

EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES
SELLES
AU COURS DES INFECTIONS DIGESTIVES

Dr Mezouar Abdennacer Younes

Pr Sonia Benammar

I. Introduction

II. Physiopathologie des infections digestives

1. Eau et intestin
2. Les bactéries intestinales

III. Diagnostic bactériologique

1. Le prélèvement
2. Conduite de l'examen cyto bactériologique
3. Antibiogramme

IV. Contextes épidémiocliniques particuliers

1. Notion de voyage récent en « pays tropical » et syndrome cholériforme.
2. Malade sous traitement antibiotique
3. Toxi-infection alimentaire collective (TIAC)
4. Patients infectés par le VIH
5. Syndrome hémolytique et urémique (SHU)
6. Intoxication alimentaire (suspicion de botulisme par exemple)
7. Détection de colonisation par des bactéries multi résistantes (BMR)
8. Détection de portage chez le personnel de restauratio

EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE AU COURS DES INFECTIONS DIGESTIVES

I. Introduction

Les infections du tractus digestif se manifestent par divers syndromes fréquemment regroupés sous le terme de diarrhées infectieuses aiguës.

Ces infections représentent l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde.

La gravité de ces infections est surtout liée aux pertes hydroélectrolytiques qui les accompagnent.

Le diagnostic biologique de ces infections se fait notamment par l'étude et la mise en culture des selles ou coproculture.

II. Physiopathologie des infections digestives

1. Eau et intestin :

La muqueuse de l'intestin est essentiellement constituée d'entérocytes (dont le rôle est l'absorption des nutriments) et de quelques autres types cellulaires (telles que les cellules caliciformes sécrétrices de mucus).

Cette assise cellulaire interne repose sur un chorion muqueux (lamina propria) riche en capillaires et en formations lymphoïdes bien organisées au niveau des plaques de Peyer (et de l'appendice).

Ce tissu lymphoïde est drainé par des vaisseaux lymphatiques aboutissant aux ganglions mésentériques puis au sang par le canal thoracique.

L'intestin est capable d'absorber ou de sécréter de l'eau et des électrolytes (Na⁺, Cl⁻, K⁺, HCO⁻).

Physiologiquement, le bilan de ces mouvements aboutit à l'absorption quotidienne d'une quantité d'eau approximativement égale à la moitié des liquides extracellulaires.

La diarrhée est le résultat soit :

- D'une diminution de l'absorption (destruction des entérocytes comme au cours des diarrhées virales, inhibition de l'absorption par une entérotoxine).
- D'une augmentation de la sécrétion d'eau (diarrhée osmotique, entérotoxine).

Les pertes d'eau, au cours des diarrhées, aboutissent très vite, si elles ne sont pas compensées, à une déshydratation qui fait toute la gravité de ces syndromes.

2. Les bactéries intestinales :

L'intestin de l'homme est, dès sa naissance, colonisé par de nombreuses espèces bactériennes.

La plupart d'entre elles sont des bactéries commensales et certaines sont indispensables au bon fonctionnement de l'appareil digestif. Certaines espèces bactériennes sont capables de déclencher des maladies intestinales quand elles prolifèrent dans l'intestin humain.

Il s'agit surtout de bactéries des genres : *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli* (certains sérotypes), *Yersinia*, *Vibrio*, et *Campylobacter* ;

Dans certains cas : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, et *Clostridium perfringens*.

Toutes ces bactéries sont dites **entéropathogènes** (pathogènes pour l'intestin).

Ces bactéries peuvent schématiquement être regroupées en 3 types selon la physiopathologie des maladies provoquées (voir tableau 1).

