# Bactériologie médicale
## Techniques usuelles

*CHEZ LE MÊME ÉDITEUR*

***250 examens de laboratoire***, par R. Caquet. 11e édition, 2011, 120 pages.

***Bactériologie médicale***, par Ch. Nauciel. 2e édition, Abrégés connaissances et pratique. 2011, 276 pages.

***Conduite à tenir dans les infections du sujet âgé***, par P. Veyssier, J. Belmin, Abrégés de médecine. 2004, 256 pages.

***Sepsis***, par J.-P. Mira, B. Vallet. Pratique en anesthésie, réanimation et urgences. 2004, 320 pages.

***Risques infectieux en réanimation,*** par J. Carlet, M.-F. Dumay, J.-Ch. Lucet, A. Macrez. Pratique d'anesthésie, de réanimation et d'urgences, 2002, 240 pages.

**Infections nocosomiales et médecine physique et de réadaptation**, par F. Pellas, S. Petiot, N. Kotzki, A. Sotto. Problèmes en médecine de rééducation. 2002, 192 pages.

**Infections en gynécologie**, par Ph. Judlin. Pratique en gynécologie-obstétrique. 2002, 176 pages.

**Infections virales en obstétrique**, par R. Gabriel, Gynécologie-obstétrique. 2001, 168 pages.

# Bactériologie médicale
## Techniques usuelles

*par*
**François Denis**
**Marie-Cécile Ploy**
**Christian Martin**
**Édouard Bingen**
**Roland Quentin**

*Avec la collaboration de :*

*Olivier Barraud, Bertille de Barbeyrac, Cécile Bébéar, Christiane Bébéar, Philippe Bidet, Stéphane Bonacorsi, Christophe Burucoa, Annette Cubertafond, Mireille Drouet, Luc Dubreuil, Fabien Garnier, Nadia Hidri, Benoît Jaulhac, Thierry Lambert, Philippe Lanotte, Jean-Philippe Lavigne, Cécile Le Brun, Jean-Luc Mainardi, Patricia Mariani-Kurkjian, Sylvie de Martino, Valérie Marczuk, Laurent Mereghetti, Marcelle Mounier, Perrine Parize, Nathalie Pestourie, Claude Piva, Alain Philippon, Philippe Riegel, Sylvie Rogez, Jacques Tankovic.*

*2e édition largement revue et actualisée*

*Dessins de*
**Carole Fumat**

ELSEVIER
MASSON

Ce logo a pour objet d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, tout particulièrement dans le domaine universitaire, le développement massif du « photocopillage ». Cette pratique qui s'est généralisée, notamment dans les établissements d'enseignement, provoque une baisse brutale des achats de livres, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.
Nous rappelons donc que la reproduction et la vente sans autorisation, ainsi que le recel, sont passibles de poursuites. Les demandes d'autorisation de photocopier doivent être adressées à l'éditeur ou au Centre français d'exploitation du droit de copie : 20, rue des Grands-Augustins, 75 006 Paris. Tél. 01 44 07 47 70.

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés, réservés pour tous pays.

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective et, d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle).

© 2007, Masson, Paris
*© 2011, Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés*
ISBN : 978-2-294-09668-6

Elsevier Masson SAS, 62, rue Camille-Desmoulins, 92 442 Issy-les-Moulineaux cedex
www.elsevier-masson.fr
Mis en pages par SPI Publisher Services, Pondichéry, Inde
Imprimé en Italie par Printer Trento s.r.l, 38100 Trento
Dépôt légal : novembre 2011.

# Liste des collaborateurs

**Barraud Olivier**, assistant hospitalo-universitaire, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Barbeyrac (de) Bertille**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, responsable du Centre national de référence des infections à *Chlamydiae*, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire Bordeaux 2.

**Bébéar, Cécile M.**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, université Victor Segalen Bordeaux 2.

**Bébéar Christiane**, professeur des universités, praticien hospitalier, chef du service de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, université Victor Segalen Bordeaux 2.

**Bidet Philippe**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de microbiologie, hôpital Robert Debré, Paris.

**Bingen Édouard**, professeur des universités, praticien hospitalier, chef du service de microbiologie, hôpital Robert Debré, Paris.

**Bonacorsi Stéphane**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de microbiologie, hôpital Robert Debré, Paris.

**Burucoa Christophe**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Poitiers, EA 3807 « Diversité génétique et antigénique de *Helicobacter pylori* », université de Poitiers.

**Cubertafond Annette**, praticien hospitalier, pharmacien, responsable de l'unité de stérilisation, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Denis François**, professeur des universités, praticien hospitalier, chef du Pôle Biologie-Hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges. Membre de l'Académie nationale de médecine.

**Drouet Mireille**, praticien hospitalier, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Dubreuil Luc**, professeur de bactériologie clinique, faculté de pharmacie, Lille.

**Garnier Fabien**, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Hidri Nadia**, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Jaulhac Benoit**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, hôpitaux universitaires de Strasbourg.

**Lambert Thierry**, professeur des universités, chef de service adjoint, faculté de Pharmacie Paris XI, laboratoire de la fondation hôpital Saint-Joseph, Paris.

**Lanotte Philippe**, maître de conférences des universités, faculté de pharmacie de Tours, praticien hospitalier, hôpital Bretonneau, centre hospitalier régional et universitaire, Tours.

**Lavigne Jean-Philippe**, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie-virologie-parasitologie, centre hospitalier universitaire Carémeau, Nîmes.

**Le Brun Cécile**, praticien hospitalier, laboratoire de microbiologie, centre hospitalier, Cholet.

**Mainardi Jean-Luc**, professeur des universités, praticien hospitalier, responsable de l'unité mobile de microbiologie clinique, service de microbiologie, hôpital européen Georges Pompidou, faculté de médecine René Descartes, Paris.

**Mariani-Kurkjian Patricia**, praticien hospitalier, hôpital Robert-Debré, Paris.

**Martin Christian**, biologiste des hôpitaux, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Martino (de) Sylvie**, maître de conférences des universités, faculté de médecine Louis Pasteur, Strasbourg, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, hôpitaux universitaires de Strasbourg.

**Marczuk Valérie**, praticien vacataire, laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Mereghetti Laurent**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie-virologie, hôpital Bretonneau, centre hospitalier universitaire Trousseau, Tours.

**Mounier Marcelle**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Parize Perrine**, chef de clinique assistant, service de microbiologie, hôpital européen Georges Pompidou, faculté de médecine René Descartes, Paris.

**Pestourie Nathalie**, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Piva Claude**, professeur des universités, praticien hospitalier, service médecine légale, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Philippon Alain**, professeur émérite, faculté de médecine René Descartes, Paris.

**Ploy Marie-Cécile**, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Quentin Roland**, professeur des universités, praticien hospitalier, chef de service de bactériologie et hygiène hospitalière, centre hospitalier universitaire Trousseau, Tours.

**Riegel Philippe**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, hôpitaux universitaires de Strasbourg.

**Rogez Sylvie**, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges.

**Tankovic Jacques**, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie, centre hospitalier universitaire Saint-Antoine, Paris.

# Abréviations

| | |
|---|---|
| **2SP** | milieu saccharose-phosphate |
| **AAF** | aéro-anaérobie facultatif |
| **ACA** | acrodermatite chronique atrophiante |
| **ADN** | acide désoxyribonucléique |
| **ADH** | arginine dihydrolase |
| **ADR** | arrêté du 25 avril 2000 modifiant l'arrêté du 5 décembre 1996 modifié |
| **AES** | accident d'exposition au sang |
| **AET** | aspiration endotrachéale |
| **Afnor** | Agence française de normalisation |
| **Afssa** | Agence française pour la sécurité sanitaire des aliments |
| **Afssaps** | Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé |
| **AFU** | Association française d'urologie |
| **ALLO** | anticorps antilistériolysine O |
| **ALOA** | Agar listeria Ottaviani Agosti® |
| **AMM** | autorisation de mise sur le marché |
| **Anaes** | Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé |
| **ANC** | acide nalidixique-colistine |
| **APGAR** | moyen chiffré rapide pour évaluer l'état des grandes fonctions vitales à 1 minute de vie dû à Virginia Apgar |
| **ARN** | acide ribonucléique |
| **ARNm** | acide ribonucléique messager |
| **ARNr** | acide ribonucléique ribosomal |
| **ARNt** | acide ribonucléique de transfert |
| **ARS** | Agence régionale de santé |
| **ASD** | antistreptodornases |
| **ASK** | antistreptokinase |
| **ASLO** | antistreptolysines O |
| **ATP** | adénosine triphosphate |
| **ATS** | American Thoracic Society |
| **BAAR** | bacille acido-alcoolo-résistant |
| **BCG** | bacille de Calmette et Guérin |
| **BCM** | *bacillus cereus medium* |
| **BCP** | bromocrésol pourpre |
| **BCSA** | British Columbia Safety Authority |
| **BCYE** | *buffered charcoal yeast extract* |
| **BET** | bromure d'éthidium |
| **BG** | milieu solide de Bordet-Gengou |
| **BHI** | *brain heart infusion* (milieu cœur-cerveau) |
| **BIBI** | Bioinformatics Bacterial Identification |
| **BK** | bacille de Koch |
| **BLAST** | *basic local alignement search tool* |
| **BLSE** | β-lactamase à spectre étendu |
| **BMC** | *bacterial medium chromogenic* |
| **BMR** | bactérie multirésistante |
| **BNAG** | n-acétyl-β-glucosaminidase |
| **BPCO** | bronchopneumopathie chronique obstructive |
| **BPPH** | Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière |
| **BSK** | milieu Barbour-Stoenner-Kelly |
| **BVHRI** | bactéries vaginales à haut risque infectieux |
| **BW** | réaction de Bordet-Wassermann |
| **CagA** | îlot de pathogénicité Cag |
| **CAMP-test** | test de Christie, Atkins, Munch-Petersen |
| **CAP** | colistine et aztréonam |
| **CARDS** | *community acquired respiratory distress syndrome* |
| **CA-SFM** | Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie |
| **CAT** | milieu campylobacter |
| **CDC** | Center for Diseases Control |
| **CE** | corps élémentaire |
| **CE** | marquage de la Communauté européenne |
| **CFTR** | *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* |

| | |
|---|---|
| **CGG** | Commission de génie génétique |
| **CHV** | correspondant d'hémovigilance |
| **Ciddist** | Centre d'information, de dépistage et de diagnostic des infections sexuellement transmissibles |
| **CIE** | contre-immunoélectrophorèse |
| **CIL** | comparaison interlaboratoire |
| **CIN** | cefsulodine-irgasan-novobiocine |
| **CIP** | collection de l'Institut Pasteur |
| **CIQ** | contrôle interne de qualité |
| **CIRE** | Cellule inter-régionale d'épidémiologie |
| **CLED** | cystine-lactose-électrolyte déficient |
| **CLHP** | chromatographie liquide à haute performance |
| **CLIN** | Comité de lutte contre les infections nosocomiales |
| **CLSI** | Clinical Laboratory Standard Institute |
| **CMB** | concentration minimale bactéricide |
| **CMI** | concentration minimale inhibitrice |
| **CMV** | cytomégalovirus |
| **CNA** | colistine et acide nalidixique |
| **CNR** | Centre national de référence |
| **Cofrac** | Comité français d'accréditation |
| **Cp** | *crossing point* |
| **CP** | concentrés plaquettaires |
| **CPM** | concentration de prévention des mutants résistants |
| **CPS** | carte professionnelle santé |
| **CR** | corps réticulé |
| **CRG** | concentrés de globules rouges |
| **CRH** | coordinateur régional d'hémovigilance |
| **CRISPR** | *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* |
| **CRP** | *C-reactive protein* (protéine C-réactive) |
| **CSH** | cellules souches hématopoïétiques |
| **CSHPF** | Conseil supérieur d'hygiène publique de France |
| **Ct** | *threshold cycle* |
| **CT** | toxine cholérique |
| **CTA** | *cystine-tryptic agar* |
| **CTX-M** | céfotaximase-Munich |
| **DAEC** | *diffusely-adhering E. coli* |
| **DAPI** | 4'6-diamino-2-phénylindole |
| **DASRI** | déchets d'activité de soins à risque infectieux |
| **dATP-αS** | nucléotides alpha-thio-dATP |
| **DDASS** | Direction départementale des affaires sanitaires et sociales |
| **ddGTP** | didésoxyribonucléotide à guanine |
| **ddNTP** | didésoxyribonucléotides |
| **DEIA** | *detection immunoenzymatic assay* |
| **DGS** | Direction générale de la santé |
| **DMM** | dose minimale mortelle |
| **DMSO** | diméthyl sulfoxide |
| **dNDP** | désoxydinucléotide phosphate |
| **dNMP** | désoxymononucléotide phosphate |
| **dNTP** | désoxyribonucléotides triphosphates |
| **DOP** | dioctylphtalate |
| **DRASS** | Direction régionale des affaires sanitaires et sociales |
| **DRIRE** | Direction régionale de l'industrie de la recherche et de l'environnement |
| **dTTP** | désoxythymidine triphosphate |
| **DUJ** | dose unique journalière |
| **dUTP** | désoxy-uridine triphosphate |
| **EAT** | épreuve de l'antigène tamponné (test au rose Bengale) |
| **EBLSE** | entérobactérie β-lactamase à spectre élargi (ou étendu) |
| **EBV** | virus d'Epstein-Barr |
| **ECA** | *Enterobacteriaceae common antigen* |
| **ECAD** | *E. coli* à adhésion diffuse |
| **ECBC** | examen cytobactériologique des crachats |
| **ECBU** | examen cytobactériologique des urines |
| **ECEAg ou EAggEC** | *E. coli* entéroagrégatifs (*enteroaggregative E. coli*) |
| **ECEH ou EHEC** | *E. coli* entérohémorragiques |
| **ECEI ou EIEC** | *E. coli* entéro-invasifs |
| **ECEP ou EPEC** | *E. coli* entéropathogènes |
| **ECET ou ETEC** | E. coli entérotoxinogènes |
| **ECP** | effet cytopathogène |
| **EDIN** | *epidermal cell differentiation inhibitor* |
| **EDTA** | acide éthylène diamine tétracétique |
| **EEQ** | évaluation externe de qualité |
| **EI** | endocardite infectieuse |
| **EI** | étalon interne |
| **EIA** | *enzymo-immunoassay* |
| **ELISA** | *enzyme linked immunosorbent assay* |
| **EM** | érythème migrant |
| **EMIT** | *enzyme multiplied immunotechnique* |

**EMJH** milieu de Ellinghausen-MacCullough modifié par Johnson et Harris
**EOH** équipe opérationnelle d'hygiène
**EPA** effet postantibiotique
**EPI** équipements de protection individuelle
**ERG** entérocoque résistant aux glycopeptides
**ERV** entérocoque résistant à la vancomycine
**ESBL** *extended-spectrum β-lactamase*
**EUCALB** European Concerted Action on Lyme Borreliosis (Action concertée européenne sur la Borréliose de Lyme)
**EUCAST** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
**EWGLI** European Working Group for Legionella Infection
**FBC** *fractional bactericidal concentration*
**FFP** *filtering facepiece particles*
**FIA** *fluoro-immunoassay*
**FIC** *fractional inhibitory concentration*
**FPIA** *fluorescence polarization immuno-assay*
**FRET** *fluorescence resonance energy transfer*
**FTA** *fluorescent treponemal antibody test*
**FTA-abs** *fluorescent treponemal antibody absorbed*
**GAS** *Group A Streptococcus*
**GB** globules blancs
**GBEA** Guide de bonne exécution des analyses
**GDH** glutamate déshydrogénase
**GDV** *genomic detection of virus*
**GEFH** Groupe d'études français des Hélicobacters
**GGT** gamma-glutamyl transférase (γGT)
**GISA** *glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides)
**GLU** glucose
**GNA** glomérulonéphrite aiguë
**GPAC** cocci à Gram positif
**GR** globules rouges
**GRSA** *glycopeptide-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* résistant aux glycopeptides)
**GTA** guide technique d'accréditation
**GVPC** BCYE supplémenté en vancomycine, glycine et colistine
**HACEK ou HACCEK** regroupe six espèces de bactéries Gram négatif : *Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Capnocytophaga* spp., *Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens* et *Kingela*
**HAS** Haute autorité de santé
**HEG** hexéthylène glycol
**HEGP** hôpital européen Georges Pompidou
**HEK** gélose Hektoen
**HEPA** *high efficiency particulate air*
**HGA** *human granulocytic anaplasmosis*
**hGISA** *heterogeneous glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* de résistance hétérogène aux glycopeptides)
**HME** *human monocytosis Erhlichiosis*
**HPST** loi Hôpital, patients, santé et territoires
**HSV-1, HSV-2** virus *Herpes simplex* de type 1 ou 2
**HTM** *haemophilus test medium*
**I** inosine
**IC** immunochromatographie
**IC** intervalle de confiance
**ICSP** International Committee on Systematics of Prokaryotes
**IDR** intradermoréaction
**IF** immunofluorescence
**IFD** immunofluorescence directe
**IFI** immunofluorescence indirecte
**IFLA** *immunoluminometric assay*
**IFMA** *immunofluorometric assay*
**IG** immunoglobuline
**IGRA** *interferon γ release assay*
**IL** interleukine
**IM** intramusculaire
**INF** interféron
**INRS** Institut national de recherche et de sécurité
**InVS** Institut national de veille sanitaire
**IPP** identifiant permanent du patient

**IPP** inhibiteur de la pompe à protons
**IRMA** *immunoradiometric assay*
**IST** infection sexuellement transmissible
**ITCB** incident transfusionnel par contamination bactérienne
**ITL** infection tuberculeuse latente
**ITS** infection transmise sexuellement
**ITU** infection du tractus urinaire
**IV** intraveineux
**i.v.** iso-valérique
**JK** *Corynebacterium jeikeium*
**KCN** cyanure de potassium
**KPC** *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase
**LAC** lactose
**LBA** liquide bronchoalvéolaire
**LBM** laboratoire de biologie médicale
**LCR** *ligase chain reaction*
**LCR** liquide céphalorachidien
**LDC** lysine décarboxylase
**LGV** lymphogranulome vénérien ; lymphogranulomatose vénérienne ; *lymphogranuloma venereum*
**LIA** *lumino-immunoassay*
**LiPA** *line probe assay*
**LLAP** *legionella-like-amoebal pathogens*
**LNE** Laboratoire national d'essai
**LPS** lipopolysaccharide
**LPSN** List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature
**LT** entérotoxine thermolabile
**MAC** mycobactéries du complexe aviaire
**MAI** maladie auto-immune
**MALDI-TOF** *matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight*
**MALT** *mucosa associated lymphoid tissue*
**MAP** menace d'accouchement prématuré
**MAT** *microscopic agglutination test* (test d'agglutination microscopique)
**mCCD** *modified cefoperazone charcoal deoxycholate* (milieu campylobacter-charbon)
**MCLO** *mycobacterium chelonae like-organism*
**MDO** maladies à déclaration obligatoire
**MEVAG** milieu de Hugh et Leifson
**MEYP** milieu *mannitol-egg yolk-polymyxin B agar*
**MGG** coloration de May-Grünwald-Giemsa
**MGIT** *mycobacteria growth indicator tube*
**MH** gélose de Mueller-Hinton
**MIF** micro-immunofluorescence
**MIRU-VNTR** *mycobacterial interspersed repetitive units – variable number of tandem repeats*
**MLEE** *multilocus enzyme electropherotype*
**MLSK** macrolides-lincosamides-streptogramines-kétolides
**MLST** *multilocus sequence typing*
**MNT** mycobactérie non tuberculeuse
**MOMP** *major outer membrane protein* (protéine majeure de membrane externe)
**MRS** milieu de Man, Rogosa et Sharpe
**MSCRAMMS** *microbial surface component reacting with adhesive matrix molecules*
**MST** *multispacer sequence typing*
**MST** maladie sexuellement transmissible
**MVLA** *multilocus variable number of tandem repeats analysis*
**NAD** nicotinamide adénine dinucléotide ou coenzyme I
**NASBA** *nucleic acid sequence based amplification*
**NBT** nitro blue de tétrazolium
**NCBI** National Center for Biotechnology Information
**OADC** acide oléique, albumine, dextrose, catalase
**ODC** ornithine décarboxylase
**OFPBL** *oxidative-fermentative-polymyxin B-bacitracin-lactose agar*
**OGM** organisme génétiquement modifié
**OLA** *oligonucleotide ligation array*
**OM** *outer membrane (protéine de surface)*
**OMA** otite moyenne aiguë
**OMS** Organisation mondiale de la santé
**ONERBA** Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques
**ONPG** ortho-nitro-phényl-galacto-pyranoside
**PaGIA** *particle gel immunoassay*
**PAS** *periodic acid schiff*
**pb** paire de bases
**PBS** *phosphate buffer saline* (tampon phosphate)
**PCR** *polymerase chain reaction*
**PCT** procalcitonine plasmatique

**PEG** polyéthylène glycol
**PEMBA** milieu *polymyxin B-egg yolk-mannitol-bromothymol blue agar*
**PFGE** *pulsed field gel electrophoresis*
**PG** peptidoglycane
**PHA** *passive hemagglutination* (hémagglutination passive)
**PK/PD** *pharmacokinetics/pharmacodynamics*
**PL** ponction lombaire
**PLET** polymyxine, lysozyme, EDTA, acétate de thallium
**PLP** protéines de liaison à la pénicilline
**PMA** procréation médicalement assistée
**PNPG** para-nitro-phényl-galacto-pyranoside
**POMP** *polymorphic outer membrane protein*
**PRA** *PCR-restriction enzymatic analysis*
**PRP** polyribosil ribitol phosphate
**PSL** produits sanguins labiles
**PSM** poste de sécurité microbiologique
**PSP** ponction vésicale sus-pubienne
**PT** purpura thrombopénique
**PTI** purpura thrombopénique infectieux
**PTT** purpura thrombotique thrombopénique
**PUI** pharmacie à usage intérieur
**PYR** test de l'hydrolyse du pyroglutamate ; L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide
**PYRA** pyrrolidonyl arylamidase
**R** *rough*
**RAA** rhumatisme articulaire aigu
**RAPD** *random amplified polymorphic DNA*
**RAQ** responsable assurance qualité
**RENACHLA** Réseau national des Chlamydiae
**RENAGO** Réseau national des gonocoques
**RFLP** *restriction fragment length polymorphism* (restriction enzymatique)
**RIA** *radio-immunoassay*
**RIA** radio-immunologique
**RIB** ribose
**RIC** *Clostridium ramosum, innocuum, clostridioforme*
**RLU** *relative light unit*
**RM** réaction rouge de méthyle
**RPM** rupture prématurée des membranes
**RPR** *rapid plasma reagin*
**RR** risque relatif
**S** *smooth*
**SA** semaine d'aménorrhée
**SARM** *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
**SAW** séroagglutination de Wright
**SBA** *sheep-blood-agar* (gélose de base Columbia additionnée de sang de mouton)
**SCN** staphylocoques à coagulase négative
**SDA** Strand Displacement Amplification®
**SDS** sodium-dodécyl-sulfate
**SFHH** Société française d'hygiène hospitalière
**SFM** Société française de microbiologie
**SG** sérum Sven Gard
**SGA** streptocoque β-hémolytique du groupe A
**SGL** système de gestion de laboratoire
**SHA** solution hydroalcoolique
**SHU** syndrome hémolytique et urémique
**SHV** sulfhydryl variable
**SIL** système informatique de laboratoire
**SIR** Sensibilité-Intermédiaire-Résistance Scan®
**SMAC** *sorbitol MacConkey agar* (milieu de MacConkey au sorbitol)
**SMID** *salmonella medium identification-detection*
**SMQ** système de management de la qualité
**SNP** *single nucleotides polymorphism*
**SPHA** *solid phase hemadsorption assay*
**SPILF** Société de pathologie infectieuse de langue française
**SPS** *sodium polyanethol sulfonate* (polyanéthol sulfonate de sodium)
**SRIS** syndrome de réponse inflammatoire systémique
**SS** *Salmonella Shigella*
**SSTT** système de sécrétion type III
**ST** entérotoxine thermostable
**ST** séquence type
**STB** streptocoque du groupe B
**STEC** *Escherichia coli* entérohémorragique
**TAAN** test d'amplification de l'acide nucléique
**TCBS** thiosulfate-citrate-bile-saccharose

| | |
|---|---|
| **TCCA** | taurocholate, cyclosérine, céfoxitine agar |
| **TDA** | tryptophane désaminase |
| **TDR** | tests de diagnostic rapide |
| **TEM** | Temoneira (nom de patient) |
| **TGV** | transport de germes vivants |
| **TIAC** | toxi-infection alimentaire collective |
| **Tm** | *melting temperature* |
| **TMD** | transport des marchandises dangereuses |
| **TNF** | *tumour necrosis factor* |
| **TP** | temps de prothrombine |
| **TPHA** | *treponema pallidum haemagglutination assay* |
| **TPI** | *treponema pallidum immobilization test* (test d'immobilisation des tréponèmes) |
| **TPPA** | *treponema pallidum particle agglutination assay* |
| **TS** | gélose trypticase soja |
| **TSH** | *tryptone-soja-horse blood* (gélose TS additionnée de sang de cheval) |
| **TSI** | *Triple-Sugar-Iron* |
| **TSST** | *toxic shock syndrome toxin* |
| **TTG** | taurocholate-tellurite-gélatine |
| **TWAR** | *Taiwan acute respiratory disease* |
| **UCC** | unité de changement de couleur |
| **UFC** | unité formant une colonie |
| **UFS** | unité formant un spot |
| **UI** | unité internationale |
| **UNG** | urétrite non gonococcique |
| **UTI** | *urinary tract infection* |
| **UV** | ultraviolet |
| **VacA** | cytotoxine vacuolisante |
| **VCAT** | vancomycine, colistine, amphothéricine B, triméthoprime |
| **VCF** | vancomycine, colistine, fungizone |
| **VCN** | vancomycine, colistine, nystatine |
| **VCNT** | vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime |
| **VDRL** | Veneral Disease Research Laboratory |
| **VF** | gélose viande-foie |
| **VHB** | virus de l'hépatite B |
| **VHC** | virus de l'hépatite C |
| **VIH** | virus de l'immunodéficience humaine |
| **VISA** | *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire à la vancomycine) |
| **VP** | réaction de Voges-Proskauer |
| **VPN** | valeurs prédictives négatives |
| **VPP** | valeurs prédictives positives |
| **VRSA** | *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine) |
| **VS** | vitesse de sédimentation |
| **VZV** | virus de la varicelle et du zona |
| **WB** | *Western-blot* ou immunotransfert |

# Introduction

*Ouvrage dédié à la mémoire de Nicole DENIS*

Il existe de nombreux manuels ou traités de bactériologie permettant d'acquérir des connaissances de base, ou plus fondamentales, sur les bactéries et les maladies dont elles sont responsables.

