- Vous assurer que le prélèvement est exécuté adéquatement
- Tirer le maximum d'information des résultats
- Consulter votre microbiologiste au besoin!