Tableau 1 : Types de bactéries selon le mécanisme physiopathologique

Bactéries entérotoxinogènes	Bactérie entéro-invasives : Elles sont capables d'envahir la muqueuse intestinale	Bactéries entéropathogènes
<p>-Capables de sécréter une entérotoxine responsable d'une fuite importante d'eau et d'électrolytes.</p> <p>-Elles se multiplient dans les parties hautes de l'intestin (duodénum, jéjunum), n'altèrent pas la muqueuse</p> <p>-Diarrhées aqueuses, sans émission de sang ou de leucocytes et non fébriles</p> <p>-Risque : Déshydratation</p>	<p>1. Bactéries envahissant les cellules intestinales en provoquant leur destruction</p> <p>-Se multiplient dans les parties basses du tube digestif (iléon, colon)</p> <p>-Dysenteries → émission fréquentes de selles sanglantes et purulentes et des débris de la muqueuse desquamée + fièvre</p> <p><u>Exp :</u> <i>Shigella</i>, et <i>E.I.E.C.</i></p>	<p>-Le mécanisme n'est pas parfaitement connu.</p> <p>-Dans ce groupe, on trouve : <i>E. coli</i> des gastro-entérites infantiles (E.P.E.C)</p> <p>- Diarrhée aqueuse + vomissements chez le nourrisson âgé de moins de 2 ans.</p>
<p><u>Exp :</u></p> <p><i>V.cholerae</i>, <i>E.C.E.T</i> (<i>E. coli</i> entérotoxinogène), <i>Aeromonas hydrophila</i>, <i>V.parahaemolyticus</i>.</p>	<p>2. Bactéries envahissant les cellules intestinales sans les détruire :</p> <p>-Ces bactéries envahissent la sous-muqueuse, les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques.</p> <p>- Dans ce groupe, on trouve : <i>Salmonella</i>, <i>Yersinia</i> et <i>Campylobacter</i>.</p> <p>- Les troubles observés sont variables :</p> <p>✓ Entérites : émission fréquentes de selles avec du sang et des leucocytes, fièvre, douleurs abdominales)</p> <p>✓ Entérites avec septicémie (certaines <i>Salmonella</i>).</p>	<p>- Certaines bactéries sont entéropathogènes dans certaines circonstances :</p> <p>✓ <i>S. aureus</i> et <i>Bacillus cereus</i> entérotoxinogènes des toxi-infections → sécrètent leur toxine dans l'aliment contaminé.</p> <p>✓ Bactéries entéropathogènes à la faveur d'un déséquilibre de la flore intestinale → diarrhée post-antibiothérapie.</p>

II -Diagnostic bactériologique d'un prélèvement de selles : Coproculture

La coproculture se pratique sur selles liquides, molles, glaireuses ou hémorragiques ou sur indications très précises pour des selles solides.

Remarque : Prière de revoir vos cours de systématique concernant les bactéries citées plus bas et impliquées dans les infections digestives.

1. Le prélèvement :

-Les selles sont émises dans un récipient propre.

-Chez le nourrisson, il est possible de procéder à un écouvillonnage rectal pour prélever les selles.

-L'acheminement vers le laboratoire doit être rapide sinon conserver le prélèvement à +4°C afin d'éviter la dessiccation et la prolifération des bactéries et levures commensales. Dans le cas où le temps d'acheminement est trop long, l'emploi d'un milieu de transport est indispensable.

-La fiche de renseignement doit accompagner le prélèvement et doit être correctement remplie comportant le nom, prénom, âge, signes cliniques, notion de prise d'antibiothérapie et tout renseignement permettant une orientation diagnostique.

2. Conduite de l'examen cyto bactériologique :

Un échantillon **muco-purulent ou sanglant** est choisi lorsqu'il en existe.

a. Examen macroscopique :

La selle peut être normale, moulée.

Elle peut être molle ou liquide.

Elle peut être diarrhéique : soit afécale avec glaires sanglantes (dysentérioriforme), soit incolore ou eau de riz (cholériiforme).

b. Examens microscopiques :

Cet examen est important pour orienter les cultures :

- ✓ En cas de diarrhée à germes invasifs : il y a présence de leucocytes (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp.)
- ✓ En cas de diarrhée à germes entérotoxigènes : il n'y a pas de leucocytes (*V. cholerae*, *Aeromonas* spp., *C. difficile*).

Cependant, dans certaines diarrhées à bactéries invasives, la présence de leucocytes n'est pas toujours constante.

-Examen direct à l'état frais : permet d'apprécier un déséquilibre de la flore. A l'état normal, on trouve environ 4/5 de bacilles et 1/5 de cocci et de rares levures. Un processus invasif est caractérisé par la présence d'hématies et de leucocytes.