Mais, on dispose de très peu de « livres de paillasses » anglo-saxons ou français permettant d'avoir une vision d'ensemble du traitement d'un produit pathologique ou de la démarche diagnostique devant une suspicion clinique ou en présence d'un isolement bactérien d'identification difficile.

Il y a près d'un quart de siècle, un ouvrage ayant cet objectif, *Bactériologie médicale : techniques usuelles* de B. Carbonnelle, F. Denis, A. Marmonier, G. Pinon et R. Vargues avait été publié chez SIMEP. Ce livre souvent appelé « Le Carbonnelle » n'a pas été réédité depuis 1987, introuvable d'occasion, est encore présent dans de nombreux laboratoires, sur la paillasse, au prix de réparations montrant qu'il s'agit d'un bien d'usage.

Plusieurs coordonnateurs ou participants à cet ouvrage sont retraités ou disparus, tel Robert Vargues, initiateur de ce travail commun aux bactériologistes hospitaliers et hospitalo-universitaires de l'Ouest de la France.

Aussi, quand les éditions Masson nous ont proposé de reprendre le flambeau « vingt ans après » en 2007 pour réaliser un ouvrage dans le même esprit, nous avons accepté, avec enthousiasme, de mener à bien ce challenge en actualisant, bien sûr, les connaissances et en utilisant une iconographie en quadrichromie de qualité. Devant le succès remporté par cette première édition et des retirages, il a été décidé de rédiger une deuxième édition (2011) en gardant le même titre *Bactériologie médicale : Techniques usuelles*.

L'esprit de l'ouvrage et le plan restent identiques.

La première partie traite des technologies générales, c'est-à-dire du laboratoire, de la démarche, des outils utilisés dans le diagnostic classique et les enquêtes épidémiologiques, et des démarches qualité qui doivent être respectées.

La seconde partie constitue la suite logique, c'est-à-dire la technologie concernant les prélèvements que le laboratoire doit analyser en faisant le point sur les technologies nouvelles qui ont beaucoup évolué depuis la première édition.

La troisième partie de systématique, concerne l'identification précise des germes, en évoquant les différentes pathologies induites par ces germes et en détaillant les différentes approches diagnostiques directes ou sérologiques, classiques et modernes.

La quatrième partie traite de l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et de l'antibiogramme, ainsi que des notions de dosage et de pharmacocinétique des antibiotiques. Mais il faut rappeler ici que cet ouvrage n'a pas pour but d'être exhaustif, ainsi l'étude de la sensibilité aux antibiotiques n'est abordée que sous un aspect très concret, global, ne faisant pas concurrence à l'ouvrage récemment réédité sur l' « Antibiogramme » qui constitue une référence.

Enfin, la dernière partie a l'ambition d'être pratique, en donnant les coordonnées des centres de référence, les adresses des fabricants afin de faciliter le biologiste dans sa pratique quotidienne.

Tout au long de l'ouvrage, l'objectif a été de rester pragmatique, il est destiné à rendre service à des laboratoires réalisant une bactériologie de routine, tant dans un contexte privé qu'hospitalier.

Le projet est ambitieux car les bactériologistes sont de plus en plus tenus à un grand écart entre une bactériologie historique avec une démarche « pastorienne » et une bactériologie de pointe transformée par les outils de biologie moléculaire avec caractérisation génomique, antigénique, protéique permettant des diagnostics d'espèces soit en partant directement des produits pathologiques, soit en pratiquant une identification précise sur culture lorsque l'interprétation à l'aide des galeries traditionnelles est incertaine ou plus lente.

Entre ces deux voies, il faut prendre conscience du caractère provisoire de notre arsenal, il importe ne pas être figé dans le carcan d'un GBEA inchangeable et s'inspirer de la réflexion de Charles Nicolle dans *Le Destin des maladies infectieuses* en 1893 : « Ne rien imposer de définitif, laisser une certaine liberté pour le choix des méthodes […] laisser la part aux simplifications, aux progrès, aux audaces doit être la règle, la règle des commissions […] si elles en oubliaient la sagesse, les meilleures acquisitions, après une période d'avantages plus ou moins longue, se dresseraient contre les perfectionnements ».

Les contrôles de qualité et la qualité, trop longtemps négligés par les microbiologistes, occupent une place croissante, légitime, mais ils doivent rester raisonnables en terme de praticabilité et de coût.

Charles Nicolle poursuivait : « Il est d'autres moyens […], mais qui jouent un rôle important dans la lutte contre les maladies. L'un des plus importants est la rapidité du diagnostic, l'aide qu'y apporte le laboratoire est des plus précieuse. Plus vite la maladie est reconnue, plus vite on peut prendre les précautions utiles pour empêcher sa diffusion » ; et nous pourrions rajouter, pour permettre une prise en charge rapide et spécifique de l'infection et du patient. Nous vivons une étape décisive en ce qui concerne la rapidité et la qualité du diagnostic à l'aube d'un « antibiogramme » ou d'une détection de mécanisme de résistance quasi instantanée. Le présent ouvrage se veut être pratique, mais cela ne suffit pas, ce ne sont pas les bons livres de recette qui font les bons cuisiniers mais ils peuvent stimuler l'imagination des chefs !

Nous tenons à remercier très vivement les différents auteurs qui ont participé à la rédaction de cet ouvrage, ils ont été sollicités pour leur compétence dans des domaines particuliers, ils ont tous accepté avec enthousiasme de prendre part à cette aventure.

Enfin, ce livre n'aurait pas vu le jour sans le dynamisme et le dévouement d'Isabelle secrétaire du laboratoire de Bactériologie du CHU de Limoges, et sans les encouragements de Nicole Denis qui a voulu que ce projet aboutisse.

Cette deuxième édition n'aurait pas non plus pu voir le jour sans la forte implication de Jean-Baptiste Roux des éditions Elsevier-Masson.

François Denis
Marie-Cécile Ploy
Christian Martin, Édouard Bingen, Roland Quentin

CHAPITRE

# 1 Remarques liminaires

F. Denis

Le biologiste a l'entière responsabilité de l'examen bactériologique des prélèvements de la phase préanalytique jusqu'au résultat.

Il est bien évident que l'organisation, les locaux, les équipements, la compétence du personnel technique et d'encadrement interviennent dans la qualité des résultats.

Dans le chapitre de technologie générale, nous n'aborderons pas le problème trop vaste des locaux qui doit prendre en compte la spécificité de la technologie bactériologique, notamment la prévention des contaminations des échantillons et des manipulateurs. Mais seront développés les aspects touchant à la sécurité, à la stérilisation et à la maîtrise de la qualité qui occupent une place croissante.

Les aspects touchant à la démarche à suivre dans un laboratoire méritent d'être rappelés et développés, car le respect des étapes et la compréhension et la maîtrise des paramètres étudiés sont primordiaux pour tout bactériologiste débutant qui ne doit pas faire une confiance aveugle aux pratiques mises en place avant son arrivée dans un laboratoire ou pour tout bactériologiste confirmé qui doit redouter les dérives d' « habitudes ». Tous les bactériologistes doivent avoir conscience que, tout comme les humains, les automates aussi ont leurs limites.

Nous n'en sommes pas encore au stade du « tout moléculaire », mais ces techniques permettant dans des délais très courts des diagnostics d'espèce à partir de culture tendront de plus en plus vers la recherche et l'identification bactérienne directement sur le produit pathologique. Demain, ces techniques tendront vers une approche syndromique, en passant au-delà des frontières traditionnelles (bactéries, virus, parasites). Dans un premier temps, on se limite à une recherche spécifique afin de porter des diagnostics difficiles ou rapides devant une urgence. La recherche de résistance aux antibiotiques (par détection du support moléculaire de la résistance) directement sur les prélèvements n'est pas encore entrée dans la routine mais est enthousiasmante, comme c'est le cas pour la détection simultanée de *Mycobacterium tuberculosis* et de la résistance à la rifampicine sur crachats.

De plus, les germes une fois identifiés, ces outils moléculaires permettent des comparaisons de souches dans une perspective épidémiologique.

Les laboratoires de bactériologie ont un rôle croissant dans la détection de porteurs « à risque » du fait d'une espèce bactérienne ou d'une résistance aux antibiotiques particuliers.

Enfin, l'informatique révolutionne la vie des laboratoires en permettant des améliorations en termes de prescription, de traçabilité des prélèvements, de rendu des résultats, de gestion des souchothèques, des sérothèques ; l'accès à différents sites permet de compléter les connaissances, de mieux identifier les souches, voire de comparer les résultats obtenus à des banques de données.

Cette partie n'a pas vocation à être exhaustive, mais elle met l'accent sur certains points qui nous semblent essentiels dans le bon fonctionnement d'un laboratoire, ainsi que sur une analyse critique des résultats.

CHAPITRE

# 2 Démarche de l'examen bactériologique

P. Lanotte, L. Mereghetti, R. Quentin

Les objectifs de la démarche de l'analyse bactériologique sont divers. Le plus fréquemment, il s'agit pour le laboratoire de mettre en évidence la ou les bactéries responsables d'une infection, d'effectuer une identification précise du ou des pathogènes et de tester sa (leurs) sensibilité(s) aux antibiotiques habituellement actifs sur cette ou ces bactérie(s). Dans certains cas, il s'agit de s'assurer que la bactérie initialement responsable de l'infection pour laquelle un traitement antibiotique a été entrepris est bien éradiquée. Dans d'autres cas, il peut s'agir de rechercher un portage bactérien.

Les moyens de diagnostiquer une infection bactérienne sont de deux ordres, les méthodes de diagnostic direct et les méthodes de diagnostic indirect. Les méthodes directes regroupent les techniques qui permettent de mettre en évidence tout ou partie de la bactérie. Les méthodes mettant en évidence les bactéries dans leur intégralité sont fondées principalement sur les techniques de microscopie en absence de coloration (état frais) ou après coloration et sur les techniques de culture sur milieu artificiel. La détection d'antigènes spécifiques de la bactérie ainsi que les méthodes de mise en évidence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) spécifiques de la bactérie constituent les autres méthodes de diagnostic direct. Les méthodes de diagnostic indirect correspondent aux techniques de détection d'anticorps développés par l'organisme infecté en réponse à l'agression par la bactérie pathogène. Il s'agit dans ce cas des méthodes de sérodiagnostic. Les méthodes indirectes ne seront pas abordées dans ce chapitre.

## Prélèvements

Les prélèvements permettant de mettre en évidence une bactérie responsable d'une infection dépendent du site anatomique atteint, mais peuvent correspondre à des liquides biologiques dans lesquels la bactérie ou des antigènes bactériens peuvent être détectés.

Les échantillons biologiques sont prélevés dans des flacons stériles puis transmis au laboratoire le plus rapidement possible.

Un élément majeur caractérise les prélèvements lorsqu'ils sont mis en culture. Il s'agit de la présence éventuellement associée d'une flore bactérienne ou d'une contamination par cette même flore lors du prélèvement. Certains prélèvements proviennent de sites normalement stériles (liquide céphalorachidien, liquide articulaire, sang, biopsies, etc.) pour lesquels une contamination est très peu probable si la désinfection cutanée préalable au prélèvement a été correctement exécutée. L'interprétation de ces prélèvements est relativement aisée. Dans d'autres cas, le prélèvement provient d'un site anatomique normalement stérile mais la contamination par une flore endogène est pratiquement obligatoire (par exemple les prélèvements pulmonaires profonds comme les brossages distaux, même s'ils sont protégés). Enfin, lorsque la bactérie responsable de l'infection est associée à une flore endogène (c'est le cas dans les infections digestives, les infections cutanées, les angines, etc.), la présence de cette flore va interférer inévitablement avec l'isolement de la bactérie, ce qui nécessitera l'utilisation de milieux sélectifs et/ou de milieux d'enrichissement (voir infra). Par ailleurs – il est vrai essentiellement dans les infections cutanées –, il faut distinguer les prélèvements superficiels et les prélèvements profonds, seuls ces derniers présentant un intérêt médical réel.

Ces prélèvements sont soit de consistance liquide (urine, liquide céphalorachidien, liquides d'épanchement, etc.), soit de consistance solide (sécrétions visqueuses, des tissus, des biopsies, etc.), soit enfin du matériel (chambres implantables, cathéters, redons, drains, matériel prothétique, etc.). Dans le cas des hémocultures, le prélèvement de sang est directement mis dans un flacon de culture dès le prélèvement.

En fonction du type de prélèvement, l'analyse bactériologique sera complétée par une analyse cytologique qui permet d'orienter vers une étiologie bactérienne ou virale en fonction du type de cellules retrouvé.

## Schéma de la démarche

La démarche classique de l'analyse effectuée au laboratoire pour la mise en évidence d'une bactérie à partir d'un prélèvement est schématisée à la figure 2.1.

## Examen microscopique

L'analyse d'un prélèvement effectué dans un but diagnostique est en règle générale une analyse à la fois cytologique et bactériologique. Ainsi, l'examen microscopique est une étape clé dans la démarche diagnostique des infections bactériennes.

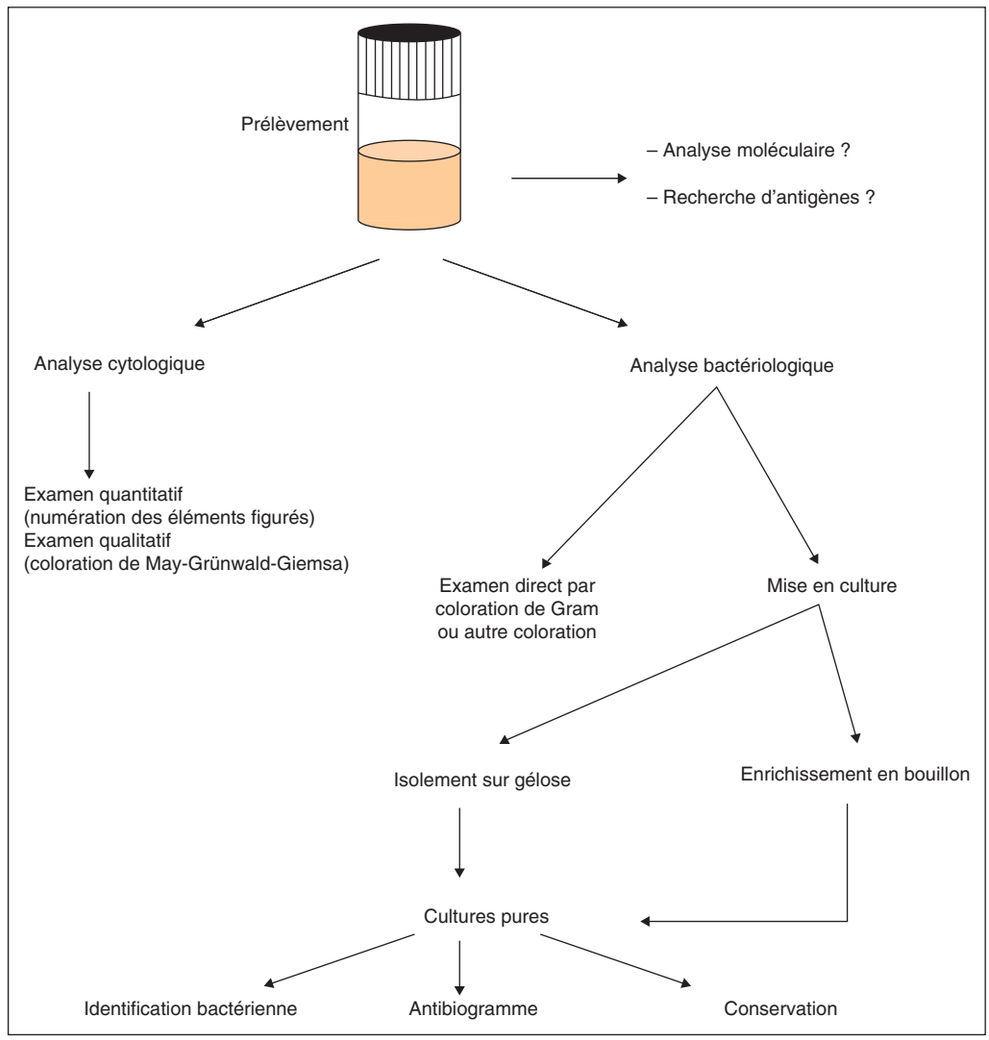



**Fig. 2.1.** – *Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique.*

## Analyse cytologique

L'analyse cytologique doit répondre à un ou deux objectifs en fonction de la nature de l'échantillon. Il peut s'agir d'une analyse quantitative qui va permettre de répondre en nombre d'éléments figurés par unité de volume (millimètre cube ou microlitre, millilitre). Cette numération est effectuée pour les prélèvements de nature liquide (liquides céphalorachidiens, urines, liquides articulaires, liquides pleuraux, etc.). Une analyse qualitative précisant la nature des éléments figurés observés sera effectuée sur la plupart des prélèvements précédemment cités lorsqu'une réaction cellulaire aura été mise en évidence. Cette analyse qualitative sera quant à elle également effectuée pour les prélèvements de nature solide (biopsies, tissus, écouvillonnages, etc.). Lorsque des éléments figurés seront présents, la richesse en ces éléments sera évaluée (rares, présence, nombreux) et leur nature sera précisée.

Dans le cas particulier des prélèvements respiratoires, l'appréciation de la qualité du prélèvement sera fondée sur une évaluation quantitative du nombre de leucocytes et de cellules épithéliales par champ microscopique (objectif 10).

### *Analyse quantitative*

La quantification des éléments est effectuée manuellement ou bien, plus récemment, en utilisant des systèmes automatiques de comptage, en particulier pour les prélèvements d'urine.

#### Systèmes manuels de comptage

Ces systèmes font appel à des hémocytomètres ou hématimètres communément appelés cellules. Ces cellules sont réutilisables comme les cellules de Lemaur ou de Malassez par exemple, ou bien à usage unique comme les Kovaslide®. Le liquide biologique est analysé directement ou après ajout d'un colorant des noyaux (bleu de toluidine)

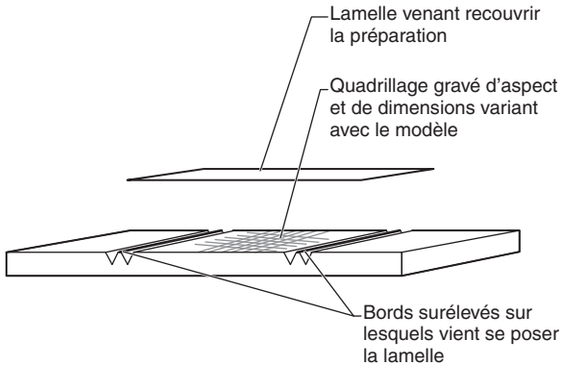



**Fig. 2.2.** – *Éléments composant une cellule pour analyse quantitative.*

qui, dans certains cas, permet de faciliter la détection des éléments figurés.

### *Cellules réutilisables*

Les différentes cellules sont constituées de la même façon (fig. 2.2). Il s'agit d'une épaisse lame porte-objet en verre, quadrillée en son centre, qui présente de part et d'autre des plateaux surélevés qui permettent, lorsque ceux-ci reçoivent une lamelle, de définir un volume de liquide défini propre à chaque cellule.

Les cellules utilisées dépendent des habitudes de l'utilisateur ainsi que de la cellularité des milieux étudiés. Pour les milieux riches en cellules, l'hématimètre de Thoma permet l'étude d'un volume de 0,1 µl, et la cellule de Malassez, l'etude de 1 µl. Pour des milieux où les éléments figurés sont rares, des volumes plus importants peuvent être analysés ; la cellule de Lemaur permet d'étudier jusqu'à 40 µl et celle de Nageotte par exemple jusqu'à 50 µl.

### *Cellules à usage unique*

Les cellules à usage unique type Kovaslide® présentent l'avantage de regrouper sur un même support 10 cellules, ce support étant jeté après utilisation sans désinfection contrairement aux cellules précédentes (fig. 2.3). Le volume étudié est de 1 µl.

## Utilisation de systèmes automatiques de comptage

Les systèmes automatiques de comptage utilisent l'urine native avec un volume d'échantillon analysé voisin de 0,8 à 1 ml. Ces systèmes sont fondés soit sur une coloration des éléments urinaires avec différents colorants fluorescents qui sont ensuite comptés et différenciés par cytométrie en flux, soit par cytométrie en flux avec capture d'images associée à une reconnaissance automatique des particules. Dans ce dernier cas, toutes les particules sont numérisées et mémorisées. Ces systèmes sont connectables au système informatique de laboratoire.

**Fig. 2.3.** – *Cellule Kovaslide® sur la platine d'un microscope.*

## *Analyse qualitative*

Afin de connaître avec précision la nature des éléments figurés observés lors de l'analyse quantitative, l'étalement du prélèvement avant ou après centrifugation suivi d'une coloration est indispensable. La finesse de l'étalement du frottis est importante pour une observation de qualité. Ce frottis doit être réalisé, dans la mesure du possible, rapidement après le prélèvement car certains éléments cellulaires se dégradent vite, en particulier dans les liquides pauvres en protéines comme les urines ou le liquide céphalorachidien. La fixation des frottis est effectuée en recouvrant de méthanol la préparation jusqu'à évaporation.

Les méthodes de centrifugation douces sont intéressantes pour les liquides contenant peu de cellules et l'utilisation d'une cytocentrifugeuse permet d'obtenir un dépôt cellulaire de très bonne qualité.

La coloration cytologique effectuée est la coloration de May-Grünwald-Giemsa. La méthode classique consiste à déposer sur le frottis préalablement fixé la solution de May-Grünwald et à la laisser agir 5 minutes. Après un lavage à l'eau de 1 minute, la solution de Giemsa est laissée en contact 15 minutes. Après un dernier lavage à l'eau, la préparation est laissée séchée puis observée à l'immersion. Cette coloration permet de colorer les noyaux en bleu, le cytoplasme en rose et les bactéries, lorsqu'elles sont présentes, en bleu. Il existe des colorations dérivant de la méthode de May-Grünwald-Giemsa qui sont plus rapides et permettent d'obtenir un résultat satisfaisant en quelques minutes.

Les frottis réalisés dans ces conditions sont également colorés par la coloration de Gram qui ne permet qu'une observation grossière de la morphologie des cellules.

## Examen microscopique bactériologique

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais), ou bien après coloration de l'échantillon, ou encore après réaction d'immunofluorescence. Cet examen renseigne sur la présence de bactéries confirmant l'origine bactérienne d'une infection (morphologie, propriétés tinctoriales particulières après coloration de Gram ou coloration de Ziehl-Neelsen), ce qui représente un élément majeur pour une prise en charge thérapeutique adaptée. Ainsi, cet examen oriente sur une famille de bactéries ou un genre bactérien, permettant d'adapter ou de modifier une antibiothérapie. En fonction du prélèvement ou du contexte clinique, il peut dans certains cas, en quelques minutes, identifier de façon quasi certaine un pathogène.

L'examen renseigne également sur la quantité de bactéries présentes dans le prélèvement. Si l'on estime que, lors d'une observation à un grossissement de 1000 fois (oculaire de 10 et objectif 100 à l'immersion), le volume observé correspond à 1/1000$^{e}$ de µl, alors l'estimation de la quantité de bactéries visibles lors d'un examen direct peut être donnée selon le tableau 2.1.

### *Examen direct à l'état frais*

Les méthodes fondées sur la technique de l'état frais correspondent à l'observation d'un matériel biologique ou d'une suspension bactérienne entre lame et lamelle sans fixation préalable du matériel par la chaleur ou l'alcool.

### État frais

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40. Les renseignements obtenus par cette observation concernent principalement la mobilité des bactéries. Il faut cependant être prudent sur le fait que des courants de convection dans ces conditions peuvent être présents et perturber l'observation. En fonction de la mobilité observée, si elle est présente, on peut préjuger du type de ciliature de la bactérie (monotriche, péritriche, etc.), ce qui oriente sur la bactérie en cause. Ainsi, par sa mobilité, *Pseudomonas aeruginosa* par exemple peut se distinguer aisément d'une entérobactérie. Cet examen peut s'avérer très utile lors de la positivité d'une hémoculture. En effet, un doute peut persister sur l'orientation d'identification, après coloration de Gram d'un étalement du bouillon d'hémoculture coloré. Une mobilité importante avec des bacilles qui traversent le champ microscopique est en faveur de *P. aeruginosa* alors qu'une entérobactérie mobile sera mobile sur elle-même dans la majorité des cas.

Certaines bactéries de mobilité caractéristique sont également repérées par la technique de l'état frais, comme les vibrions ou les campylobactéries.

Cet examen peut être effectué après avoir luté la lamelle sur la lame, c'est-à-dire après avoir déposé sur la totalité du pourtour de la lamelle un peu de paraffine préalablement fondue (fig. 2.4). Cette méthode permet de « sceller » la lamelle et ainsi d'empêcher les courants de convection. Dans ces conditions, une observation à l'immersion peut être effectuée.

**TABLEAU 2-1**

**Estimation de la quantité de bactérie par ml de prélèvement en fonction de la quantité de bactérie visible au microscope à un grossissement de 1000 fois.**

| *Nombre de bactéries par champ* | *Quantité de bactéries par ml* |
|---|---|
| 1 bactérie par 100 champs | $10^4$ bactéries/ml (seuil estimé de sensibilité du microscope optique) |
| 1 bactérie par 10 champs | $10^5$ bactéries/ml |
| 1 bactérie par 1 champ | $10^6$ bactéries/ml |
| 10 bactéries par champ | $10^7$ bactéries/ml |
| 100 bactéries par champ | $10^8$ bactéries/ml |

### État frais pour mise en évidence d'une capsule par méthode à l'encre de Chine

La mise en évidence d'une capsule bactérienne peut être effectuée par coloration « négative », les capsules ne se colorant pas en présence d'encre de Chine. Néanmoins, en pratique quotidienne, cette technique est principalement utilisée pour la mise en évidence de la capsule de *Cryptococcus neoformans*, une levure impliquée dans des infections du système nerveux central chez le patient immunodéprimé, en particulier pour les malades VIH positifs. Un état frais après coloration du produit pathologique prélevé (en l'occurrence le liquide céphalorachidien pour les cryptocoques) peut être réalisé. Une goutte du liquide pathologique et une goutte d'encre de Chine sont déposées côte à côte sur une lame. Une lamelle vient recouvrir les deux gouttes et les deux constituants se mélangent. Lorsque ces levures capsulées sont présentes, elles sont visibles par la présence d'un large halo clair, correspondant à la capsule fungique, autour d'une levure éventuellement bourgeonnante.

### État frais sur un microscope à fond noir

Un état frais particulier permet, lorsque le microscope dispose d'un condensateur particulier, d'observer les bactéries par contraste. En effet, les rayons lumineux émis par la source d'éclairage sont déviés par réflexion sur un miroir de telle sorte qu'ils ne peuvent pénétrer l'objectif. Lorsqu'un élément est présent sur ce trajet lumineux, il modifie le trajet des rayons lumineux qui se trouvent réfractés et pénètrent dans l'objectif. Les éléments apparaissent brillants sur fond noir. Cette technique est intéressante pour les bactéries mobiles qui sont difficilement

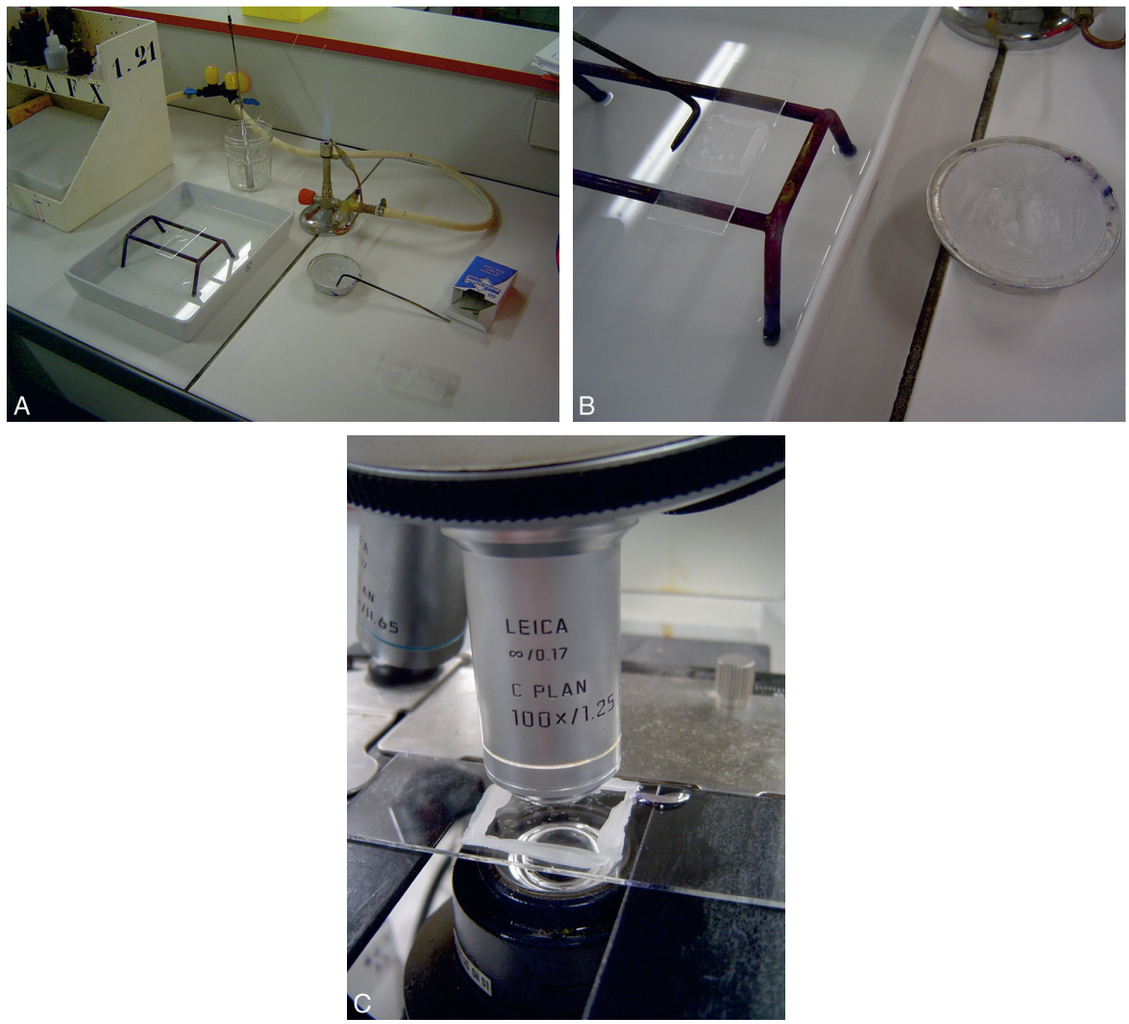



**Fig. 2.4.** – *Réalisation de l'état frais après avoir luté la lamelle sur la lame.*
A) La lame est posée sur un chevalet ; la paraffine va être fondue en chauffant au bec Bunsen une tige métallique. B) Les quatre côtés de la lamelle vont être scellés par la paraffine. C) Observation à l'immersion, objectif 100, de la préparation.

colorables par les colorations classiques. Ainsi, les spirochètes et en particulier les tréponèmes (fig. 2.5) et les leptospires sont facilement repérables à l'aide de cette méthode, avec visualisation de la mobilité et présence de spires régulières pour les premiers et mise en évidence d'une mobilité par flexion pour les seconds.

## *Examen microscopique après coloration*

Les techniques les plus communément utilisées au laboratoire de bactériologie médicale font appel à des colorations. La préparation est fixée sur une lame puis colorée. Plusieurs types de coloration existent. Les colorations non différentielles, anciennes, peu utilisées en pratique, colorent toutes les bactéries de la même façon sans distinction, si ce n'est qu'elles permettent de mieux visualiser les morphologies bactériennes et de préciser les agencements des bactéries les unes avec les autres. Les colorations différentielles distinguent les bactéries en fonction de la structure de leur paroi. Deux colorations de référence sont employées, la coloration de Gram distinguant bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif, et la coloration de Ziehl-Neelsen mettant en évidence les bacilles acido-alcoolo-résistants. Certaines colorations spéciales seront ensuite abordées.

### Coloration non différentielle – coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène est réalisée en faisant couler une solution de bleu de méthylène sur un frottis correctement fixé. Le temps de contact est d'une minute.

Fig. 2.5. – *Examen direct au microscope à fond noir de* Leptospira interrogans *(photo Mathieu Picardeau, Unité Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur).*

La lame est ensuite rincée à l'eau du robinet, séchée entre deux feuilles de papier buvard, puis observée à l'immersion. Les structures colorables apparaissent bleues. Néanmoins, cette méthode n'est que peu informative.

## Coloration différentielle

### *Coloration de Gram*

C'est la coloration de référence en bactériologie. Elle est réalisée comme suit et le résultat obtenu à chaque étape est schématisé dans la figure 2.6.

Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool (fig. 2.6A) :

- recouvrir la lame de **violet de gentiane** : 1 minute (fig. 2.6B) ;
- rejeter le violet de gentiane ;
- recouvrir de **lugol** : 1 minute (fig. 2.6B) ;
- rejeter le lugol ;
- décolorer à l'**alcool**, la lame étant tenue inclinée. La durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis. En pratique, la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair ;
- stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau (fig. 2.6C) ;
- recouvrir la lame de **fuchsine** diluée, 30 secondes à 1 minute ;
- laver à l'eau (fig. 2.6D) ;
- sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur ;
- examiner à l'immersion.

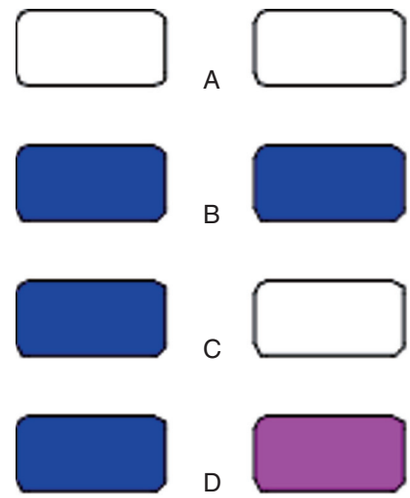



Fig. 2.6. – *Principe de la coloration de Gram, avec à gauche une bactérie à Gram positif et à droite une bactérie à Gram négatif.*
A) Bactéries fixées non colorées. B) Bactéries colorées par le violet de gentiane. C) Seules les bactéries à Gram positif restent colorées en violet après l'étape de décoloration. D) Les bactéries décolorées à l'étape précédente sont recolorées en rose par la fuchsine.

Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (fig. 2.7). Lorsque la coloration est effectuée à partir d'un produit pathologique contenant des cellules ou des leucocytes, la

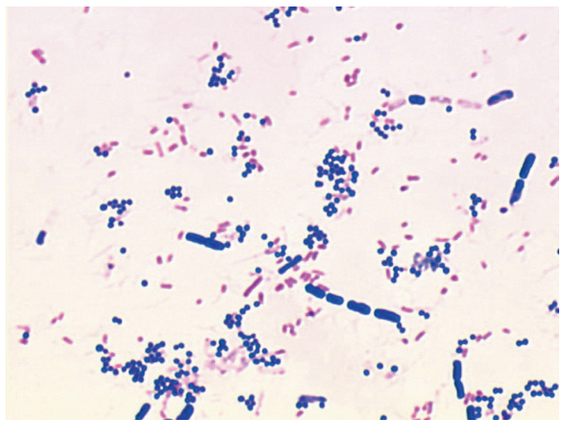


**Fig. 2.7.** – *Coloration de Gram appliquée à un mélange de germes (*Bacillus cereus, Staphylococcus aureus *et* Salmonella Typhimurium*). Observation à l'immersion (× 1000).*

coloration des noyaux de ces cellules doit apparaître violette et le cytoplasme rose.

Des variantes existent de cette coloration dans lesquelles le violet de gentiane est remplacé par le cristal violet. La décoloration à l'alcool peut être remplacée par une décoloration avec un mélange alcool–acétone. Enfin, la fuchsine peut être remplacée par de la safranine.

Des techniques de coloration utilisant des appareils à colorer par spray sont également disponibles. Elles offrent l'avantage de consommer moins de colorant et d'éviter le rejet de colorants sous forme liquide.

Lorsque les prélèvements sont hémorragiques, les nombreuses hématies peuvent gêner l'observation microscopique. Dans ce cas, les frottis sont immergés pendant 5 minutes dans le liquide de Carnoy (24 ml de chloroforme, 8 ml d'acide acétique, 100 ml d'alcool éthylique qsp).

### *Coloration de Ziehl-Neelsen, coloration des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR)*

C'est la coloration de référence des mycobactéries. Elle est réalisée classiquement comme suit et le résultat obtenu à chaque étape est schématisé dans la figure 2.8. Des variantes de cette méthode existent, en particulier la coloration de Kinyoun et Gabett.

Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool méthylique (fig. 2.8A) :

- recouvrir la lame de **fuchsine :** chauffer par intermittence pendant 10 à 15 minutes, jusqu'à émission de vapeurs (pour la technique à froid, la durée de contact entre la fuchsine et la préparation est de 3 heures) (fig. 2.8B) ;
- laver à l'eau ;
- décolorer à l'**acide sulfurique** dilué au quart : 1 minute ;
- laver à l'eau ;
- décolorer à l'**alcool** à 95° pendant 10 minutes (fig. 2.8C) ;
- laver à l'eau ;

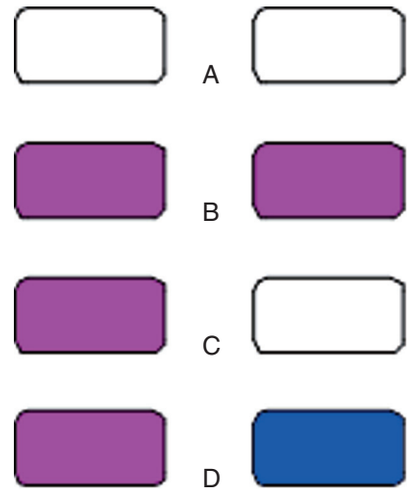



**Fig.2.8.** – *Principe de la coloration de Ziehl-Neelsen, avec à gauche un bacille acido-alcoolo-résistante (BAAR).*
A) Bactéries fixées non colorées. B) Les deux sortes de bactéries sont colorées par la fuchsine. C) Seules les BAAR restent colorées en rose après la décoloration.
D) Les bactéries décolorées à l'étape précédente sont recolorées en bleu par le bleu de méthylène.

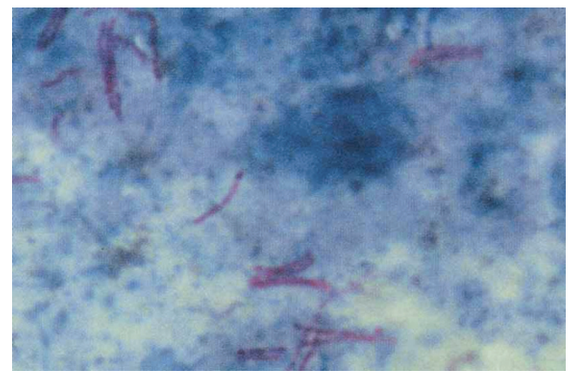


**Fig. 2.9.** – *Coloration de Ziehl-Neelsen de* Mycobacterium tuberculosis *présent dans une expectoration. Observation à l'immersion (× 1000).*

- contre-colorer au bleu de méthylène pendant 2 minutes (fig. 8D) ;
- laver à l'eau ;
- sécher ;
- examiner à l'immersion.

Les bacilles acido-alcoolo-résistants apparaissent roses sur fond bleu (fig. 2.9).

### Colorations spéciales

Certaines colorations spéciales permettent de mettre en évidence des éléments de la cellule bactérienne comme les flagelles (méthode de Rhodes, annexe 2.1), les spores bactériennes (méthode de Moeller, annexe 2.2).

ANNEXE 2-1

## Coloration des flagelles par méthode de Rhodes

À partir d'une suspension d'une culture jeune à peine trouble réalisée en eau déminéralisée, laisser s'écouler une goutte de la suspension sur une lame propre, inclinée à 45° environ selon le sens décrit à la figure A.

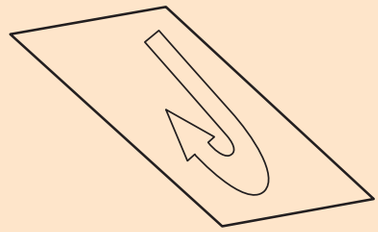


**Fig. A.** – *Étalement d'une suspension de germes avant coloration des flagelles.*

La réalisation de cette coloration est décrite ci-après :
• laisser sécher la lame à l'étuve à 37 °C ;
• faire agir le mordant de **Rhodes :** 5 minutes (mordant de Rhodes : tanin, alun de potassium, huile d'aniline, chlorure ferrique) ;
• laver à **l'eau distillée** ;
• recouvrir de **nitrate d'argent ammoniacal** porté préalablement à ébullition : 5 minutes ;
• laver à l'eau distillée ;
• sécher ;
• examiner à l'immersion.
Les flagelles et les corps bactériens sont colorés en brun-noir (figure B).

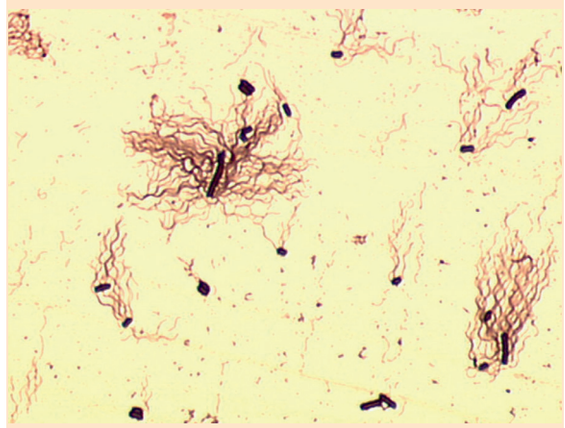


**Fig. B.** – *Coloration de Rhodes appliquée à une culture de* Proteus mirabilis. *Observation à l'immersion (× 1000).*

ANNEXE 2-2

## Coloration des spores bactériennes par la méthode de Moeller

La coloration des spores bactériennes par la méthode de Moeller est effectuée comme suit.
Sur un frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool :
• recouvrir d'acide chromique à 5 % : 5 minutes ;
• laver à l'eau ;
• colorer à la **fuchsine à chaud** (60 °C), 3 à 4 émissions de vapeurs : 10 minutes ;
• décolorer à l'alcool absolu rapidement ;
• stopper la décoloration par lavage à l'eau ;
• recolorer au **bleu de méthylène :** 3 minutes ;
• laver à l'eau ;
• sécher ;
• examiner à l'immersion.
Les spores sont rouge-rose, les corps bactériens bleus (figure C).

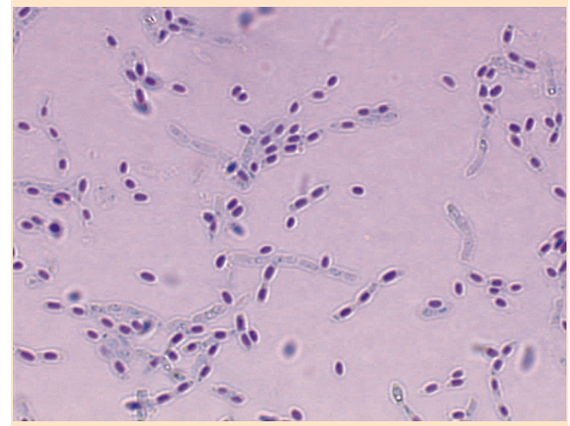


**Fig. C.** – *Coloration de Moeller appliquée à une culture de* Bacillus cereus. *Observation à l'immersion (× 1000).*

### *Examen microscopique après réaction d'immunofluorescence*

L'immunofluorescence est une méthode qui permet de visualiser les bactéries après étalement d'un prélèvement ou d'une suspension bactérienne sur une lame, séchage et fixation. Un anticorps spécifique de la bactérie, marqué avec une substance fluorescente, en général de l'isothiocyanate de fluorescéine, est mis en contact à 37 °C en chambre humide avec la préparation. Après lavage pour éliminer les anticorps non spécifiquement fixés et séchage, de la glycérine tamponnée est déposée à la surface de la préparation et recouverte d'une lamelle. L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence à l'objectif 25 ou 40. Les bactéries apparaissent en vert-jaune. Cette méthode est moins fréquemment utilisée ou recommandée en bactériologie compte tenu de l'avènement des techniques de biologie moléculaire

et du fait d'une spécificité relative des anticorps utilisés. Les applications de cette méthode concernent entre autres *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia* et les mycoplasmes.

L'immunofluorescence est dite directe (IFD) lorsque l'immunsérum antibactérien est marqué avec le fluorochrome ; elle est dite indirecte (IFI) lorsque la réaction de révélation utilisant un anticorps marqué est secondaire à une première étape de réaction antigène–anticorps. Il peut s'agir soit d'un sérodiagnostic par IFI (antigène connu et des anticorps spécifiques de l'antigène sont recherchés dans le sérum d'un patient), soit d'une immunodétection, IFD ou IFI (des anticorps spécifiques d'un antigène bactérien sont utilisés pour repérer cet antigène dans un produit pathologique ou une suspension de germes).

## Culture et isolement des bactéries

Les bactéries d'intérêt médical les plus fréquemment responsables d'infection arrivent à se développer sur des milieux de culture. Ces milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification bactérienne ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure.

### Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés en bactériologie doivent contenir les éléments nécessaires à la survie et à la multiplication des bactéries, et doivent posséder les propriétés physicochimiques convenant à cette culture (pH en particulier). Les milieux sont de différents types. Il s'agit soit de milieux de base, permettant la croissance d'espèces non ou peu exigeantes, soit de milieux enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines, etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes. Il peut s'agir également de milieux rendus sélectifs par addition d'antibiotiques, d'antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés.