-Coloration au bleu de méthylène : permet d'apprécier la flore, de voir les leucocytes et les levures.

- Coloration de Gram : retrouve env. 60-70 % de bactéries à Gram (-) et 30-40 % de Gram (+).

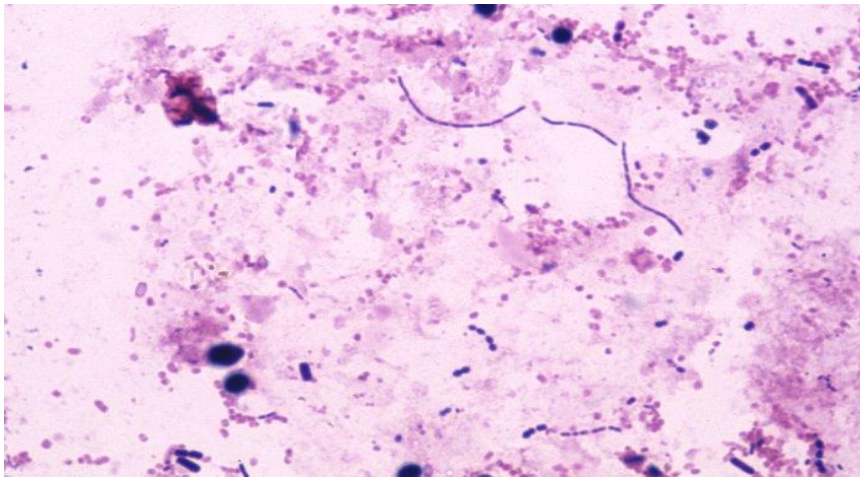


Fig 1. Flore équilibrée = majorité de bactéries à Gram négatif

c. Mise en culture :

Elle comporte l'utilisation de 2 types de milieux :

- Les milieux d'isolement sélectifs et différentiels.
- Les milieux d'enrichissement favorisant la croissance de germes pathogènes qui sont peu abondants au sein d'une flore très diversifiée.

**N. B : Il existe de nombreux milieux d'isolement sélectifs et d'enrichissement pour la mise en évidence des bactéries entéropathogènes à partir des selles.