#### *Milieux de base*

Le milieu liquide de base est représenté par le bouillon nutritif ordinaire qui est composé de trois composants principaux, les peptones, les extraits de viande et les extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en petits peptides. En fonction des enzymes utilisées, les compositions des peptones et leurs propriétés sont différentes. Les extraits de viande apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides. Les extraits de levure, quant à eux, représentent une source d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles. Du chlorure de sodium est habituellement ajouté à la concentration de 5 g/l.

Les milieux se présentent sous forme liquide ou sous forme solide. Par addition dans les milieux liquides d'un agent solidifiant, on obtient des milieux solides appelés communément gélose. En effet, l'agent le plus souvent utilisé est l'agar-agar (agar ou gélose) qui est un polysaccharide complexe provenant d'algues marines. Cette substance permet, à des concentrations de 15 à 20 g/l, de solidifier les milieux liquides. Cette gélose fond à 80 °C, reste en surfusion à des températures voisines de 50 °C et se solidifie à des températures inférieures. D'autres agents solidifiants peuvent être utilisés, comme les œufs coagulés dans le milieu de Löwenstein-Jensen utilisé pour la recherche des mycobactéries, et le sérum coagulé pour le milieu de Loeffler utilisé pour la recherche du bacille de la diphtérie.

Les milieux sont commercialisés soit sous forme de poudres déshydratées, soit prêts à l'emploi en tube ou en boîte de Petri. Pour les poudres déshydratées, les milieux doivent être reconstitués selon les instructions du fabricant et doivent être autoclavés avant utilisation, sauf dans certains cas lorsque les milieux contiennent des composés thermolabiles. Les milieux prêts à l'emploi présentent l'avantage d'être de qualité constante et de garantir la croissance d'un certain nombre de bactéries testées avant mise sur le marché des lots fabriqués, cela bien évidemment sous la condition d'avoir été stockés selon les recommandations du fabricant et d'être utilisés dans leur période de validité.

#### *Milieux d'enrichissement*

Ces milieux permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements paucimicrobiens. Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant le développement d'un maximum de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes. Parmi les plus utilisés, on trouve le bouillon nutritif, le milieu de Schaedler, le milieu cœur-cerveau (*brain heart infusion* [BHI]), le milieu de Rosenow. Des milieux d'enrichissement peuvent également être utilisés pour favoriser le développement de certaines bactéries de façon préférentielle aux bactéries présentes dans des flores. Il s'agit dans ce cas de milieux d'enrichissement sélectifs. Ainsi, la recherche par exemple de bactéries entéropathogènes dans les coprocultures utilise ces milieux (milieu de Muller-Kauffmann, eau peptonée alcaline, etc.). Le milieu de Muller-Kauffmann ou bouillon de base au tétrathionate est un milieu d'enrichissement sélectif pour les salmonelles contenant de la bile et du vert brillant.

La composition des milieux de culture est présentée en annexe 2.3.

#### *Milieux d'isolement*

Les milieux d'isolement, contrairement aux précédents, sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries

**ANNEXE 2-3**

## Composition des principaux milieux de culture

- **Bouillon nutritif**

| | |
|---|---|
| Extrait de viande de bœuf | 1 g/l |
| Extrait de levure | 2 g/l |
| Peptone | 5 g/l |
| Chlorure de sodium | 5 g/l |
| PH 7,4 ± 0,2 | |

- **Bouillon cœur-cervelle**

| | |
|---|---|
| Infusion de cervelle de veau | 12,5 g/l |
| Infusion de cœur de bœuf | 5 g/l |
| Protéose–peptone | 10 g/l |
| Glucose | 2 g/l |
| Chlorure de sodium | 5 g/l |
| Phosphate disodique | 2,5 g/l |
| PH 7,4 ± 0,2 | |

- **Bouillon de Schaedler**

| | |
|---|---|
| Bouillon tryptone soja | 10 g/l |
| Peptone spéciale | 5 g/l |
| Extrait de levure | 5 g/l |
| Glucose | 5 g/l |
| Chlorhydrate de cystéine | 0,4 g/l |
| Hémine | 0,01 g/l |
| Tampon Tris | 0,75 g/l |
| PH 7,4 ± 0,2 | |

- **Gélose nutritive ordinaire**

| | |
|---|---|
| Extrait de viande de bœuf | 1 g/l |
| Extrait de levure | 2 g/l |
| Peptone | 5 g/l |
| Chlorure de sodium | 5 g/l |
| Agar | 15 g/l |
| PH 7,4 ± 0,2 | |

- **Gélose tryptone soja (TS)**

| | |
|---|---|
| Tryptone (hydrolysat trypsique de caséine) | 15 g/l |
| Peptone de soja | 5 g/l |
| Chlorure de sodium | 5 g/l |
| Agar | 15 g/l |
| PH 7,3 ± 0,2 | |

- **Gélose de base Columbia**

| | |
|---|---|
| Peptone (hydrolysat pepsique de viande) | 23 g/l |
| Amidon | 1 g/l |
| Chlorure de sodium | 5 g/l |
| Agar | 10 g/l |
| PH 7,3 ± 0,2 | |

- **Gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient)**

| | |
|---|---|
| Peptone | 4 g/l |
| Extrait de viande de bœuf | 3 g/l |
| Tryptone | 4 g/l |
| Lactose | 10 g/l |
| L-cystine | 0,128 g/l |
| Bleu de bromothymol | 0,02 g/l |
| Agar | 15 g/l |
| PH 7,3 ± 0,2 | |

- **Gélose de Mueller-Hinton (MH)**

| | |
|---|---|
| Infusion de viande de bœuf | 300 g/l |
| Hydrolysat de caséine | 17,5 g/l |
| Amidon | 1,5 g/l |
| Agar | 17 g/l |
| PH 7,4 ± 0,2 | |

- **Gélose HTM (*Haemophilus Test Medium*)**

| | |
|---|---|
| Gélose de Mueller-Hinton | 38 g/l |
| Extrait de levure | 5 g/l |
| PH 7,4 ± 0,2 | |

Ce milieu est supplémenté en hémine et en NAD, indispensables à la croissance de *H. influenzae*.

- **Gélose de Wilkins Chalgren**

| | |
|---|---|
| Tryptone | 10 g/l |
| Peptone de gélatine | 10 g/l |
| Extrait de levure | 5 g/l |
| Glucose | 1 g/l |
| Chlorure de sodium | 5 g/l |
| L-arginine | 1 g/l |
| Pyruvate de sodium | 1 g/l |
| Ménadione | 0,0005 g/l |
| Hémine | 0,005 g/l |
| Agar | 10 g/l |
| PH 7,1 ± 0,2 | |

d'intérêt médical. Seules les géloses les plus couramment utilisées seront abordées.

## Géloses de base

Les géloses de base sont constituées par les géloses nutritives ordinaires et les géloses tryptone soja (ou trypticase soja [TS]). Ces milieux permettent la culture des bactéries non exigeantes (voir annexe 2.3). La gélose de base Columbia est un milieu hautement nutritif permettant la culture des germes exigeants

La gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient) est un milieu recommandé pour l'analyse bactériologique des urines. Ce milieu permet la croissance et l'isolement de la plupart des bactéries responsables d'infections urinaires. La déficience en électrolytes s'accompagne d'une absence de mobilité des *Proteus*.

## Géloses enrichies

### *Géloses au sang frais*

Les géloses au sang frais, en général sang de mouton ou de cheval, sont obtenues en ajoutant à des géloses ordinaires du sang frais dans des proportions de 5 à 10 % en volume. Ce sont des géloses qui permettent la croissance des bactéries exigeantes grâce à la présence de facteurs de croissance contenus dans le sang. En fonction de l'origine des hématies, le caractère hémolytique des bactéries peut varier. Les géloses au sang sont en général fabriquées à

partir soit de géloses TS additionnées de sang de cheval (gélose TSH [*tryptone-soja-horse blood*]), soit de gélose de base Columbia, plus riches, additionnées de sang de mouton (gélose SBA [*sheep-blood-agar*]).

### *Géloses au sang cuit*

Les géloses au sang cuit, appelées géloses « chocolat », permettent de libérer par la cuisson des facteurs de croissance supplémentaires. Néanmoins, ces géloses sont souvent supplémentées en vitamines (par exemple gélose chocolat Polyvitex®). Elles permettent la croissance des bactéries exigeantes, en particulier celles du genre *Haemophilus*.

## Géloses sélectives

### *Pour* Bordetella pertussis

Les milieux de Bordet-Gengou ou les géloses au charbon contenant de l'acide nicotinique, supplémenté de 10 % de sang de cheval défibriné (v/v) sont rendus sélectifs par addition de céfalexine à 40 µg/ml.

### *Pour* Brucella

La gélose de base Columbia ou la gélose de base pour *Brucella* additionnées de 5 à 10 % (v /v) de sérum de cheval décomplémenté et de 1 % (m/v) de glucose sont rendues sélectives par addition d'antibiotiques (polymyxine B, bacitracine, acide nalidixique, nystatine, vancomycine).

### *Pour campylobactéries*

Un grand nombre de milieux de culture sélectifs ont été développés pour permettre la croissance des campylobactéries à partir des selles, notamment pour inhiber la flore fécale. De plus, ces bactéries présentent des exigences variables en fonction des espèces en termes d'atmosphère et de température pour une culture optimale. Les géloses de base sont variables en fonction des milieux (Columbia éventuellement associée à du charbon activé, etc.), et les suppléments antibiotiques qui vont rendre sélectif le milieu sont également divers (vancomycine, polymyxine, triméthoprime pour le milieu de Skirrow ; bacitracine, colistine, céfazoline, novobiocine, cycloheximide ou amphotéricine B pour le milieu de Butzler ; pyruvate de sodium, céfopérazone, vancomycine, cycloheximide pour le milieu de Karmali).

### *Pour l'isolement de* Clostridium difficile

La gélose de base est rendue sélective par ajout de cyclosérine, de cefoxitine.

### *Pour l'isolement de* Corynebacterium diphtheriae

La gélose de Tinsdale est une gélose de base contenant de la cystine supplémentée en sérum de bœuf, en tellurite de potassium et en thiosulfate de sodium. Les colonies sont noires, petites avec un halo marron-noir après 24 heures d'incubation.

### *Pour l'isolement d'*Escherichia coli *O157 : H7*

Le milieu utilisé est le milieu de MacConkey au sorbitol (SMAC). Ce milieu est sélectif par la présence de sels biliaires et différentiel par le remplacement du lactose du MacConkey standard par du sorbitol pour la recherche d'*E. coli* O157 : H7. En effet, cet *E. coli* ne fermente habituellement pas le sorbitol, à la différence des autres *E. coli*. Les colonies apparaissent incolores, alors que les colonies de bactéries fermentant le sorbitol sont roses.

### *Pour les légionelles*

Le milieu de base pour la recherche des légionelles est composé de charbon activé et d'extrait de levure. Il est supplémenté avec un tampon ACES/hydroxyde de potassium, du pyrophosphate ferrique, de la L-cystéine et du cétoglutarate dans le milieu BCYE, et peut être rendu sélectif par l'ajout de glycine, vancomycine, polymyxine, cycloheximide.

### *Pour les* Neisseria *pathogènes*

Plusieurs associations d'antibiotiques permettent de rendre sélectives pour les gonocoques et méningocoques des géloses enrichies. Il s'agit des associations VCN (vancomycine, colistine, nystatine), VCNT (vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime), VCAT (vancomycine, colistine, amphothéricine B, triméthoprime).

### *Pour* Pseudomonas

Les géloses de base sont rendues sélectives par addition de cétrimide, éventuellement associé à l'acide nalidixique.

### *Pour* Salmonella *et* Shigella

Des milieux sélectifs pour l'isolement des *Salmonella* et des *Shigella* sont disponibles.

- La gélose Hektoen contient des sels biliaires, un taux élevé de peptone pour compenser l'effet inhibiteur de sels biliaires sur les shigelles, une quantité importante (12 g/l) de lactose pour une mise en évidence précoce des bactéries fermentant le lactose, du thiosulfate et du citrate ferrique permettant de détecter les bactéries $H_2S$ positives. Ainsi, sur ce milieu, les shigelles forment des colonies vertes et les salmonelles des colonies bleu-vert avec ou sans centre noir.
- Le milieu *Salmonella-Shigella* contient du rouge neutre comme indicateur de pH et du vert brillant comme inhibiteur supplémentaire. Les bactéries ne fermentant pas le lactose donnent des colonies roses, celles $H_2S$ positives en plus un centre noir.
- La gélose XLD (xylose-lysine-désoxycholate) est fondée sur la fermentation du xylose (les shigelles ne fermentent pas le xylose), la décarboxylation de la lysine (salmonelles et shigelles possèdent une lysine décarboxylase) et la production d'$H_2S$.

Fig. 2.10. – *Exemple de colonies de* S. agalactiae *sur milieu Granada.*

### *Pour l'isolement des staphylocoques*

Le milieu de Chapman est un milieu au mannitol, hypersalé (75 g/l de chlorure de sodium), qui est sélectif pour les staphylocoques à l'exception de quelques espèces halophiles appartenant à d'autres genres bactériens.

### *Pour l'isolement de* Staphylococcus aureus, *des streptocoques hémolytiques et des entérocoques*

Les géloses Columbia ANC (acide nalixidique-colistine) ou CAP (colistine-aztréonam) sont des géloses de base Columbia rendues sélectives par addition d'antibiotiques. Elles sont en particulier utilisées à partir de prélèvements rhinopharyngés.

### *Pour l'isolement de* Streptococcus agalactiae

Les géloses Granada contiennent de l'amidon et du sérum qui favorisent la production du granadaène par la bactérie qui est un pigment de couleur orangée (fig. 2.10). Ces géloses sont incubées en anaérobiose à 37 °C et il est recommandé de les observer après 48 heures d'incubation.

### *Pour* Yersinia enterocolitica

Le milieu de Schiemann CIN (cefsulodine-irgasan-novobiocine) est un milieu sélectif pour *Yersinia enterocolitica.* À la gélose de base est additionnée de la cefsulodine, de l'irgasan et de la novobiocine.

## Géloses chromogènes pour identification présomptive

Les milieux chromogènes sont des milieux gélosés solides permettant, grâce à la mise en évidence d'activité enzymatique, l'identification directe de certaines espèces bactériennes, ou l'orientation vers certains groupes de bactéries. Ce sont des milieux gélosés non sélectifs adaptés à l'isolement, à l'identification et à la numération des germes urinaires. Les chromogènes sont des substrats artificiels incolores directement incorporés dans la gélose, qui libèrent des composés de couleurs différentes après dégradation par leurs enzymes respectives, directement visibles. Il existe de nombreux milieux chromogènes qui permettent l'isolement et la numération des germes, en particulier ceux responsables d'infections du tractus urinaire, afin de faciliter l'identification des germes les plus fréquemment impliqués.

### *Milieux chromogènes utilisés dans le diagnostic des infections urinaires*

À titre d'exemple, quatre milieux sont présentés : le milieu CHROMagar Orientation® (Becton Dickinson), le milieu CPS ID 3® (bioMérieux), le milieu UriSelect 4® (Bio-Rad) et le milieu UTI® (Oxoid). Les propriétés des quatre milieux chromogènes utilisés pour l'identification sont présentées dans le tableau 2.2.

Ces milieux contiennent, à partir d'une gélose de base, des mélanges chromogènes permettant de détecter des enzymes produites par les bactéries comme des β-glucosidases, des β-D galactosidases. Le milieu contenant du tryptophane et de la phénylalanine, en présence de tryptophane désaminase, les colonies sont brunes.

Certains de ces milieux sont translucides ; c'est le cas des milieux BD CHROMagar Orientation® (Becton Dickinson) et CPS ID 3® (bioMérieux). D'autres sont opaques comme le milieu UriSelect 4® (Bio-Rad) et le milieu UTI® (Oxoid).

#### *Escherichia coli*

L'activité β-galactosidase donne des colonies rose à pourpre, plus ou moins translucides sur les quatre milieux (fig. 2.11). Une confirmation par la recherche de la production d'indole est recommandée. Pour réaliser ce test, il suffit de déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Un virage au rose est observé pour les bactéries indole positives (*E. coli*). En cas de réaction négative, il est nécessaire de poursuivre l'identification par une méthode classique.

#### *Enterococcus sp*

Les colonies sont de petite taille et l'activité β-glucosidase se traduit par une coloration bleu turquoise à bleu-vert selon les quatre milieux (fig. 2.12).

L'association de l'examen microscopique montrant des cocci Gram positif en chaînette permet de confirmer le genre. Pour le milieu UTI®, une étape supplémentaire est recommandée qui est la réalisation d'un test PYR, mettant en évidence l'hydrolyse du pyroglutamate, afin de différencier les entérocoques (test PYR négatif) des streptocoques spp. (test PYR positif).

#### *Proteus, Morganella, Providencia*

L'activité tryptophane désaminase (TDA) est détectée par la production d'un pigment brun diffusible : des colonies beiges à brun orangé, avec ou sans brunissement de la gélose, sont obtenues (fig. 2.13).

La recherche de la production d'indole, qui orientera vers les *Proteus* indologènes (indole positif) ou vers *Proteus mirabilis* (indole négatif), sera effectuée.

#### *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter*

Les colonies sont de grande taille et l'activité β-glucosidase donne une coloration bleu franc intense sur CHROMagar

**TABLEAU 2-2**

**Interprétation des résultats obtenus en fonction des bactéries pour quatre milieux chromogènes.**

| | *CHROMagar Orientation®* *(Becton-Dickinson)* | *CPS ID 3® (bioMérieux)* | *UriSelect 4® (Bio-Rad)* | *UTI® (Oxoid)* |
|---|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* (β-galactosidase +) | Colonies roses | Colonies rose à bordeaux | Colonies rose à pourpre<br>Confirmation obligatoire par une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif<br>Indole + = *E. coli*<br>Indole – = identification par méthode classique | Colonies roses<br>Confirmation obligatoire par une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif<br>Indole + = *E. coli*<br>Indole – = identification par méthode classique |
| *Enterococcus* sp. (β-glucosidase +) | Colonies bleu-vert à turquoise de petite taille | Colonies bleu à turquoise de petite taille et examen microscopique montrant des cocci<br>NB : si une des conditions n'est pas remplie, identifier le germe par la méthode classique | Colonies bleu turquoise franc, brillant, de petite taille, et l'examen microscopique montrant des cocci<br>NB : si une des conditions n'est pas remplie, identifier le germe par la méthode classique | Colonies bleu turquoise |
| *Proteus* sp. (tryptophane désaminase +) | Colonies beiges avec un halo brun | Colonies brunes à marron<br>Effectuer une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif<br>Indole – = *Proteus mirabilis.*<br>Indole + = *Proteus* indologène, *Morganella* ou *Providencia* ; identifier précisément par une méthode classique | Colonies brun orangé<br>Effectuer une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif<br>Indole – = *Proteus mirabilis*<br>Indole + = *Proteus* indologène, *Morganella* ou *Providencia* ; identifier précisément par une méthode classique | Colonies brun beige<br>Effectuer une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif<br>Indole – = *Proteus mirabilis*<br>Indole + = *Proteus* indologène, *Morganella* ou *Providencia* ; identifier précisément par une méthode classique. |
| Groupe *Klebsiella – Enterobacter – Serratia – Citrobacter* (β-galactosidase + et β-glucosidase +) | Colonies bleu métallique avec ou sans halo rose, de grande taille | Colonies vertes à brun vert, de grande taille et examen direct montrant des bacilles<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique | Colonies bleu-violet, de grande taille et examen microscopique montrant des bacilles<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique. | Colonies bleu-pourpre, de grande taille<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique |
| *Staphylococcus saprophyticus* | Colonies rose pâle, opaques, de petite taille | Colonies blanches<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique | Colonies blanches<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique | Colonies blanches<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique. |
| Autres bactéries | Colonies blanches<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique | Colonies blanches<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique | Colonies blanches<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique | Colonies blanches<br>Poursuivre l'identification par une méthode classique |

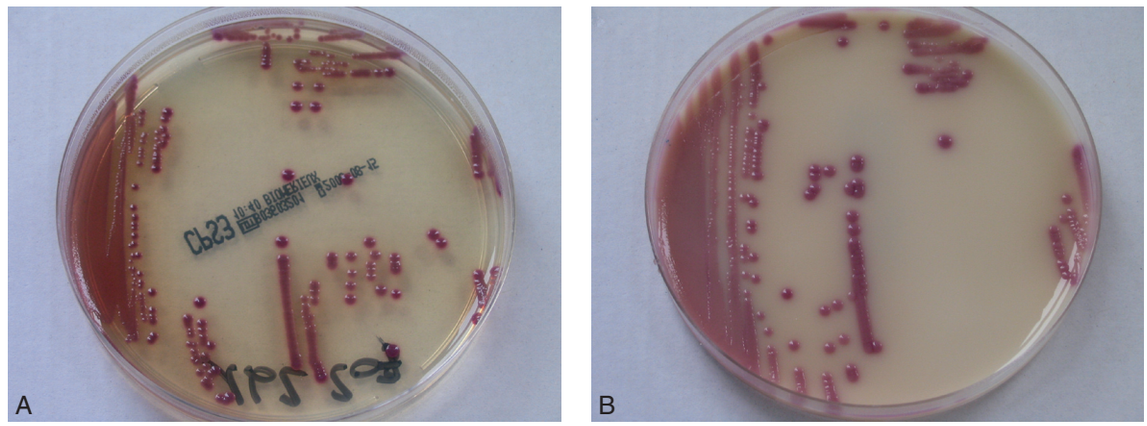



**Fig. 2.11.** – *Résultat d'une culture d'*E. coli *sur CPS ID3® (bioMérieux) (A) et sur milieu UTI® (Oxoid) (B).*

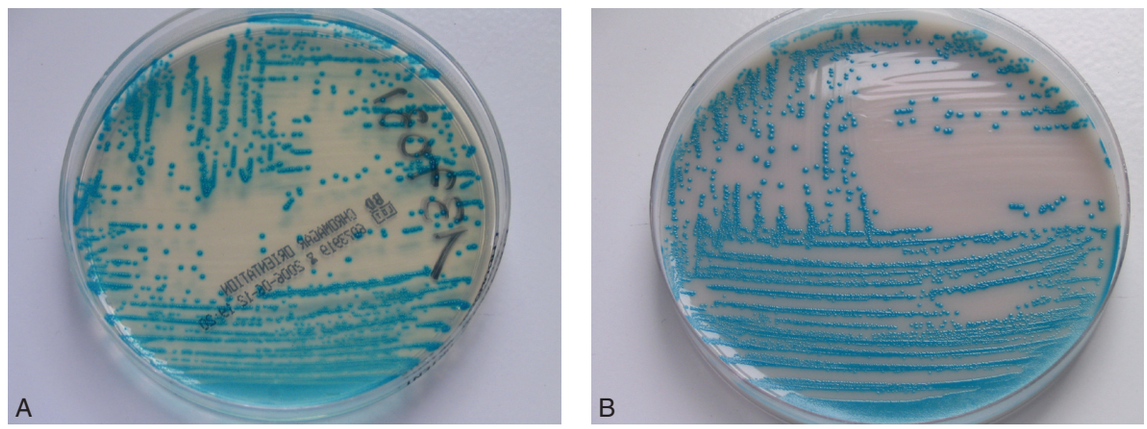



**Fig. 2.12.** – *Résultat d'une culture d'*Enterococcus faecalis *sur CHROMagar Orientation® (BD) (A) et sur milieu Uriselect® (Bio-Rad) (B).*

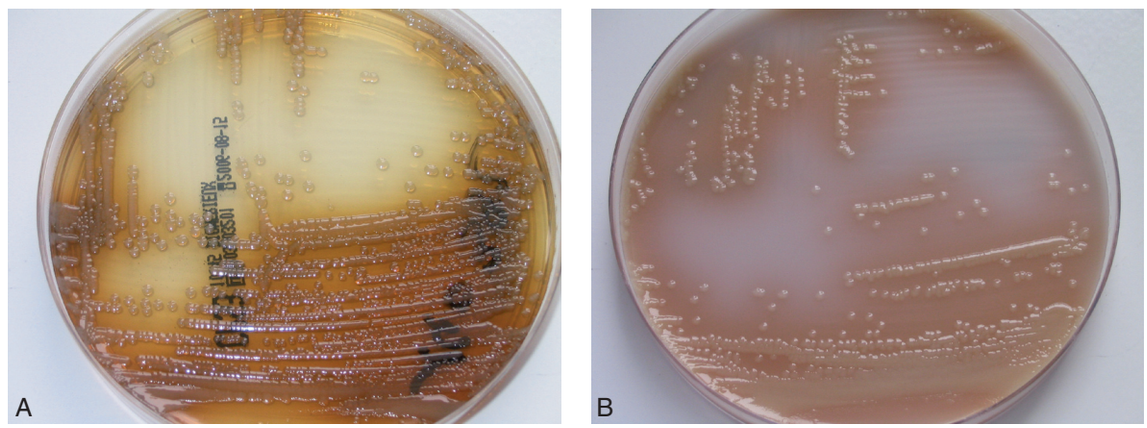



**Fig. 2.13.** – *Résultat d'une culture de* Proteus mirabilis *sur CPS ID3® (bioMérieux) (A) et sur milieu UTI® (Oxoid) (B).*

Orientation®, UriSelect 4®, UTI® et bleu-vert sur CPS ID 3®. La mise en évidence de bacilles à Gram négatif à l'examen microscopique donne une forte présomption de bactérie appartenant à ce groupe. L'identification par une méthode classique sera poursuivie.