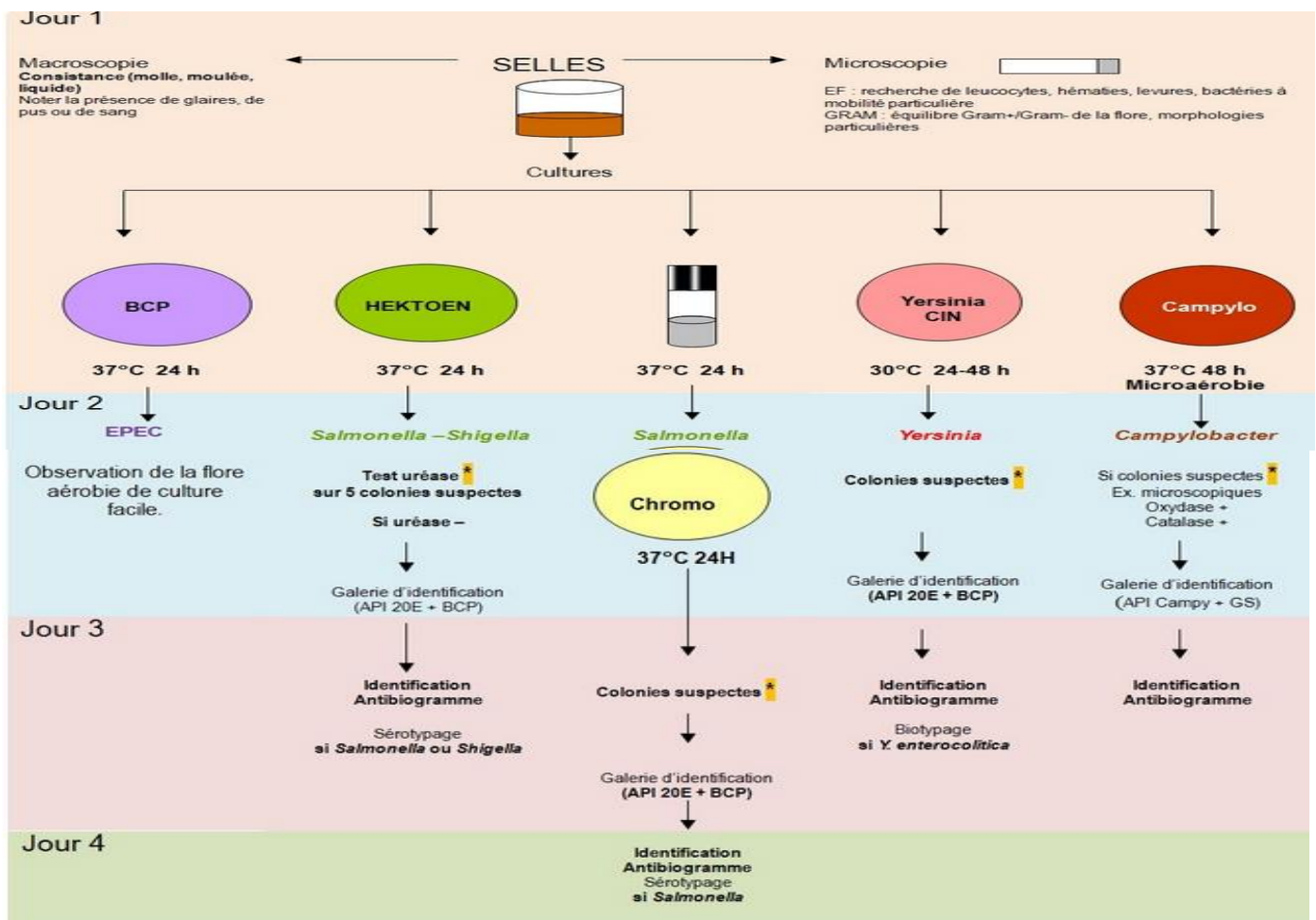


Fig2. Protocole général d'une coproculture standard

BCP = gélose lactosée au pourpre de bromocrésol ;
Enrichissement = bouillon d'enrichissement en *Salmonella*,
Campylo = milieu d'isolement sélectif des *Campylobacter* (Campyloset, Karmali..)
Chromo = gélose chromogène *Salmonella*
GS = gélose au sang

d. Identification des colonies suspectes :

1. Recherche de *Salmonella* et de *Shigella* :

-Prendre les colonies lactose (-) H₂S (-) et lactose (-) H₂S (+)

-Repiquer au moins 4 colonies sur milieu urée-indole. Incuber à 35-37°C au bain-marie pendant 4 heures :

❖ Uréase (+) : *Proteus* (Arrêt de l'examen)

❖ Uréase (-) :

Ensemencer à partir de chaque milieu un TSI et un LDC (+ témoin) Incubation à 35-37°C pendant une nuit.

1.1. Si urée (-) TDA (-) LDC (+) = *Salmonella* →

Aspect sur TSI oriente vers quelques espèces de *Salmonella* :

➤ Culot noir, pente rouge, gaz (+), H₂S (+) : *Salmonella* mineure ou *S. para typhi B*

➤ Culot jaune, pente rouge, gaz (+), H₂S (-) : *Salmonella para A*

➤ Culot jaune, pente rouge, gaz (-), H₂S (-) ou (+) faiblement (en moustache) : *S. typhi*

→ Procéder à l'identification antigénique = Identification précise de toutes les espèces

1.2. Si urée (-), TDA (-), LDC (-) = *Shigella*

Autres caractères de *Shigella* : gaz (-), H₂S (-), lactose et saccharose (-).

→ Procéder à l'identification antigénique = Identification précise des espèces de *Shigella*

2. Recherche des *E. coli* entéropathogènes :

-A partir des boîtes de BCP, repiquer 8-10 colonies sur milieu urée-indole ou eau peptonnée exempte d'indole et sur TSI.

-Incuber à 37° pendant 24 heures.

N. B : du point de vue macroscopique, rien ne permet de distinguer les EPEC des autres *E. coli* de la flore intestinale ; c'est pour cela qu'il faut repiquer un grand nombre de colonies pour augmenter les chances de prendre les EPEC.

- Les colonies urée (-), indole (+), TDA (-) et gaz (+) en TSI → identification antigénique à l'aide de sérums anti EPEC (12 sérotypes).

3. Recherche de *Yersinia enterocolitica* et *pseudotuberculosis* :

La recherche de *Yersinia* dans les selles doit être systématique devant tout syndrome digestif, chez l'enfant et chez l'adulte (même en l'absence de diarrhée ou de fièvre).

A partir de la suspension de selles, effectuer un isolement sur Hektoen ou sur milieu spécifique pour *Yersinia* : milieu à l'Irgasan-cefsulodine et novobiocine (CIN) incubé pendant 48 h à 28 -30 °C de préférence sinon à 37° (rarement positive) et un enrichissement sur milieu de Rappaport modifié incubé pendant 3 semaines à +4°C en faisant des repiquages toutes les semaines → Identification : voir cours

4. Recherche de *Campylobacter* spp. :

La recherche des *Campylobacter* spp. devrait être systématique, sachant qu'ils représentent la première cause de gastroentérites aiguës fébriles dans le monde. Elle est d'autant plus réalisée chez les enfants en présence de selles liquides (très fréquente chez celui-ci)

- La culture se fait sur un milieu spécifique (milieu de Skirrow ou de Buztler).
- Les cultures sont incubées pendant 48 heures minimum en micro-aérophilie.

→ Identification : voir cours

d-Antibiogramme :

- L'antibiogramme doit être systématique mais ne doit pas inciter à une antibiothérapie (Antibiogramme donné à titre indicatif et non comme une incitation à une antibiothérapie).
- Le traitement antibiotique n'est justifié qu'en cas de diarrhée très invasive avec selles sanglantes ou mucopurulentes, chez les personnes ayant un déficit immunitaire ou en cas de prolongation anormale d'une diarrhée d'origine bactérienne.

III. Contextes épidémiologiques particuliers d'étude des selles :

1. Notion de voyage récent en « pays tropical » et syndrome cholériforme

➤ *V. cholerae* se recherche directement et après enrichissement en eau peptonnée alcaline repiquée toutes les 3 heures sur milieu gélosé spécifique (par exemple TCBS, GNAB).

➤ *Aeromonas spp.* : Sur milieu gélosé au sang contenant de l'ampicilline, un milieu d'enrichissement est inutile.

❖ *V.cholerae* : Sur GNAB, repérer les colonies suspectes : colonies de 2-3 mm de diamètre, transparentes à contours réguliers, plates. A partir de chaque colonie, effectuer une recherche **d'oxydase** :

Si oxydase (+), repiquer le reste de la colonie sur milieu KIA et incubé à 37°.

Si KIA : glucose +, gaz (-), lactose (-) , on agglutine avec le sérum *V. cholerae anti- O1* puis anti *O-139* (vérifier que la souche n'est pas auto-agglutinable avec l'eau physiologique à 0,9%)

- ✓ Si agglutination (-) avec l'eau physiologique et (+) avec le O1 ou le O139 => *V. cholerae* O1 ou O-139
- ✓ Si agglutination (-) avec l'eau physiologique, avec le O1 et le O139 : ensemercer une galerie biochimique contenant les acides aminés. Ou une galerie api 20E, afin de différencier *V. cholerae* non O1-non O139 des *Aeromonas* et *Plesiomonas*.

	LDC	ODC	ADH
<i>V. cholerae</i>	+	+	-
<i>Plesiomonas</i>	+	+	+
<i>Aeromonas</i>	+	-	+

2.Malade sous traitement antibiotique

2.1. Clostridium difficile :

➤ Il s'agit le plus souvent d'une diarrhée de moyenne importance accompagnant une antibiothérapie. Plus rarement le tableau évolue vers celui d'une colite pseudo-membraneuse.

➤ Primitivement liée à un déséquilibre de la flore intestinale, la diarrhée est secondaire au développement de *C. difficile* sécréteur de l'entérotoxine A et de la cytotoxine B.

➤ *C. difficile* est également à l'origine d'infections nosocomiales.