### *Autres milieux chromogènes*

La plupart des fabricants de milieux gélosés ont développé des milieux chromogènes pour un nombre important de bactéries dans des circonstances particulières. Il s'agit notamment du dépistage du portage génital de *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes, du dépistage du portage nasal de *S. aureus* résistant à l'oxacilline et du dépistage des bactéries multirésistantes (dépistage des entérobactéries porteuses de β-lactamases à spectre étendu par exemple). Des milieux chromogènes utiles pour la détection des salmonelles ou de *C. difficile* dans une coproculture sont également disponibles.

## Géloses pour étude de la sensibilité aux antibiotiques

Des géloses adaptées et recommandées pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries ont également été développées.

La gélose la plus communément utilisée est la gélose de Mueller-Hinton (MH). L'utilisation de cette gélose est recommandée par le Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Cette gélose MH peut être supplémentée en sang frais ou en sang cuit lorsque les bactéries testées nécessitent ces milieux enrichis.

La gélose HTM (*Haemophilus* Test Medium) a été développée pour tester la sensibilité des souches d'*Haemophilus* aux antibiotiques. Ce milieu est supplémenté en hémine et en NAD indispensables à la croissance de *H. influenzae*.

La gélose de Wilkins Chalgren est utilisée pour la croissance et pour tester la sensibilité des bactéries anaérobies aux antibiotiques. Cette gélose peut être supplémentée avec 5 % de sang.

La composition de ces milieux est présentée dans l'annexe 2.3.

## Méthodes d'isolement

En fonction de la présentation des milieux et de leur utilisation, les méthodes d'ensemencement diffèrent.

### *Ensemencement des milieux solides en boîte de Petri*

#### Méthodes des quadrants

Ce mode d'ensemencement permet d'isoler les différentes bactéries contenues dans un mélange. Le dépôt de l'échantillon ou de la suspension de germe est effectué près d'un bord de la boîte de Petri, ou en une strie dans un quart de la boîte qui constituera le premier quadrant. Un isolement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée ou d'un ensemenceur à usage unique stérile selon les différentes étapes de la figure 2.14.

Ainsi, par cette méthode, le dernier quadrant contient des colonies isolées dont la morphologie permet de s'orienter vers une espèce ou un genre bactérien voire une famille de bactéries. C'est à partir de ces colonies isolées que des tests d'identification pourront être pratiqués et la sensibilité aux antibiotiques testée. Parfois, une subculture peut être nécessaire pour parfaire l'obtention d'une culture pure avec un inoculum suffisant pour les tests à effectuer.

#### Ensemencement pour dénombrement des bactéries

Plusieurs approches en dehors de l'isolement en quadrant peuvent être retenues pour une appréciation semi-quantitative de la quantité de bactérie présente.

##### *Ensemencement en stries*

Cette technique est en particulier appliquée pour estimer de manière approchée la quantité de bactéries dans les urines (fig. 2.15). Un volume connu d'urine est déposé en

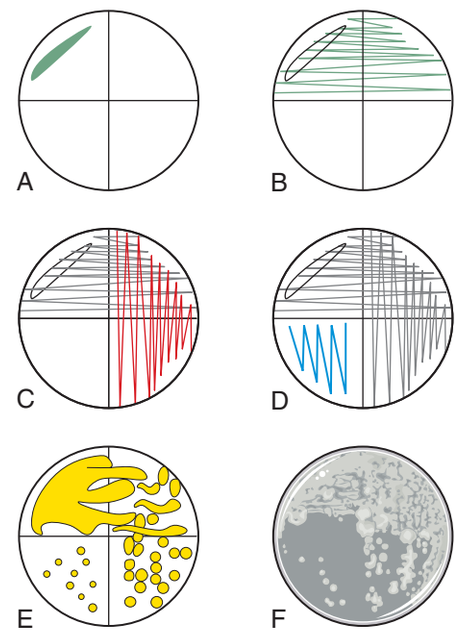



**Fig. 2.14.** – *Principe et résultat de la méthode d'isolement en quadrant.*
A) Dépôt de l'échantillon. B) Stries serrées sur la première moitié de la boîte (stries vertes). C) Après avoir tourné la boîte de 90°, des stries serrées sont à nouveau effectuées sur une moitié de boîte (stries rouges). D) Le dernier quadrant est ensemencé sans rentrer au contact des quadrants précédents. Cette technique permet d'obtenir dans le dernier quadrant des colonies isolées schématisées en E et en pratique en F.

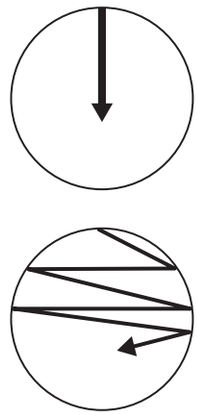


Fig. 2.15. – *Modalités d'ensemencement d'une gélose pour numération semi-quantitative. En haut, une strie est effectuée ; l'étalement est effectué par des stries serrées sur l'ensemble de la boîte sans faire tourner celle-ci de 90°.*

strie d'un bord au centre de la boîte de Petri, l'étalement est effectué en réalisant des stries serrées bord à bord comme indiqué sur la figure 2.15.

### *Ensemencement par la technique du râteau*

À partir d'un volume défini déposé à la surface d'une gélose, 50, 100, ou 200 µl par exemple, il est possible d'étaler le dépôt à l'aide d'un étaleur ou « râteau ». L'ensemble de la suspension est étalé sur la gélose en faisant tourner la boîte.

### *Ensemencement en spirale*

Des appareils appelés « ensemenceurs en spirale » permettent d'étaler un volume donné à la surface d'une gélose en partant du centre jusqu'au bord.

### *Autres méthodes*

Plusieurs souches peuvent être déposées sur une seule et même gélose en faisant des stries radiaires ou en faisant des stries parallèles.

### *Ensemencement pour étude de la sensibilité aux antibiotiques en milieu solide*

Pour la méthode d'étude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose, les suspensions bactériennes peuvent être ensemencées par « inondation ». La suspension bactérienne est déposée à la surface de la gélose et l'excès de liquide est « réaspiré ». Un temps de séchage de la surface de la gélose avant dépôt des disques d'antibiotiques est nécessaire.

L'autre méthode consiste à déposer la suspension à l'aide d'un écouvillon trempé dans la suspension et « essoré » sur le bord du tube avant étalement à l'aide de l'écouvillon sur la gélose. La gélose est ensemencée sur sa totalité en faisant tourner la boîte de 120° environ.

### *Ensemencement des milieux solides en tube*

La plupart de ces milieux sont ensemencés en surface sur la pente de la gélose soit en déposant quelques gouttes d'un liquide biologique, soit en faisant des stries à la surface de la pente.

Pour l'ensemencement de certains milieux particuliers comme le milieu de Kligler-Hajna, une piqûre centrale venant inoculer en profondeur la gélose complète l'ensemencement de la pente effectué par des stries à la surface.

### *Ensemencement des milieux liquides*

Les milieux liquides d'enrichissement sont ensemencés directement avec le produit à analyser.

Les milieux liquides d'identification sont ensemencés en ajoutant des bactéries prélevées avec un ensemenceur, ou bien en déposant quelques gouttes de la bactérie à étudier en suspension.

## Tests biochimiques utilisés dans l'identification des bactéries

En fonction de l'aspect morphologique des colonies bactériennes, de la morphologie des bactéries après coloration, de leurs caractéristiques de croissance (vitesse, type respiratoire, exigences culturales, etc.), de leur pigmentation, de leur odeur, de leur caractère hémolytique sur gélose au sang, le bactériologiste s'oriente sur une famille bactérienne ou un genre bactérien en particulier. Il peut le cas échéant compléter sa présomption de genre bactérien par des tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase). Néanmoins, les identifications précises des espèces bactériennes font appel, pour les bactéries d'intérêt médical les plus communes, à des galeries d'identification biochimique manuelles ou pouvant être lues sur des systèmes automatisés : Vitek® (bioMérieux), Phoenix® (BD), WalkAway® (Siemens), parmi les plus courants. Un certain nombre d'épreuves biochimiques de base sont utilisées dans l'élaboration des galeries d'identification des souches bactériennes.

Après avoir rappelé les tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase), un certain nombre d'épreuves métaboliques seront détaillées. Celles-ci concernent principalement le métabolisme glucidique, le métabolisme protéique et le métabolisme lipidique. Des tests d'agglutination viennent compléter l'identification bactérienne dans certains cas.

### Principaux tests d'orientation

#### *Étude du type respiratoire*

L'ensemencement est effectué sur une gélose viande-foie (VF) préalablement régénérée au bain-marie bouillant pendant 20 minutes et lorsque la température est redescendue

à 40 à 45 °C. Cet ensemencement est effectué soit à l'aide d'une pipette Pasteur de bas en haut en spirale, soit en déposant à la surface du tube maintenu à 45 °C la suspension de la bactérie à étudier puis à mélanger, en faisant subir au tube, tenu verticalement, des mouvements en forme de 8. Les tubes sont ensuite refroidis sous l'eau du robinet. Après 24 heures à 37 °C, la lecture consiste à étudier le niveau du tube où une croissance bactérienne est visible (fig. 2.16).

Une façon quotidienne d'apprécier le type respiratoire bactérien est de comparer les cultures bactériennes incubées en aérobiose et en anaérobiose pour savoir si la bactérie est anaérobie stricte, aérobie stricte ou aéro-anaérobie facultative. Dans ce cas, le caractère microaérophile n'est pas appréciable.

## Recherche de la catalase

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir d'$H_2O_2$ une libération d'oxygène gazeux selon la réaction : $H_2O_2$ donne $H_2O$ + 1/2 $O_2$ (fig. 2.17).

## Recherche d'une cytochrome oxydase

Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une cytochrome oxydase. La mise en évidence de cette oxydase est effectuée en présence d'une solution aqueuse à 1 % de chlorhydrate de diméthylparaphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme (fig. 2.18). Les colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur.

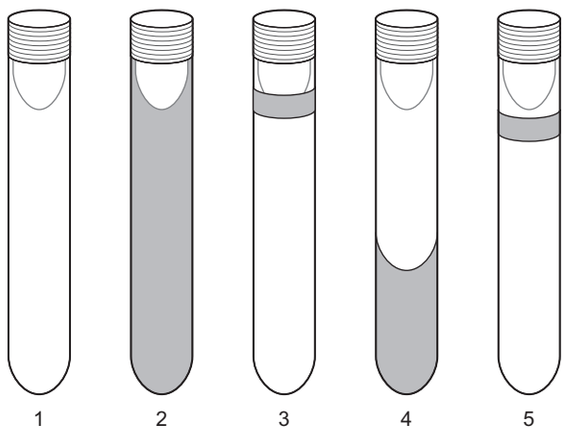



**Fig. 2.16.** – *Étude du type respiratoire bactérien sur gélose viande-foie.*
Tube 1 : tube non ensemencé ; tube 2 : croissance sur toute la hauteur du tube, type respiratoire aéro-anaérobie (ex. : *Escherichia coli*) ; tube 3 : croissance dans la zone supérieure du tube, type respiratoire aérobie strict (ex. : *Pseudomonas aeruginosa*) ; tube 4 : croissance dans la zone profonde du tube, type respiratoire anaérobie strict (ex. : *Clostridium* spp.) ; tube 5 : croissance dans la zone intermédiaire aéro-anaérobie du tube, type respiratoire microaérophile (ex. : *Campylobacter* spp.).

**Fig. 2.17.** – *Réaction de catalase positive (par exemple* S. aureus*).*

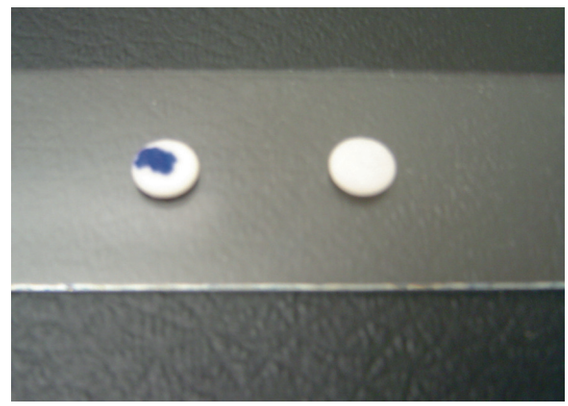


**Fig. 2.18.** – *À gauche, réaction d'oxydase positive (par exemple* P. aeruginosa*). À droite, réaction négative (par exemple* E. coli*).*

## Étude des accepteurs minéraux, recherche d'une nitrate réductase

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates ($NO_3^-$) en nitrites ($NO_2^-$) et éventuellement en azote ($N_2$) (fig. 2.19).

Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5 % de nitrates de potassium) est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37 °C (fig. 2.19A). Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît (fig. 2.19B), les nitrates ont été réduits au stade nitrites. En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de zinc (réactif de Zobell, qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher. Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase (fig. 2.19C). Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrates avaient été réduits au stade azote (fig. 2.19D).

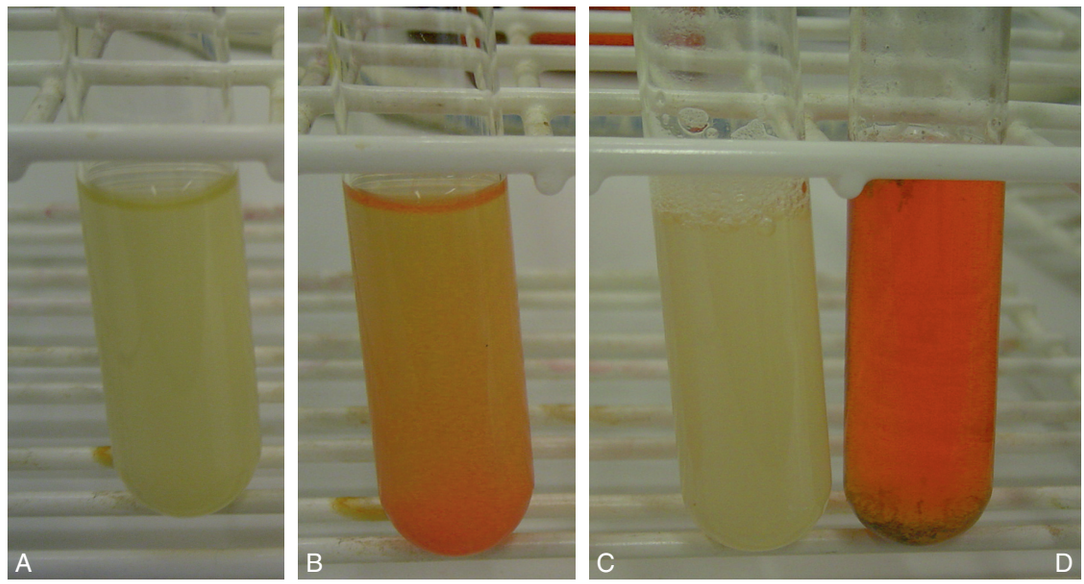



**Fig. 2.19.** – *Recherche d'une nitrate réductase.*
A) Bouillon nitraté après culture avant ajout des réactifs. B) Après ajout des réactifs Griess A et Griess B, apparition d'une coloration rose (stade nitrites) : présence de nitrate réductase (par exemple *Escherichia coli*). C) Après ajout de poudre de zinc, absence de coloration (stade azote) : présence d'une nitrate réductase (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*). D) Après ajout de poudre de zinc, apparition d'une coloration rose : absence de nitrate réductase (par exemple *Acinetobacter baumannii*).

## Étude du métabolisme glucidique

### *Étude de la voie d'attaque des glucides MEVAG (milieu de Hugh et Leifson)*

Les bactéries peuvent utiliser les glucides selon deux voies. La voie fermentative se déroule en l'absence d'oxygène de l'air et les catabolites formés, acides, entraînent une diminution du pH du milieu. Par voie oxydative, l'oxygène de l'air est utilisé et peu de catabolites acides sont formés.

Deux milieux semi-solides contenant un indicateur de pH (par exemple du bleu de bromothymol) sont régénérés au bain-marie bouillant 20 minutes. Ensuite, lorsqu'ils sont refroidis autour de 45 °C, 6 gouttes d'une solution de glucose à 30 % (concentration finale en glucose de 1 %) sont ajoutées. Les milieux sont ensuite refroidis complètement et ensemencés par piqûre centrale. L'un des deux tubes est recouvert de 0,5 cm d'huile de paraffine stérile. Ce tube constitue le tube dit « fermé », c'est-à-dire dans lequel les réactions s'effectueront en absence d'oxygène. L'autre tube est dit « ouvert ». Les résultats des deux voies d'attaque des glucides sont présentés à la figure 2.20.

### *Milieu mannitol mobilité*

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol, et du rouge de phénol comme indicateur de pH. Après régénération au bain-marie bouillant pendant 20 minutes, le milieu est refroidi totalement puis ensemencé par piqûre centrale. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol a été utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale.

### *Étude de la fermentation de plusieurs sucres pour l'identification des entérobactéries*

Le milieu de Kligler-Hajna ou milieu lactose-glucose-$H_2S$ est le plus couramment utilisé. Ce milieu solide en pente contient du glucose (0,1 %), du lactose (1 %), des acides aminés, du thiosulfate de sodium, du citrate ferrique et du rouge de phénol. Ce milieu est ensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose, puis le culot est ensemencé par piqûre centrale.

Les bactéries acidifient le glucose en anaérobiose relative (culot) ; le culot vire au jaune (par exemple entérobactéries). Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge par réalcalinisation du milieu due à la formation de produits alcalins provenant de la dégradation des acides aminés (par exemple *Proteus*) (fig. 2.21). Si les bactéries utilisent le lactose en aérobiose relative (pente), il y a virage de la pente au jaune (par exemple *E. coli*).

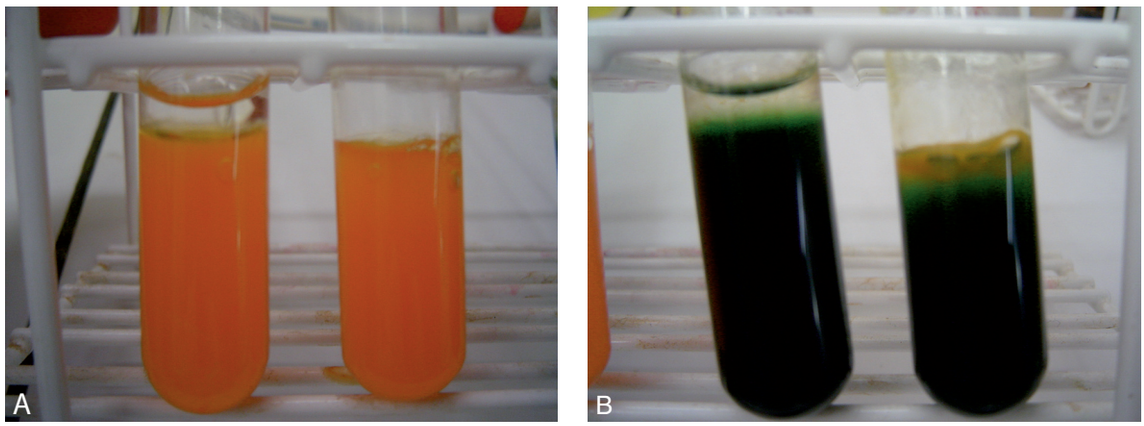



**Fig. 2.20.** – *Étude de la voie d'attaque des glucides.*
A) Culture positive dans les deux tubes et acidification des tubes : métabolisme fermentatif (par exemple entérobactéries). B) Culture positive et acidification uniquement dans la partie supérieure du tube « ouvert » : métabolisme oxydatif (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*).

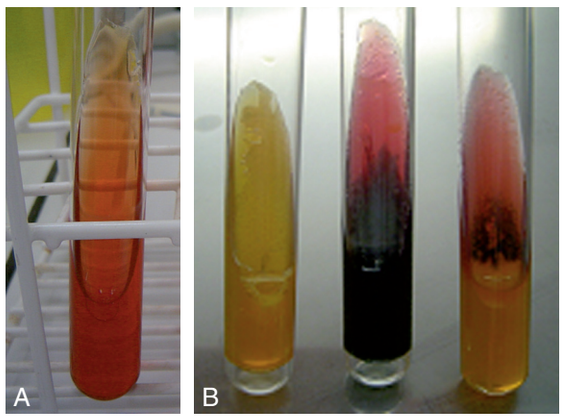



**Fig. 2.21.**– *Interprétation des résultats du milieu Kligler-Hajna.*
A) Milieu de Kligler-Hajna non ensemencé. B) De gauche à droite, bactérie glucose +, lactose +, productrice de gaz (*E. coli*) ; bactérie glucose +, lactose –, $H_2S$ +, productrice de gaz ; bactérie glucose +, lactose –, $H_2S$ + faiblement (*Salmonella* Typhi).

Le milieu peut être coloré en noir de façon plus ou moins intense par production d'$H_2S$. Une pointe fine d'$H_2S$ est observée pour *Salmonella* Typhi. Le milieu peut être entièrement noir. La présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bulles ou le soulèvement de la gélose. Un milieu contenant en plus du saccharose à 1 % peut être utilisé ; il s'agit du milieu TSI (*Triple-Sugar-Iron*).

## Étude de la dégradation du lactose

Il s'agit de la recherche d'une β-galactosidase qui dégrade le lactose en galactose et glucose. En pratique, ce test utilise l'ortho-nitro-phényl-galacto-pyranoside (ONPG) ou le para-nitro-phényl-galacto-pyranoside (PNPG). L'ONPG et le PNPG qui diffusent spontanément dans la bactérie (à la différence du lactose qui nécessite une perméase) sont dégradées par la β-galactosidase en galactose et orthonitrophénol ou paranitrophénol respectivement, qui sont des composés jaunes. Ces tests sont inclus dans la plupart des galeries d'identification. Individuellement, ils peuvent être réalisés en mettant en contact une suspension bactérienne épaisse en eau physiologique avec un disque d'ONPG par exemple. Après mise à l'étuve à 37 °C pendant 18 heures, l'apparition d'une coloration jaune peut être observée. Les entérobactéries ONPG négative sont par exemple *Salmonella*, *Shigella* (certaines espèces) et *Proteus*. *Enterobacter* et *Escherichia coli* par exemple possèdent une β-galactosidase.

## Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique

À partir du milieu de Clark-Lubs contenant de l'acide pyruvique, la formation d'acide formique et d'acide acétique (réaction de rouge de méthyle [RM]) et la formation d'acétoïne ou acétyl-méthylcarbinol (réaction de Voges-Proskauer [VP]) est étudiée (fig. 2.22).

En pratique, la réaction de VP est fréquemment réalisée, notamment sur les galeries miniaturisées. Sinon, le bouillon Clark-Lubs est ensemencé et incubé 18 heures à 37 °C. À 1 ml de culture, ajouter 0,5 ml d'alpha naphtol à 6 % et 0,5 ml de soude à 16 %. La lecture est à effectuer dans les 10 minutes. Les entérobactéries des genres *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* produisent de l'acétoïne, test VP +.