➤ Diagnostic :

- La technique de référence reste la mise en évidence de la cytotoxine B dans les filtrats de selles et ne s'impose que pour des malades sous traitement antibiotique ou présentant une

colite pseudo-membraneuse.

- Méthodes rapides immunoenzymatiques : détection de la toxine A ou celle des deux toxines A et B
- Méthodes de biologie moléculaire par amplification génique (gènes de toxines)
 - La recherche de la bactérie par culture nécessite des milieux spécifiques : gélose Columbia au sang additionnée de céfoxitine, cyclosérine et fructose incubée en anaérobiose pendant 48 heures (milieu de George CCFA).

2.2. D'autres micro-organismes peuvent entraîner des diarrhées par dysmicrobisme de flore et pullulation corollaire : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (diarrhée molle), *Clostridium perfringens* producteur d'entérotoxine.

3.Toxi-infection alimentaire collective (TIAC)

On distingue habituellement :

- * Les TIAC d'incubation courte (1 à 4 h) non fébriles dues à *S. aureus* et *B. cereus* ;
- * Les TIAC d'incubation longue (12 à 72 h) dues à *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, *C. perfringens* et *C. botulinum*.

S'agissant des TIAC, la recherche de la bactérie ou de sa ou ses toxines se fait non seulement dans les selles, mais principalement dans les aliments, voire dans les vomissements ou l'aspiration gastrique, parfois dans le sérum du malade (toxine botulique).

4.Patients infectés par le VIH

Les diarrhées sont particulièrement fréquentes au cours de l'infection par le VIH (au stade SIDA notamment). Elles relèvent de causes infectieuses multiples :

- * Bactéries responsables des diarrhées aiguës banales ;
- * Virus de type CMV, HSV;
- * Protozoaires tels *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli* ou *Giardia intestinalis* ;
- * *Cryptosporidies*, *Microsporidies*.

5. Syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont non invasifs exprimant leur pouvoir pathogène au moyen d'une cytotoxine.

Ils exposent à des diarrhées hémorragiques qui peuvent secondairement se compliquer, surtout chez l'enfant, d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU).

L'isolement de *E. coli* 0-157 s'effectue à partir des selles sur gélose Mac Conkey au sorbitol ; les colonies sorbitol (-) sont agglutinées avec un latex sensibilisé avec des anti O-157.

6.Intoxication alimentaire (suspicion de botulisme par exemple)

Cette pathologie ne relève pas de techniques de coproculture mais de la recherche et du typage de la toxine dans le sérum du malade et les aliments suspects.

7.Détection de colonisation par des bactéries multirésistantes (BMR)

-A des fins épidémiologiques chez les malades hospitalisés dans des services à risques (réanimation ou onco-hématologie), on peut être amené à rechercher dans leurs selles des BMR telles : **Entérocoque résistant à la vancomycine, SARM, Entérobactéries BLSE (+), ou Entérobactéries carbapénèmase (+).**

-En milieu très spécialisé, dans le cadre de protocoles de surveillance de l'immunodéprimé, on réalise parfois une coproculture semi-quantitative de la flore fécale.

-Les Entérocoques résistant à la vancomycine sont isolés sur gélose type bile-esculine contenant 6 mg/1 de vancomycine.

-Les Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu sont sélectionnées sur Drigalski contenant 0,5 ou 1 mg/1 de céfotaxime (ou à partir de ce milieu sélectif).

La présence d'une BLSE chez la ou les souches est confirmée par la mise en évidence d'une synergie entre l'acide clavulanique et une ou plusieurs des molécules suivantes : le céfotaxime, la ceftazidime, la céfépime et l'aztréonam.

8.Détection de portage chez le personnel de restauration

-Les recherches de *Salmonella* spp. et de *Staphylococcus aureus* chez les cuisiniers ne diffèrent pas des méthodes classiques.

- Il faut savoir cependant que pour les porteurs sains de *Salmonella* non typhiques ou paratyphiques, même s'il s'agit de personnels de soins ou d'employés des cuisines, les risques de transmissions sont faibles si les conditions et les règles universelles d'hygiène sont bien respectées.