## Dégradation de l'esculine

L'esculine est un sucre. Certaines bactéries comme les entérocoques peuvent hydrolyser l'esculine en esculétine et glucose. L'esculétine se lie au citrate ferrique présent

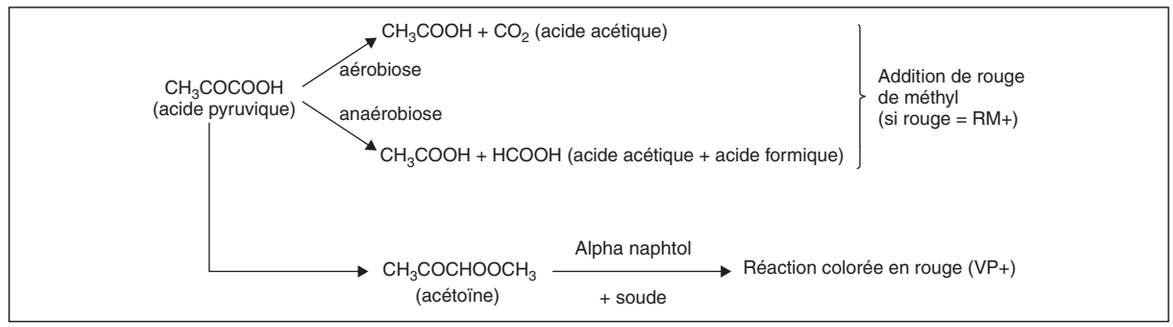



**Fig. 2.22.** – *Mise en évidence des métabolites formés lors de la dégradation de l'acide pyruvique.*

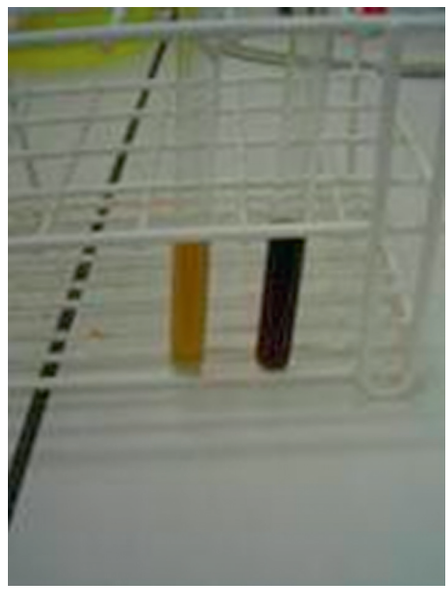


**Fig. 2.23.** – *Résultats du milieu à l'esculine.*
À gauche tube ensemencé avec une bactérie esculine négative. À droite tube ensemencé avec une souche esculine positive (*Enterococcus faecalis*).

dans le milieu pour former un complexe brun-noir correspondant à une réaction positive (fig. 2.23).

## Étude du métabolisme protéique

L'appréciation du pouvoir protéolytique n'est que peu utilisée actuellement. Plusieurs méthodes permettent d'apprécier la protéolyse de la gélatine ; elles sont citées ici pour mémoire : la méthode de Frazier, la méthode de Kohn et la méthode de Le Minor et Piechaud. L'étude de la protéolyse de gélatine associée à de l'encre de Chine permet, lorsque le pigment noir diffuse, d'apprécier cette activité. Ce test est inclus dans les galeries miniaturisées.

Actuellement, les tests les plus utilisés concernent la mise en évidence d'enzymes intervenant dans la dégradation des acides aminés.

### Recherche de décarboxylases

Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH). Les tests correspondants sont présents notamment sur les galeries API 20 E®. Le test individuel peut être effectué sur le milieu de Taylor contenant l'acide aminé étudié (soit la lysine, soit l'ornithine, soit l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocrésol pourpre. La réaction s'effectue en deux temps. Lorsque le glucose est fermenté, il y a virage au jaune du bromocrésol pourpre ; lorsque l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après 18 heures à 37 °C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive. Par exemple, *E. coli* possède une lysine décarboxylase alors que *Proteus vulgaris* n'en possède pas (fig. 2.24).

### Recherche de désaminases

#### Recherche de tryptophane désaminase

À partir du milieu de Ferguson contenant du tryptophane, du rouge de phénol et de l'urée, il est possible de mettre en évidence une activité tryptophane désaminase (TDA). Une suspension bactérienne dense dans un milieu de Ferguson permet, après incubation à 37 °C pendant 18 heures et ajout d'une goutte de perchlorure de fer à 30 %, de mettre en évidence une coloration brune si la bactérie testée est dite TDA + (fig. 2.25).

Les entérobactéries TDA + appartiennent aux genres *Proteus*, *Providencia* et *Morganella*.

#### Recherche d'une phénylalanine désaminase

De la même façon, une gélose à la phénylalanine peut être ensemencée pour mettre en évidence une phénylalanine désaminase. Après incubation de 18 heures à 37 °C et ajout de quelques gouttes de perchlorure de fer à 30 %, il apparaît en cas de positivité une coloration verte.

**Fig. 2.24.** – *Exemple de mise en évidence d'une lysine décarboxylase chez* E. coli.
A) Test effectué sur le milieu de Taylor. B) Test effectué sur galerie API 20 E® (test LDC).

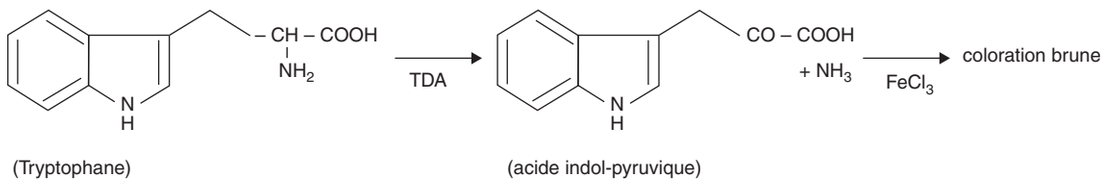



**Fig. 2.25.** – *Mise en évidence de la dégradation du tryptophane par une tryptophane désaminase.*

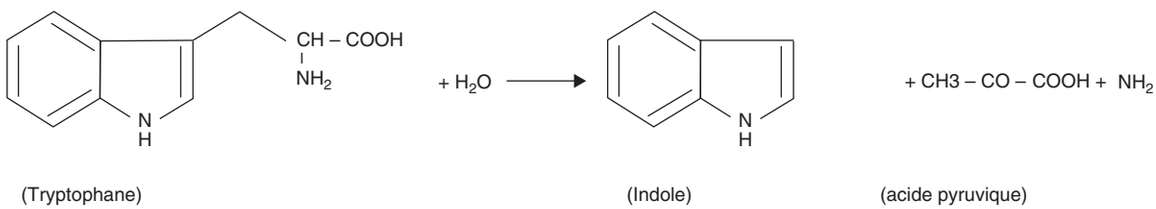



**Fig. 2.26.** – *Mise en évidence de la production d'indole.*

## *Recherche de tryptophanase*

La production d'indole par hydrolyse du tryptophane peut être effectuée à partir d'une culture de 24 heures de la souche à étudier en milieu de Ferguson ou en eau peptonée dépourvue d'indole. L'indole produit donne une coloration rouge en présence du réactif de Kovacs (para-diméthylaminobenzaldéhyde + alcool isoamylique) ou du réactif de James (fig. 2.26).

La formation d'un anneau rouge correspond à une réaction positive ; c'est le cas avec *E. coli*. *Proteus mirabilis*, par exemple, n'hydrolyse pas le tryptophane en indole.

## *Recherche de désulfhydrases*

Cette recherche est réalisée sur milieu de Kligler-Hajna ou fait partie des tests des galeries. La dégradation des acides aminés soufrés conduit à la formation de groupements SH ou $H_2S$ qui se combinent avec le citrate de fer ammoniacal du milieu pour former du sulfure de fer noir. *Salmonella* Typhimurium, par exemple, est $H_2S$ positif, alors qu'*E. coli* est $H_2S$ négatif.

## Étude du métabolisme lipidique

La recherche d'une lipase sur milieu au Tween 80® est détectée par une opacification du milieu, ce qui est le cas

pour *S. aureus*. Le milieu de Baird-Parker contenant de la lécithine, du jaune d'œuf permet de mettre en évidence une lécithinase par apparition d'un halo clair autour des colonies (par exemple *S. aureus*).

## Autres tests

### *Recherche d'une uréase*

La recherche d'une uréase s'effectue en milieu urée-tryptophane (improprement appelé milieu urée-indole). Ce milieu contient du tryptophane, de l'urée et du rouge de phénol comme indicateur de pH. L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne, va être transformée en carbonate d'ammonium alcalin, entraînant une coloration rose-rouge du milieu (fig. 2.27). Ce milieu ne permet pas la croissance bactérienne. Il permet également la recherche d'une tryptophane désaminase selon la méthode précédemment décrite.

### *Recherche d'autres enzymes*

#### Recherche d'une DNAse

La mise en évidence de la production d'une DNAse est effectuée sur une gélose contenant de l'ADN. Les bactéries sont ensemencées en réalisant une strie à la surface de la gélose ; celle-ci est incubée 18 heures à 37 °C. L'hydrolyse de l'ADN est révélée en ajoutant de l'acide chlorhydrique. Lorsque l'ADN a été dégradé, un halo clair est visible au pourtour de la strie, alors que l'ADN, sous l'action de l'acide, est à l'origine d'un précipité blanchâtre (fig. 2.28).

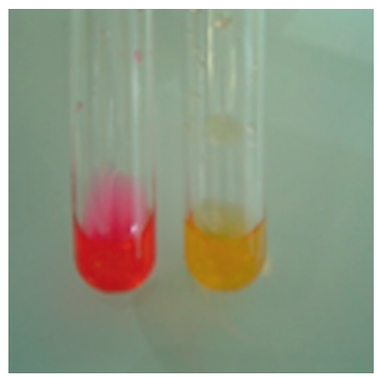


**Fig. 2.27.** – *Mise en évidence de la production d'uréase.* Exemple de réaction positive pour *Proteus mirabilis* à gauche et négative à droite (*E. coli*).

#### Recherche d'une coagulase

La coagulation du plasma de lapin oxalaté par une coagulase s'effectue à partir d'un bouillon enrichi comme le bouillon staphylocoagulase. Un bouillon de 18 heures incubé à 37 °C est mis en contact volume à volume avec du plasma de lapin oxalaté pendant au moins 30 minutes à 37 °C. Si la bactérie possède une coagulase, il y a coagulation du plasma de lapin.

### *Utilisation du citrate comme unique source de carbone*

Le milieu au citrate de Simmons contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothymol. Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur la gélose et, le plus souvent, cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium, ce qui se traduit par un virage du bleu de bromothymol au bleu. Par exemple, *Klebsiella pneumoniae* entraîne une croissance et une coloration bleue du milieu, ce qui n'est pas le cas d'*E. coli*.

## Tests antigéniques utilisés dans l'identification bactérienne

### *Tests d'agglutination à partir des colonies bactériennes*

Un nombre important de réactions d'agglutination participe à l'identification bactérienne. Le plus souvent, ces tests sont fondés sur l'utilisation d'hématies ou de particules de latex sensibilisées avec des anticorps spécifiques du

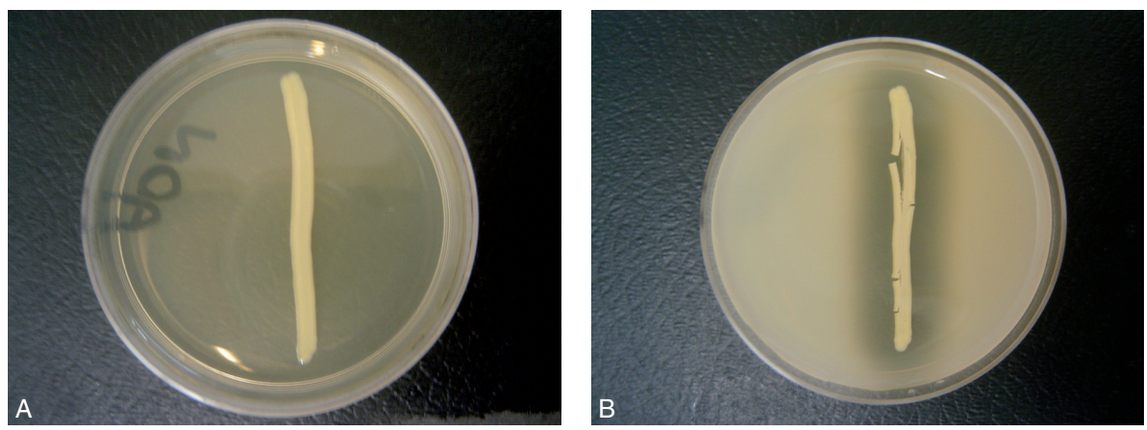



**Fig. 2.28.** – *Recherche de la production d'une DNAse.*
A) *Staphylococcus epidermidis* à gauche (DNAse négative). B) *S. aureus* (DNAse positive).

pathogène recherché. Pour *S. aureus*, plusieurs tests d'agglutination détectant un ou plusieurs antigènes ou récepteurs de surface (récepteur pour le fibrinogène, protéine A, antigènes capsulaires) sont commercialisés. En pratique, il est recommandé d'utiliser deux tests pour l'identification de *S. aureus* : la détection de la coagulase et un test d'agglutination. L'identification des streptocoques β-hémolytiques par agglutination de la structure du polyoside C pariétal participe également à l'identification de ces bactéries.

L'identification des sérotypes bactériens fait appel aux méthodes d'agglutination, fondées sur l'utilisation d'immunsérums polyvalents et monovalents reconnaissant des antigènes bactériens. Dans le cas des salmonelles, les sérotypes sont identifiés sur la base des propriétés antigéniques des antigènes O de paroi et antigènes H flagellaires, et éventuellement la recherche de l'antigène Vi. Pour les *E. coli*, des agglutinations permettent d'identifier certains sérotypes pathogènes dans les selles (O157 : H7, O111, etc.) mais également capsulaires (*E. coli* K1). Une réaction d'agglutination confirme l'identification des espèces de *Shigella*. Divers sérotypes de *P. aeruginosa* peuvent être identifiés sur la base de leurs antigènes O.

### Recherche d'antigènes bactériens dans les milieux biologiques

La présence d'une bactérie peut être détectée par la mise en évidence d'antigènes bactériens de paroi ou de substances sécrétées comme des toxines. Ces antigènes peuvent être détectés au niveau du site infecté ou à distance, par exemple dans les urines. Ainsi, la mise en évidence d'antigènes de *Legionella pneumophila* sérogroupe 1 dans les urines par technique immunochromatographique participe grandement au diagnostic des infections pulmonaires dues aux légionelles de ce sérogroupe. La recherche d'antigènes de pneumocoque dans les urines, par le même type de technique, pour les infections pulmonaires, ou dans les produits pathologiques comme le liquide céphalorachidien dans les méningites à pneumocoque peut contribuer au diagnostic. Les recherches d'antigènes solubles par réaction d'agglutination tendent à être abandonnées au profit des techniques immunochromatographiques ou au profit des techniques moléculaires, plus sensibles et plus spécifiques.

## Galeries miniaturisées et automates d'identification bactérienne

Les tests effectués en tube de 15 ou 20 ml ont été progressivement remplacés depuis de nombreuses années par des tests miniaturisés en galerie dans lesquels les différents substrats étaient déshydratés. Pour n'en citer qu'un seul type, universellement employé, il s'agit du système API® de bioMérieux. Ces tests d'identification sont fondés sur l'étude d'une dizaine, d'une vingtaine ou de 32 caractères en fonction des genres et espèces bactériens à identifier. Ces tests sont fondés soit sur une croissance bactérienne associée à une étude de métabolisme (incubation de 18 à 24 heures, éventuellement prolongée à 48 heures), soit sur une recherche d'activité enzymatique ne nécessitant pas de multiplication bactérienne, l'inoculum de départ étant plus important dans ce cas. Afin de faciliter l'interprétation de ces tests colorimétriques ou turbidimétriques, des appareils de lecture peuvent être utilisés, permettant de faire bénéficier l'utilisateur de logiciels d'interprétation de l'identification.

Actuellement, les tests biochimiques d'identification sont effectués plus souvent sur des automates. Ces automates permettent également la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide pour la plupart des germes courants. Les tests utilisés correspondent à la plupart de ceux précédemment décrits avec l'utilisation, en fonction des utilisateurs et des versions d'automates, de substrats conventionnels, de substrats chromogéniques, fluorescents ou fluorogéniques, de carbohydrates couplés à une lecture colorimétrique, turbidimétrique ou fluorimétrique, etc. Les méthodologies utilisées dépendent des fabricants.

Les systèmes Vitek® technology (bioMérieux) (fig. 2.29A) utilisent des cartes plastiques renfermant des microcupules, chaque cupule contenant un substrat spécifique déshydraté. Une quarantaine de substrats sont testés. Les cartes sont identifiées par un code à barres précisant le type de carte (carte Gram positif, carte Gram négatif, carte anaérobies/corynébactéries, *Neisseria/Haemophilus*), le numéro de lot, la date de péremption. L'inoculum de départ doit être voisin de 0,5 McFarland et le délai d'obtention du résultat variable de 2 à 8 heures pour les Gram positif et de 2 à 10 heures pour les Gram négatif. La lecture est colorimétrique. Les tests varient bien évidemment en fonction des cartes et, sur ce principe, plus de 120 espèces peuvent être identifiées pour les Gram positif et plus de 150 pour les Gram négatif fermentants et non fermentants. Un algorithme d'interprétation est ensuite utilisé par l'appareil pour associer à un taxon particulier des résultats de métabolisme biochimique.

L'automate Phoenix® de la firme BD utilise une démarche assez voisine, avec des caractéristiques assez comparables (fig. 2.29B). Des développements sont en cours chez ces fabricants.

Les appareils WalkAway® de Siemens permettent d'identifier de manière globale un nombre similaire de taxons incluant les genres *Neisseria*/*Haemophilus* et les bactéries anaérobies strictes (fig. 2.29C). Une comparaison des différents taxons identifiables par ces automates est présentée en annexe 2.5.

En fonction des fabricants, ces automates permettent, de façon indépendante de l'identification ou conjointe, de tester la sensibilité des bactéries identifiées aux antibiotiques.

## Autres méthodes d'identification bactérienne

### Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires, en particulier fondées sur les réactions de polymérisation en chaîne (*polymerase*

**Fig. 2.29.** – *Automates d'identification bactériennes.*
A) Vitek 2® (bioMérieux). B) Phoenix® (BD). C) Microscan WalkAway 96 Plus® (Siemens).

*chain reaction* [PCR]), sont utilisées depuis quelques années par les laboratoires et permettent notamment de diagnostiquer des infections dues à des bactéries non ou difficilement cultivables sur milieux classiques ou de croissance lente. Ces méthodes permettent également de mettre en évidence le portage de certaines bactéries. L'approche peut être spécifique de genre ou d'espèce bactérienne en fonction de la spécificité des amorces. Au contraire, une approche dite par « PCR universelle » permet d'amplifier une cible retrouvée chez toutes les espèces bactériennes. L'identification de l'espèce en cause sera alors fondée sur le séquençage du fragment amplifié, puis la comparaison de la séquence obtenue avec les banques de données.

La présence de certains gènes de résistance peut également être recherchée par ces méthodes. C'est le cas notamment pour le bacille tuberculeux, avec la recherche de la résistance à la rifampicine notamment qui est un marqueur de souche multirésistante, et la recherche du gène *mec*A chez les staphylocoques responsables de la résistance aux pénicillines du groupe M.

Certaines de ces méthodes peuvent s'appliquer directement sur le produit pathologique ou bien à partir des cultures.

Les principes généraux seront détaillés dans le chapitre dédié à la biologie moléculaire et ses applications et repris dans les chapitres concernés.

## Spectrométrie de masse

Récemment sont apparus sur le marché des spectromètres de masse fondés sur la technologie MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight*), utilisant des bactéries entières et permettant l'identification bactérienne au rang d'espèce par comparaison des pics protéiques obtenus avec les banques de données. Ces solutions d'identification présentent l'intérêt majeur d'être très rapides (quelques minutes) et de pouvoir tester très facilement plusieurs colonies d'une même boîte. Des essais de cette approche directement sur certains produits pathologiques comme les urines ou sur des bouillons de culture comme les hémocultures sont en cours de validation.

# Annexes – Démarche d'analyse bactériologique

**ANNEXE 2-4**

**Comparaison des principales caractéristiques des automates Phoenix®, Vitek®, et WalkAway®.**

| | *Becton Dickinson* | *bioMérieux* | *Siemens* |
|---|---|---|---|
| **Appareil** | *Phoenix®* | *Vitek 2 compact®* | *WalkAway®* |
| Inoculum | 0,25 McF | 0,5 McF | « 1 colonie » |
| Technique d'inoculation | Facile | Facile | Très facile |
| Risque de contamination | Galerie fermée | Carte fermée | Plaque ouverte |
| Lecture visuelle possible | Non | Non | Oui |
| **Germes identifiés** | | | |
| Staphylocoques | Oui | Oui | Oui |
| Streptocoques | Oui | Oui | Oui |
| Entérocoques | Oui | Oui | Oui |
| *Bacillus* | Oui | Oui | Non |
| *Listeria* | Oui | Oui | Oui |
| Corynébactéries | Oui | Oui | Non |
| Entérobactéries | Oui | Oui | Oui |
| *Pseudomonas* | Oui | Oui | Oui |
| *Haemophilus/Neisseria* | Non | Oui | Oui |
| *Campylobacter* | Non | Oui | Non |
| Anaérobies | Non | Oui | Oui |
| *Antibiogrammes* | | | |
| Staphylocoques | Oui | Oui | Oui |
| Streptocoques | Oui | Non (sauf streptocoque B) | Oui |
| Entérocoques | Oui | Oui | Oui |
| Pneumocoque | Oui | Oui | Oui |
| *Listeria* | Non | Non | Oui |
| Corynébactéries | Non | Non | Non |
| Entérobactéries | Oui | Oui | Oui |
| *Pseudomonas* | Oui | Oui | Oui |
| *Haemophilus/Neisseria* | Non | Non | Non (sauf *Haemophilus*) |
| Anaérobies | Non | Non | Non |
| **Délais de résultat** | | | |
| – ID | En moyenne de 10 à 12 h | De 2 à 10 h (en moyenne 6 à 8 h) | En moyenne 3 h |
| – AB | En moyenne de 10 à 12 h | De 5 à 15 h (en moyenne 7 à 8 h) | En moyenne 5 h (plus si « besoin ») |

**ANNEXE 2-5**

| Organismus | BD Phoenix | carte BD | BioMérieux | carte bioMérieux | Siemens (Walk Away) | Plaques utilisables |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Abiotropha defectiva | non | non | oui | VITEK 2 GP | oui (Abiotropha spp./granulicatella spp. | rapides GP en 2h (2) |
| Aerococcus urinae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Aerococcus viridans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Alloiococcus otitidis | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Arcanobacterium haemolyticum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Arcanobacterium pyogenes | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Bacillus anthracis | non | non | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus cereus | oui | Phoenix GP Taxa | B. cereus/B. thuringiensis/B. mycoides | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus circulans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus coagulans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus licheniformis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus megaterium | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus pumilus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus sphaericus | oui | Phoenix GP Taxa | B. sphaericus/B. fusiformis | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus subtilis | oui | Phoenix GP Taxa | B. subtilis/ B. amyloliquefaciens/B. atrophaeus | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Bacillus thuringiensis | oui | Phoenix GP Taxa | B. cereus/B. thuringiensis/B. mycoides | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Brevibacillus brevis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Brevibacterium species | oui | Phoenix GP Taxa | cf liste fournisseur* | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Cellulomonas turbata | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Corynebacterium amycolatum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Corynebacterium bovis | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Corynebacterium diphtheriae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Corynebacterium jeikeium | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Corynebacterium kutscheri | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Corynebacterium matruchotii | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Corynebacterium minutissimum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Corynebacterium propinquum | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Corynebacterium pseudodiphtheriticum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Corynebacterium pseudotuberculosis | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Corynebacterium renale | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Corynebacterium striatum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Corynebacterium ulcerans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Corynebacterium urealyticum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Corynebacterium xerosis | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Dermabacter hominis | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Dermacoccus nishinomiyaensis | oui | Phoenix GP Taxa | D. nishinomiyaensis/Kytococcus sedentarius | VITEK 2 GP | oui (Micrococcus spp. et apparentés) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus avium | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus casseliflavus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus cecorum | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Enterococcus columbae | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Enterococcus durans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (E. durans/E. hirae) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus faecalis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus faecium | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus gallinarum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus hirae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (E. durans/E. hirae) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus raffinosus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Enterococcus saccharolyticus | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Erysipelothrix rhusiopathiae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Facklamia hominis | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Gardnerella vaginalis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Gemella bergeri | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Gemella haemolysans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Gemella spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Gemella morbillorum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Gemella spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Gemella sanguinis | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Globicatella sanguinis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Globicatella sulfidifaciens | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Granulicatella adiacens | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Granulicatella elegans | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Helcococcus kunzii | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Kocuria kristinae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Kocuria rosea | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Micrococcus spp. et apparentés) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Kocuria varians | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Micrococcus spp. et apparentés) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Kytococcus sedentarius | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | rapides GP en 2h (2) |
| Lactococcus garvieae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |

| Organismus | BD Phoenix | carte BD | BioMérieux | carte bioMérieux | Siemens (Walk Away) | Plaques utilisables |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Lactococcus lactis ssp cremoris | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Lactococcus lactis ssp hordniae | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Lactococcus lactis ssp lactis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Lactococcus plantarum | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Lactococcus raffinolactis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Leifsonia aquatica | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Leuconostoc citreum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Leuconostoc lactis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Leuconostoc spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Leuconostoc mesenteroides ssp dextranicum | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Leuconostoc pseudomesenteroides | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Leuconostoc spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Listeria grayi | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Listeria innocua | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (L. innocua/L. seeligeri) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Listeria ivanovii | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Listeria monocytogenes | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Listeria seeligeri | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Listeria welshimeri | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Macrococcus caseolyticus | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui | rapides GP en 2h (2) |
| Micrococcus luteus | oui | Phoenix GP Taxa | Micrococcus luteus/Micrococcus lyle | VITEK 2 GP | oui (Micrococcus spp. et apparentés) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Micrococcus lylae | oui | Phoenix GP Taxa | Micrococcus luteus/Micrococcus lyle | VITEK 2 GP | oui (Micrococcus spp. et apparentés) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Oerskovia xanthineolytica | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Paenibacillus alvei | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Paenibacillus macerans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 BCL (1) | non | non |
| Pediococcus acidilactici | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Pediococcus spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Pediococcus damnosus | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui (Pediococcus spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Pediococcus dextrinicus | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui (Pediococcus spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Pediococcus parvulus | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui (Pediococcus spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Pediococcus pentosaceus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Pediococcus spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Rhodococcus equi | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Rothia dentocariosa | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui (Rothia spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Rothia mucilaginosa | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui (Rothia spp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Abiotropha defectiva | non | non | oui | VITEK 2 GP | oui (Abiotropha spp./granulicatella spp. | rapides GP en 2h (2) |
| Staphylococcus arlettae | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus aureus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus auricularis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus capitis | oui | Phoenix GP Taxa | S. capitis subsp. capitis/sbsp. ureolyticus | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus capitis ssp capitis | oui | Phoenix GP Taxa | S. capitis subsp. capitis/sbsp. ureolyticus | VITEK 2 GP | oui | conventionnelles GP (3) |
| Staphylococcus capitis ssp ureolyticus | oui | Phoenix GP Taxa | S. capitis subsp. capitis/sbsp. ureolyticus | VITEK 2 GP | oui | conventionnelles GP (3) |
| Staphylococcus caprae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus carnosus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus chromogenes | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus cohnii | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus cohnii ssp cohnii | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | conventionnelles GP (3) |
| Staphylococcus cohnii ssp urealyticum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | conventionnelles GP (3) |
| Staphylococcus epidermidis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus equorum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus felis | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Staphylococcus gallinarum | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus haemolyticus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus hominis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus hyicus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus intermedius | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus kloosii | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus lentus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus lugdunensis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus pasteuri | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus saccharolyticus | non | non | oui | VITEK 2 ANC | non | non |
| Staphylococcus saprophyticus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus schleiferi | oui | Phoenix GP Taxa | S. schleiferi (pas diff. subsp.) | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus schleiferi ssp coagulans | oui | Phoenix GP Taxa | S. schleiferi (pas diff. subsp.) | VITEK 2 GP | oui | conventionnelles GP (3) |
| Staphylococcus schleiferi ssp schleiferi | oui | Phoenix GP Taxa | S. schleiferi (pas diff. subsp.) | VITEK 2 GP | oui | conventionnelles GP (3) |
| Staphylococcus sciuri | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus simulans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |

| Organismus | BD Phoenix | carte BD | BioMérieux | carte bioMérieux | Siemens (Walk Away) | Plaques utilisables |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Staphylococcus vitulinus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Staphylococcus warneri | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Staphylococcus xylosus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus acidominimus | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Streptococcus agalactiae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus alactolyticus | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus anginosus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | rapides GP en 2h (2) |
| Streptococcus anginosus group | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui | conventionnelles GP (3) |
| Streptococcus bovis | oui | Phoenix GP Taxa | Streptococcus infantarius spp. coli/S. bovis | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus bovis I | oui | Phoenix GP Taxa | Streptococcus infantarius spp. coli/S. bovis | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus bovis II | oui | Phoenix GP Taxa | Streptococcus infantarius spp. coli/S. bovis | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus canis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus constellatus spp. constellatus | S. constellatus (pas diff. subsp. | S. constellaltus (pas diff. subsp. | S. constellaltus (pas diff. subsp.) | S. constellaltus (pas diff. subsp. | S. constellatus (pas diff. subsp.) | rapides GP en 2h (2) |
| Streptococcus constellatus spp. pharyngis | S. constellatus (pas diff. subsp. | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | S. constellatus (pas diff. subsp.) | rapides GP en 2h (2) |
| Streptococcus cristatus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus downei | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus dysgalactiae ssp dysgalactiae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui S. dysgalactiae (pas diff. subsp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus dysgalactiae ssp equisimilis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui S. dysgalactiae (pas diff. subsp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus dysgalactiae/canis | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | oui S. dysgalactiae (pas diff. subsp.) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus equi | oui | Phoenix GP Taxa | treptococcus equi ssp equi/ssp. zooepidemicu | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus equi ssp equi | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus equi ssp zooepidemicus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus equinus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus gallolyticus spp. gallolyticus | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus gallolyticus spp. Pasteurianus | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus gordonii | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus group C/G | oui | Phoenix GP Taxa | non | non | non | non |
| Streptococcus hyointestinalis | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus infantarius spp. infantarius | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus infantarius spp. coli/S. bovis | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus intermedius | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | rapides GP en 2h (2) |
| Streptococcus mitis | oui | Phoenix GP Taxa | Streptococcus mitis/oralis | VITEK 2 GP | oui (S. mitis/S. oralis) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus mitis group | oui | Phoenix GP Taxa | Streptococcus mitis/oralis | VITEK 2 GP | oui (S. mitis/S. oralis) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus mutans | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus oralis | oui | Phoenix GP Taxa | Streptococcus mitis/oralis | VITEK 2 GP | oui (S. mitis/S. oralis) | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus ovis | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus parasanguinis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus pluranimalium | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus pneumoniae | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus porcinus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus pyogenes | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus salivarius | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus sanguinis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | oui | apides et conventionnelles GP (2)(3) |
| Streptococcus sobrinus | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus suis I | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus suis II | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus thermophilus | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus thoraltensis | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus uberis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Streptococcus vestibularis | oui | Phoenix GP Taxa | oui | VITEK 2 GP | non | non |
| Vagococcus fluvialis | non | non | oui | VITEK 2 GP | non | non |

(1) VITEK 2 BCL (non IVD/CE) - Liste non exhaustive
(2) Plaques rapides d'identifications Gram Positifs en 2h (RPID2, S+PC3)
(3) Plaques conventionnelles d'identification Gram positifs en 16/18h (PID2, PC30, PSC28)

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Carbonnelle B, Denis F, Marmonier A, Pinon G, Vargues R. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Simep; 1987.

Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. Microbiologie immunologie. Diagnostics Pasteur. Oxoid Le Manuel Éditions; 2001.

Marchal N, Bourdon JL, Richard C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris : Doin; 1982.

CHAPITRE

3

# Diagnostic rapide en bactériologie par recherche d'antigènes

F. Denis, M.-C. Ploy

Un test de diagnostic rapide permet d'aboutir à un diagnostic biologique de certitude ou de quasi-certitude dans un délai plus court que la technique de référence, généralement compris entre quelques minutes et quelques heures. L'identification rapide de la bactérie responsable de l'infection est particulièrement intéressante dans des infections graves (méningites, sepsis sévères, détresses respiratoires aiguës, etc.) pour lesquelles un retard de traitement ou un traitement inadapté sont des facteurs de risque de mortalité.

La plupart des tests disponibles sur le marché français ont fait l'objet d'un enregistrement auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS) ou d'un marquage de la Communauté européenne (CE).

## Antigènes recherchés

Les antigènes tels que flagelles, pili, protéines de surface (*outer membranes* [OM]), acides teichoïques ont donné lieu, jusqu'à maintenant, à peu de développements dans une perspective de diagnostic. Toutefois, des publications récentes font état de résultats encourageants dans la recherche de protéines OM d'*Haemophilus* et d'antigènes flagellaires de *Salmonella*. Les antigènes capsulaires polysaccharidiques des pneumocoques, *Haemophilus*, méningocoques sont les plus couramment recherchés. Des travaux ont aussi porté sur l'antigène Vi de *Salmonella* Typhi. Le polyoside C des streptocoques, constituant de la paroi, peut aussi être détecté (surtout streptocoques A et B et récemment *Streptococcus pneumoniae*). La recherche de toxines de nature protéique connaît de récents développements.

### Antigènes solubles ou diffusibles

Ces antigènes peuvent être mis en évidence au siège de l'infection, mais ils peuvent aussi être retrouvés à distance. Ainsi, en cas de méningite, il y a une diffusion LCR-sérum-urine ; dans les pneumopathies, la diffusion poumon-sérum-urine est classique (fig. 3.1). Au cours de leur diffusion, les antigènes peuvent être dégradés – c'est le cas pour *S. pneumoniae* sérotype 1 par exemple (urines) –, ou bien être éliminés sous forme native. Les antigènes polysaccharidiques, très résistants, peuvent persister plus longtemps dans l'organisme que les bactéries viables ; des éliminations d'antigènes sur plusieurs semaines après la guérison, notamment dans les pneumopathies, ont été décrites, ce qui peut permettre des diagnostics rétrospectifs.

### Antigènes extractibles

À côté des antigènes solubles, on peut rechercher des antigènes « solubilisables » dont la mise en évidence nécessite, avant détection, une extraction préalable (antigènes streptococciques par exemple), par action chimique (réaction nitreuse) ou enzymatique. Il semble donc préférable de parler d'antigéno-diagnostic plutôt que de recherche d'antigènes solubles.

## Techniques utilisées

Dans la pratique, à ce jour, les techniques qui ont débouché sur des applications de routine, voire sur la commercialisation de réactifs tout prêts, utilisent l'immunofluorescence, l'immunocapture, la contre-immunoélectrophorèse, l'agglutination de particules de latex et les techniques immuno-enzymatiques.

### Immunofluorescence (IF)

Les anticorps commercialisés sont utilisés en immunofluorescence directe ou indirecte. Ils sont dirigés contre *Escherichia coli*, certains sérotypes de *Salmonella*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus, Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae* sérotypes a à f, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* (90 sérotypes) et *Streptococcus* des groupes A, B, C, etc., *Chlamydia trachomatis.* Des techniques d'IF ont été utilisées dans le diagnostic étiologique de certaines infections cutanées (*Streptococcus, Haemophilus influenzae*) ou de méningites purulentes avec des résultats très intéressants. L'IF peut être pratiquée après concentration de l'échantillon, par centrifugation ou filtration. Mais la qualité des anticorps, l'expérience du lecteur sont autant de facteurs limitants de l'IF.

### Contre-immunoélectrophorèse (CIE)

Tout dépend de la qualité de l'antisérum. Les plus utilisés sont dirigés contre *H. influenzae* (a à f), *S. pneumoniae*

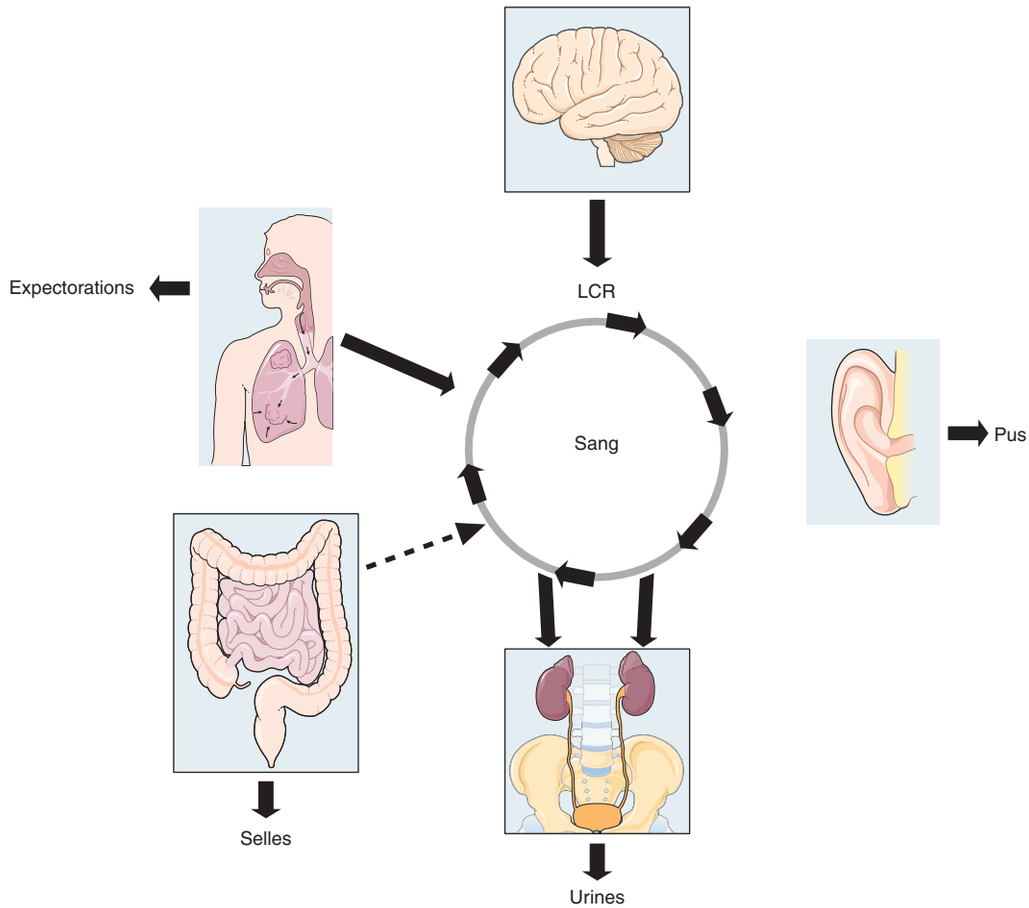



Fig. 3.1. – *Circulation et localisation des antigènes solubles dans l'organisme.*

(91 sérotypes), *N. meningitidis* (A, B, C, 29E, Y, W135), *Streptococcus* (A, B, C, etc.), *Listeria monocytogenes*. C'est une technique un peu fastidieuse, peu utilisée en routine.

## Agglutination

Les anticorps sont fixés sur des particules. Quand ces dernières, sensibilisées, sont mises en présence des antigènes homologues présents dans le produit biologique ou son extrait, une agglutination visible à l'œil nu apparaît en quelques minutes. On trouve des particules sensibilisées (latex ou staphylocoques porteurs de protéine A ; on parle alors de coagglutination) avec les anticorps suivants : *H. influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae* (91 sérotypes), *Streptococcus* (A, B, etc.), *N. meningitidis* (A, B, C, 29E, Y, W135), *Escherichia coli* K1 (indirectement par communauté antigénique avec *N. meningitidis* B). Des réactifs d'agglutination permettant la détection de toxines existent : toxines de *Clostridium difficile*, de *Vibrio cholerae*, d'*E. coli* (LT, ST) notamment, mais pour ces dernières espèces, ils se prêtent plus à la recherche d'antigènes sur culture que sur produit pathologique.

## Immunocapture (ou immunochromatographie) sur membrane

Cette technique a révolutionné le diagnostic rapide. L'échantillon à tester est déposé à l'une des extrémités d'une membrane de nitrocellulose. Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec les anticorps de lapin spécifiques marqués à l'or colloïdal. Sous l'effet d'un tampon de lyse-migration, les complexes antigène–anticorps migrent par capillarité et sont arrêtés par des anticorps de capture fixés sur la membrane. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée. Un contrôle interne permet de valider chaque test.

Différents antigènes peuvent être recherchés en immunocapture. Certaines recherches relèvent de la routine : antigènes legionelles et pneumocoques sur urines, toxines de *Clostridium difficile* sur selles, antigènes de groupe A de *Streptococcus pyogenes* sur prélèvements de gorge et de groupe B de *Streptococcus agalactiae* sur prélèvements génitaux ou mère–enfant, *Helicobacter pylori* dans les selles, *Chlamydia trachomatis* sur prélèvement d'endocol.

D'autres recherches, plus confidentielles, peuvent être appelées à des développements tels que la toxine diphtérique sur prélèvements de gorge, antigène F1 de *Yersinia pestis* sur prélèvements bronchiques, de *Treponema pallidum* ou de *Neisseria gonorrhoeae* sur prélèvements génitaux.

**ENCADRÉ**

Il est très difficile d'évaluer les performances relatives des différentes techniques et trousses, mais afin de disposer d'un ordre de grandeur, nous avons regroupé des données de la littérature concernant les seuils de détection pour les antigènes pneumococciques (tableau 3.1), en évaluant les performances comparées des différentes approches dans le diagnostic antigénique des méningites purulentes (tableau 3.2) et en comparant toutes les techniques disponibles (tableau 3.3) dans la même pathologie.

### Immuno-enzymatiques

Des tests ELISA ont été développés pour la recherche d'antigènes (*Legionella* dans les urines, toxines de *Clostridium difficile* dans les selles, *Chlamydia trachomatis* sur prélèvements génitaux).

## Trousses commerciales

Comme il n'est pas possible de passer en revue toutes les trousses utilisant tous les principes précédents, nous développerons seulement les recherches les plus usuelles en passant brièvement en revue leurs performances et leurs limites. Parmi celles-ci, on retrouve les réactivités croisées souvent plus théoriques que réelles (fig. 3.2) illustrées pour *Neisseria meningitidis*, les communautés antigéniques pour *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* ayant été détaillées dans des revues synthétiques.

### *Chlamydia trachomatis*

Les antigènes recherchés le sont à l'aide d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, voire de mélange de monoclonaux dirigés contre la protéine majeure de membrane externe : MOMP (spécificité d'espèce) et/ou le lipopolysaccharide (LPS ; spécificité de genre).

Selon les études, la sensibilité des trousses ELISA va, pour les prélèvements endocervicaux ou urétraux, de 54 à 85 %, et sur urines de 68 à 73 % avec une spécificité allant de 92 à 100 %.

La recherche d'antigènes de *C. trachomatis* peut se faire directement sur frottis par immunofluorescence à la recherche de corps élémentaires extracellulaires avec une grande sensibilité pour un observateur entraîné, mais avec l'inconvénient d'une certaine subjectivité ; avec un observateur compétent, la spécificité est excellente. Les tests ELISA et apparentés permettent de disposer d'un résultat objectif ; ils ont l'avantage, pour les tests sur membrane, d'être d'utilisation simple et rapide (30 minutes), mais s'ils sont utilisables sur prélèvements cervicaux ou urines et ont pour inconvénient majeur leur manque de sensibilité et de spécificité, le recours à des réactifs de confirmation permet d'améliorer les performances. Récemment, certaines trousses ont revendiqué des sensibilités et spécificités respectivement de 92 à 99 % ; mais tout dépend de la référence culture ou biologie moléculaire.

Une revue de la littérature et une étude comparative nationale des performances techniques de diagnostic direct permettent de situer les recherches d'antigènes par rapport à la culture et aux outils de biologie moléculaire dans la recherche de *C. trachomatis* (fig. 3.3).

**TABLEAU 3-1**

**Sensibilité comparée des différentes techniques de détection d'antigènes pneumococciques.**

| *Technique* | *Antigène purifié (ng/ml)* | *Unités formant colonie (UFC/ml)* | *Auteurs* |
|---|---|---|---|
| Contre-immunoélectrophorèse* | 25–60<br>0,2–25 | $10^4$–$10^5$<br>– | Harding et Brown<br>Harding et Brown |
| Agglutination Latex* | 10–100<br>6–30 | –<br>$10^4$ | Denis<br>Harding et Brown |
| Coagglutination* | 0,5–5 | – | Denis |
| RIA* | 1–5 | $10^2$–$10^3$ | Harding et Brown |
| ELISA* | 0,1 | $10^4$–$10^8$ | Cima-Cobal |
| ELISA** | ND | | ND |
| Immunochromatographie*** | | $10^4$–$10^5$ | |

* Antigène capsulaire
** Pneumolysine
*** Polysaccharide C
ND : non donné.

**TABLEAU 3-2**

**Sensibilité (en %) des recherches d'antigènes dans le LCR au cours de méningites purulentes selon les techniques et selon les espèces bactériennes (données cumulées personnelles et bibliographiques).**

| *Germes* | *Technique* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *CIE** | *LATEX* | *COAGGL*** | *ELISA* |
| *N. meningitidis* | 72,6 | 88,1 | 46,5 | 96,9 |
| *S. pneumoniae* | 80,9 | 82,0 | 73,8 | 93,3 |
| *H. influenzae* b | 89,0 | 90,6 | 86,0 | 96,7 |
| *S. agalactiae* B | 68,2 | 80,1 | 67,3 | 100 |
| *E. coli* K1 | 77,9 | – | – | – |
| **Total nombre** | **3587** | **2748** | **755** | **103** |

* Contre-immuno-électrophorèse
** Coagglutination.

**TABLEAU 3-3**

**Sensibilité de différents tests de diagnostic comparés à la recherche d'antigènes dans des méningites bactériennes (données cumulées adaptées de Brouwer et al.).**

| *Germe* | *Hémocultures Sensibilité %* | *Gram sur LCR Sensibilité %* | *Agglutination latex LCR Sensibilité %* | *PCR LCR* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | *Sensibilité %* | *Spécificité %* |
| *Haemophilus influenzae* | 25–90 | 25–65 | 78–100 | 72–92 | 100 |
| *Streptococcus pneumoniae* | 60–90 | 69–93 | 59–100 | 61–100 | 100 |
| *Neisseria meningitidis* | 40–60 | 30–89 | 22–93 | 88–94 | 100 |

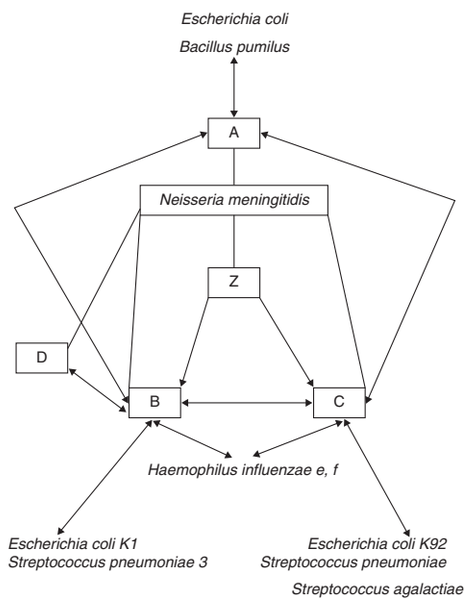



**Fig. 3.2.** – *Communautés antigéniques entre* N. meningitidis *et d'autres germes (données personnelles).*

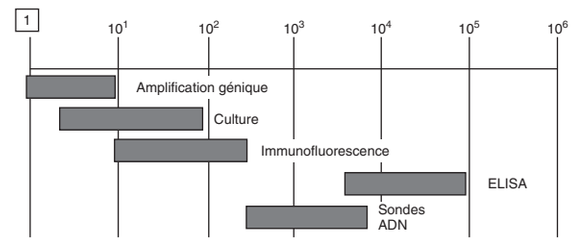



**Fig. 3.3.** – *Limites comparées des différentes techniques de diagnostic direct de* C. trachomatis. *Le nombre indiqué correspond au seuil de détection exprimé en logarithme de corps élémentaires.*

## *Clostridium difficile*

Durant ces dix dernières années, de très nombreuses techniques immuno-enzymatiques (ELISA) recherchant les toxines de *C. difficile* dans les selles ont été commercialisées.

Les trousses utilisent des anticorps monoclonaux dirigés soit contre la toxine A (Immuno Card toxine A®, Meridian ; Tox A test®, Bio Whittake ; Vidas®, bioMérieux), soit contre les toxines A et B (cytoclone A + B'®, Biotech ;

Immuno Card®, Meridian ; X-Pect®, Oxoid ; Vidas®, bioMérieux), de rares souches ne produisant que la toxine B ayant été décrites.

Une autre approche recherche la toxine A et détecte en même temps la glutamate déshydrogénase (GDH), enzyme spécifique de *C. difficile*, que les souches soient ou non toxinogènes (Triage *C. difficile* panel®, Biosite Diagnostics, *C. difficile* check complete, Techlab).

La sensibilité des trousses de détection de la toxine A est d'environ 80 % ; l'addition du test GDH permet d'accroître la valeur prédictive négative. La négativité des deux tests signifie que la présence d'une souche toxinogène peut être exclue avec une fiabilité de 99,6 %.

Les nouveaux tests immunochromatographiques (Immuno Card Toxines A et B® ICTAB ; Meridian, X-Pect®, Oxoid) ont des performances excellentes en termes de sensibilité : 86 à 91 % ; spécificité : 96 à 97 % ; supérieures à celles de la PCR en temps réel.

## *Legionella pneumophila*

La recherche des antigènes urinaires de *L. pneumophila* a révolutionné le diagnostic des légionelloses puisqu'au moins 80 % de patients atteints de cette maladie ont dans leurs urines des antigènes détectables dès l'apparition des symptômes. L'élimination se prolonge plusieurs semaines voire plusieurs mois après la survenue de la pneumopathie.

On recherche le lipopolysaccharide (LPS) de cette espèce, mais actuellement les trousses ne détectent que les antigènes spécifiques de *L. pneumophila* de sérogroupe 1.

Les antigènes sont détectables par méthode radio-immunologique (RIA) ou immuno-enzymatique (ELISA). Un test unitaire reposant sur l'immunochromatographie sur membrane : le Now® Legionella (Oxoid, Dardilly, France) a des performances similaires aux ELISA tout en donnant une réponse très rapide (en 15 minutes).

Afin d'accroître la sensibilité, il est recommandé de concentrer préalablement les urines par ultrafiltration sélective (sur Minicon × 15 à 25 fois) ; cette étape ne diminue pas la spécificité. La sensibilité varie selon qu'on prenne en compte tous les sérogroupes de *L. pneumophila* : sensibilité de 56 % ; ou seulement *L. pneumophila* sérogroupe 1 (seul revendiqué par la trousse) : sensibilité de 80 %. La spécificité est excellente, de l'ordre de 99 %, et les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) sont respectivement de 86 % et 95 %.

**ENCADRÉ**

À noter que la recherche d'antigènes reste positive, même si le patient a déjà reçu des antibiotiques, et qu'elle peut être pratiquée rétrospectivement sur des urines stockées à +4 °C, voire sur des urines conservées plusieurs mois à –70 °C.

## *Streptococcus pneumoniae*

Parmi les antigènes pneumococciques, on peut rechercher :

- des antigènes capsulaires avec une difficulté liée à la diversité de ceux-ci puisqu'on identifie 91 sérotypes différents ;
- ou le polysaccharide C ou la substance C constitués d'acides teichoïques, qui est spécifique d'espèce.

Ces antigènes peuvent être retrouvés au niveau du foyer infectieux, mais ils diffusent aussi dans le sang voire dans les urines, où ils sont retrouvés soit sous forme native, soit sous forme dégradée (certains antigènes capsulaires).

La recherche des antigènes capsulaires peut être réalisée par agglutination de particules de latex sensibilisées, directement sur le LCR après l'avoir chauffé à 100 °C durant 5 minutes. Cette recherche peut aussi être effectuée sur sérum chauffé à 56 °C pendant 30 minutes ou sur les urines concentrées et chauffées 5 minutes à 100 °C. Les performances obtenues avec le Slidex Meningite Kit® (bioMérieux) ou le Wellcogen *S. pneumoniae*® (Wellcome) sont dans les méningites de l'ordre de 82 % en termes de sensibilité. À titre comparatif, la sensibilité de la contre-immuno-électrophorèse (en échec pour les types 7 et 14 non chargés électriquement) était de 81 % et celle de la coagglutination de 74 % (tableau 3.2).

Des essais récents de recherche d'antigènes capsulaires de 13 sérotypes dans les urines prélevées au cours de pneumopathies par technique ELISA sont encourageants, avec une sensibilité de 89,8 % et une spécificité de 98,8 %, mais il s'agit de trousses non commercialisées.

Un test unitaire immunochromatographique existe pour détecter le polyoside C et permet ainsi de rechercher tous les sérotypes de *S. pneumoniae* (Now® *Streptococcus pneumoniae*, Oxoid) (fig. 3.4). Ce test peut être pratiqué sur urines directement ou après concentration, mais peut aussi être utilisé sur le LCR en cas de suspicion de méningites à pneumocoques ou sur le liquide pleural, mais cette application n'est pas validée par le fabricant. La recherche d'antigènes pneumococciques dans les urines n'est pas informative pour les enfants, car ils sont

**Fig. 3.4.** – *Test urinaire immuno-chromatographique de recherche d'antigènes pneumococciques dans les urines.* A) Test positif. B) Test négatif.

souvent colonisés au niveau du rhinopharynx par des souches de pneumocoque et peuvent excréter des antigènes dans les urines sans infection vraie. Par ailleurs, ce test est influencé par une prise précoce d'antibiotique. La sensibilité du test Now® *Streptococcus pneumoniae* dans les urines varie de 80 à 90 % et la spécificité de 76 à 97 % selon les études. À noter que l'élimination des antigènes peut se prolonger sur des semaines voire des mois après mise sous traitement.

Sur LCR, les performances sont très intéressantes, avec une sensibilité de 95 % et une spécificité de 100 %, et l'utilisation de ce test a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) pour le diagnostic de méningite à pneumocoque.

## *Streptococcus pyogenes*

Afin de rendre le diagnostic d'angine à streptocoque de groupe A accessible au médecin traitant, des tests de diagnostic rapide recherchant le polyoside C de groupe A (fig. 3.5) permettent de ne traiter que les angines streptococciques.

À partir d'un écouvillonnage de la région amygdalienne pratiqué sous contrôle visuel, l'écouvillon est plongé dans un tube permettant l'extraction chimique du polysaccharide spécifique. La bandelette test est placée dans le tube ; en présence de l'antigène, un complexe est formé avec un anticorps spécifique couplé à des particules de couleur. Après migration, ce complexe va se fixer sur un anticorps de capture faisant apparaître, en cas de positivité, une bande témoin de la positivité du test. Le temps global de réalisation est de 5 à 7 minutes. La sensibilité du test est supérieure à 90 % et sa spécificité de l'ordre de 95 % en prenant comme référence la culture sur gélose au sang en anaérobiose avec incubation de 48 heures. Le risque de faux négatif serait de l'ordre de 2 %. Ces résultats ont été confirmés par une évaluation réalisée par l'Afssaps sur 16 trousses.

Une étude comparant un test antigène rapide (GAS : *group A Streptococcus antigen Test*®, Thermo BioStar, Boulder, Colo) et une sonde (Gen-Probe®, San Diego C) montre des performances en termes de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives respectivement de 86, 97, 94, 93 % pour le test antigène et de 95, 100, 100, 94 % pour la recherche d'ADN.

Les trousses de détection rapide d'antigène streptococcique de groupe A paraissent donc avoir des performances honorables, très supérieures aux tests de première génération. Toutefois, les mêmes trousses ont, entre les mains des biologistes, des performances un peu supérieures à

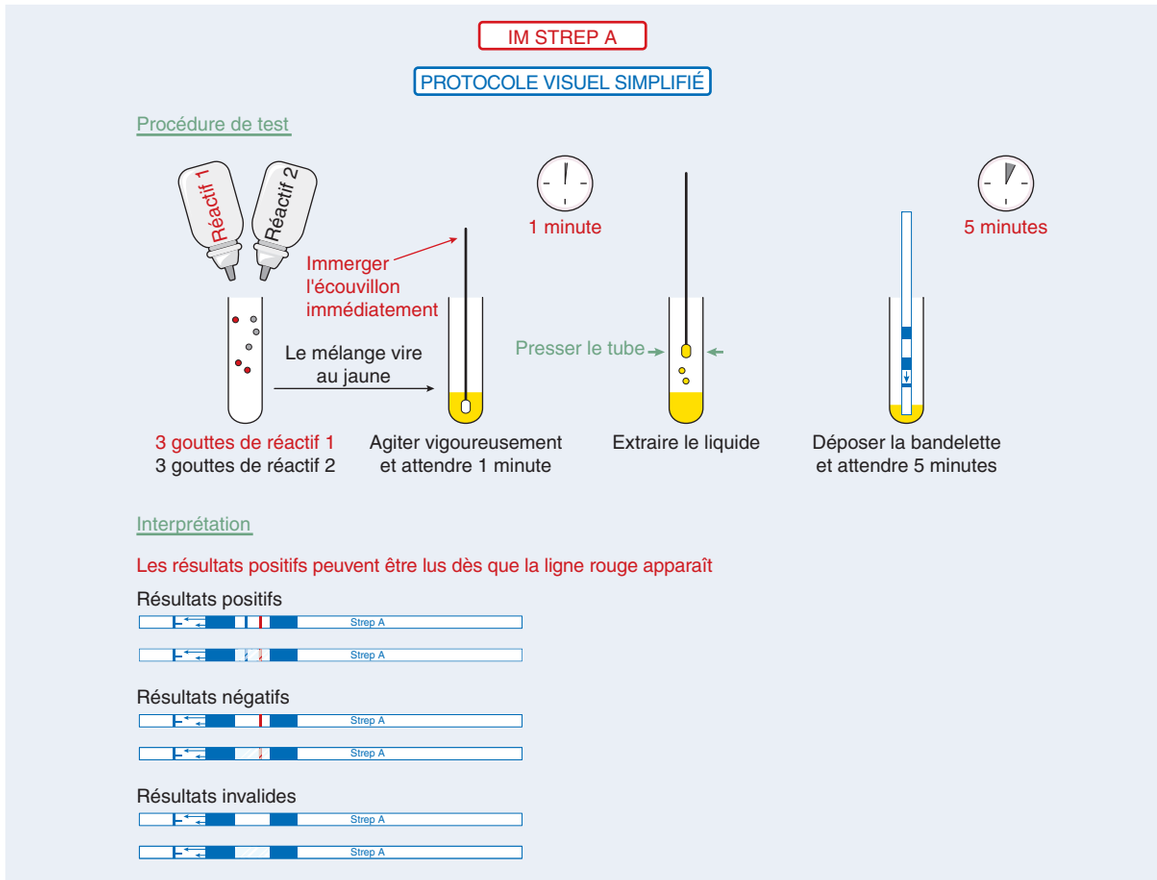



**Fig. 3.5.** – *Principe et interprétation du test rapide de dépistage de* Streptococcus pyogenes *(GAS) dans la gorge.*

celles obtenues quand elles sont utilisées par les infirmiers ou médecins dans le cadre d'une utilisation comme *doctor test*.

### Helicobacter pylori

Dans la prise en charge de l'infection à *Helicobacter pylori*, le Groupe d'études français des Hélicobacters (GEFH) a recommandé le dépistage d'*H. pylori* et l'éradication chez toutes les personnes infectées.

À côté de la biopsie gastrique, des méthodes non invasives sont proposées. Parmi elles, la recherche d'antigènes dans les selles est un test qui a montré une sensibilité de 96 % et une spécificité de 91 à 93 % (Immuno Card HpSA®, Meridian), et des valeurs prédictives positives et négatives respectivement de 90 et 96 %.

### Neisseria meningitidis

Les infections sévères à méningocoque à type de purpura fulminans ont une morbidité élevée. Il est donc nécessaire d'obtenir le plus rapidement possible un diagnostic étiologique. La recherche d'antigènes solubles sur LCR, sérum ou urines peut permettre d'identifier rapidement l'espèce *Neisseria meningitidis* mais aussi le sérogroupe. La détermination en urgence du sérogroupe est très importante car les mesures de prophylaxie (vaccination) des sujets contacts diffèrent selon le sérogroupe.

La recherche des antigènes capsulaires est réalisée par agglutination de particules de latex sensibilisées avec des anticorps dirigés contre les différents sérogroupes de *Neisseria meningitidis* (principalement A, B et C). Les performances sont meilleures pour les sérogroupes A et C que pour le sérogroupe B. On peut regretter le fait que des tests immunochromatographiques n'aient pas été développés dans le diagnostic d'infection et de sérogroupe méningococcique, laissant la place à la biologie moléculaire (PCR, PCR temps réel, etc.).

## Conclusion

Le recours aux tests de diagnostic rapide devrait progresser au cours des années à venir. Ces trousses sont de mieux en mieux adaptées aux situations d'urgence en améliorant leurs performances intrinsèques. La rapidité n'est pas ennemie de la qualité.

Sur le terrain, en zone d'endémie, des trousses immunochromatographiques recherchant *Yersinia pestis* et la toxine de *Vibrio cholerae* ont donné des résultats encourageants.

De nouvelles technologies apparaissent, et révolutionneront probablement nos futures pratiques.

On devrait, dans la prochaine décennie, pouvoir faire la part du diagnostic rapide par recherche d'antigènes et recherche de séquences génomiques spécifiques.

La mise en œuvre de tests de diagnostic rapide doit précéder voire accompagner les procédures conventionnelles de diagnostic biologique et non les remplacer.

L'exemple de la recherche des antigènes urinaires de *Legionella* est à ce point de vue exemplaire, puisqu'elle a révolutionné le diagnostic de légionellose en routine. Mais devant un test positif, tout bactériologiste motivé a à cœur d'obtenir la souche en culture pour compléter l'étude épidémiologique, et le test rapide permet ainsi de faire progresser la bactériologie classique.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Bianchi A, De Barberac B, Bebear C, et al. Étude comparative de la sensibilité de 28 trousses de diagnostic direct des infections à *Chlamydia trachomatis* dans le cadre d'une réévaluation pour l'Agence du médicament. Rev Frcse Lab 1998 ; 306 : 47–52.

Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev 1997 ; 10 : 160–84.

Brouwer MC, Tunkel AR, Van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitidis. Clin Microbiol Rev 2010 ; 23 : 467–92.

Butler JC, Bosshardt SC, Phelan M, et al. Classical and latent class analysis evaluation of sputum polymerase chain reaction and urine antigen testing for diagnosic of pneumococcal pneumonia in adults. J Infect Dis 2003 ; 187 : 1416–23.

Chakour M, Koeck JL, Maslin J, et al. Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique : état des lieux et perspectives. Med Mal Infect 2003 ; 33 : 396–412.

Chapin KC, Blake P, Wilson CD. Performance characteristics and utilisation of rapid antigen test, DNA probe and culture for detection of group A Streptococci in an acute care clinic. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 4207–10.

Charlier-Bret N, Boucher B, Poyart C, et al. Tests de diagnostic rapide des angines à Streptocoque du groupe A : étude comparative de la sensibilité et de la praticabilité de 16 dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* dans le cadre d'un contrôle du marché effectué par l'AFSSAPS en juillet 2002. Path Biol 2004 ; 52 : 438–43.

Denis F. Techniques de diagnostic rapide des antigènes bactériens : actualités et perspectives. Lettre Infectiologue 1992 ; 7 : 575–84.

Denis F, Martin C, Ploy MC. L'érysipèle : données microbiologiques et pathogéniques. Med Mal Infect 2000 ; 30 : 296–305.

Doleans-Jordheim A, Guillot B, Issabre Y, Freney J. Tests rapides en bactériologie. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de Bactériologie clinique. 2e éd Paris : ESKA ; 2007. p. 129–52.

Dominguez JA, Gali N, Pedroso P, et al. Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* urine antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both

**POUR EN SAVOIR PLUS**

concentrated and non concentrated urine samples. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 2718–22.

Leeming JP, Cartwright K, Morris R, et al. Diagnosis invasive pneumococcal infection by serotype-specific urinary antigen detection. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 4972–6.

Magentie H, Decoster A, Bongo R, et al. Détection rapide des antigènes pneumococciques urinaires par le test Now *S. pneumoniae* Binax®. Ann Biol Clin (Paris) 2003 ; 61 : 106–9.

Ploton C, Freydiere AM, Benito Y, et al. Pleuropneumopathie à *Streptococcus pneumoniae* chez l'enfant : diagnostic rapide avec le test immunochromatographique Binax NOW sur les liquides pleuraux. Path Biol 2006 ; 54 : 498–501.

Samra Z, Shmuely H, Nahum D, et al. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitidis. Diagn Microbiol Infect Dis 2003 ; 45 : 237–40.

Smith MD, Derrington P, Evans R, et al. Rapid diagnosis of bacteriemic pneumococcal infections in adults by using Binax® Now *S. pneumoniae* urinary antigen test : a prospective, controlled clinical evaluation. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 2810–3.

Van Den Berg R, Bruijnesteijn Van Coppenraet LS, Gerritsen HS, et al. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *C. difficile* associated diarrhea in hospitalized patients. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 5338–40.

CHAPITRE

4

# Biologie moléculaire : application à la détection, à l'identification et au génotypage

F. Garnier, C. Burucoa, P. Lanotte

Les méthodes « traditionnelles » de bactériologie médicale nous permettent d'obtenir une identification bactérienne et un antibiogramme en plusieurs jours voire plusieurs semaines selon la bactérie considérée. Pendant ce temps, un traitement présomptif reposant sur des données cliniques est instauré. Afin de gagner du temps en raccourcissant les délais de diagnostic et l'identification de mécanismes de résistances, plusieurs approches sont explorées, notamment la biologie moléculaire qui permet de disposer de réponses non plus en termes de jours mais d'heures.

La biologie moléculaire regroupe un ensemble de techniques reposant sur l'étude et la détection des acides nucléiques. Développées depuis les années 1970, ces techniques ont permis le développement de tests de détection et d'identification rapides, sensibles et spécifiques. L'avènement de la *polymerase chain reaction* (PCR) en temps réel a permis de disposer de trousses proposées par différents fournisseurs permettant à la biologie moléculaire de prendre une place importante dans les laboratoires de bactériologie médicale. Nous aborderons successivement dans ce chapitre l'organisation du secteur de biologie moléculaire d'un laboratoire, les principes de la biologie moléculaire, l'utilisation de la biologie moléculaire dans un laboratoire de bactériologie et, enfin, le typage moléculaire des souches.

## Organisation d'un laboratoire de biologie moléculaire

Du fait de la grande sensibilité des techniques de biologie moléculaire, notamment la PCR, qu'elle soit en point final ou en temps réel, des recommandations ont été émises quant à l'agencement des différentes pièces et à l'organisation du laboratoire. Le but de ces recommandations est de réduire au maximum le risque de contamination des échantillons à analyser par des produits obtenus lors de précédentes réactions de PCR. La première des recommandations vise à séparer physiquement les différentes pièces nécessaires pour la bonne pratique de la biologie moléculaire en général, c'est-à-dire :

- une pièce d'extraction des acides nucléiques, séparée en deux secteurs bien distincts, l'un où l'on pratique l'extraction à partir des prélèvements alors que l'inoculum bactérien de départ est peu important, et l'autre où l'on réalise l'extraction de l'ADN à partir des souches, donc dans un contexte où l'inoculum est très important et le risque de contamination plus élevé ;
- une pièce de préparation des mix, où aucun acide nucléique ne doit rentrer ;
- une pièce du mélange réactionnel (acide nucléique + mix) ;
- une pièce PCR ;
- une pièce post-PCR pour pouvoir étudier les fragments amplifiés obtenus.

En complément de cette séparation, il est fortement recommandé de placer les pièces d'extraction des acides nucléiques, de préparation des mix et du mélange réactionnel en surpression afin d'éviter l'entrée dans les pièces de tout produit potentiellement contaminant. En revanche, la pièce post-PCR devrait idéalement être en dépression afin d'éviter la sortie de fragments amplifiés.

Bien entendu, le matériel utilisé pour toutes les manipulations est dédié à chacune des pièces et ne doit en aucun cas être transféré d'une pièce à l'autre. Un démontage suivi d'un nettoyage des pipettes de chacune des pièces à l'aide d'une solution dégradant les acides nucléiques doit être programmé régulièrement.

De plus, avant toute entrée dans l'une des pièces, il est recommandé de retirer sa blouse et de mettre une surblouse, une coiffe couvrant les cheveux ainsi que des gants, le tout à usage unique ou spécifique de la pièce dans laquelle la personne va rentrer.

Quant à la bonne circulation des techniciens, tout technicien qui aura extrait des acides nucléiques ne pourra plus au cours de la même journée entrer dans la pièce des mix et tout technicien qui sera rentré dans la pièce post-PCR ne pourra plus rentrer dans les pièces d'extraction et de préparation des mix.

Afin de minimiser encore plus les risques de contamination, une méthode de dégradation des amplicons obtenus lors de réactions précédentes peut être utilisée. Elle consiste à remplacer le dTTP (désoxythymidine triphosphate) par du dUTP (désoxy-uridine triphosphate) et d'apporter de l'uracyl-N-glycosylase (UNG) dans tout tube de PCR. Ainsi, toute amplification réalisée précédemment aura incorporé du dUTP à la place du dTTP dans le produit amplifié alors que l'ADN cible de la nouvelle PCR ne comportera que du dTTP. Si, dans le tube, se trouve un amplicon d'une amplification précédente, il sera reconnu par l'UNG (présence de dUTP) qui pourra le dégrader avant le début de la PCR.

Pour visualiser la non-contamination des différentes étapes, des témoins négatifs spécifiques de chacune des étapes devront être intégrés dans chaque série de réactions ; toute réaction de biologie moléculaire ne pouvant être validée si les témoins négatifs ne sont pas effectivement retrouvés négatifs.

Enfin, après toute manipulation et quelle que soit la pièce, les paillasses devront être correctement nettoyées avec un produit dégradant l'ADN.

# Principes de la biologie moléculaire

## Acides nucléiques bactériens

La cellule bactérienne héberge deux sortes d'acides nucléiques, les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN).

L'ADN est composé de deux brins antiparallèles, le brin sens (5′-3′) et le brin antisens (3′-5′). Chaque brin est constitué de quatre nucléotides dont l'agencement forme une séquence spécifique. Un nucléotide est l'association du désoxyribose 5′ phosphate avec l'une des quatre bases existantes, l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Les bases A et T sont complémentaires et se lient d'un brin à l'autre. Il en est de même pour les bases G et C. Les brins se lient à l'aide de liaisons hydrogène dont le nombre est variable selon l'appariement, A avec T par deux liaisons, et G avec C par trois liaisons. Ces deux brins sont enroulés en hélice droite formant la double hélice qui est super enroulée et compactée sur elle-même. L'ADN constitue le chromosome bactérien qui est individualisé, la plupart du temps sous forme circulaire mais pouvant parfois se retrouver sous forme linéaire comme chez les spirochètes. Les deux brins étant reliés par des liaisons faibles, les liaisons hydrogène, leur séparation peut être aisément obtenue par chauffage ou par traitement par la soude. Cette séparation ou dénaturation est réversible et la réassociation des deux brins (hybridation ou renaturation) peut alors se faire entre ADN et ADN, aboutissant à des homoduplexs, ou entre ADN et ARN, en donnant des hétéroduplexs. Le chromosome bactérien est caractérisé par sa longueur qui varie de 700 000 paires de bases (*Mycoplasma*) à environ 7 millions de paires de bases (*Streptomyces*). Certaines trousses recherchent de l'ADN plasmidique et non plus chromosomique, les plasmides pouvant être en nombre très variable par bactérie.

L'ARN est, lui, constitué d'un seul brin résultant de l'agencement de quatre nucléotides correspondant à l'association du ribose 5′ phosphate avec l'une des quatre bases suivantes : l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et l'uracile (U). L'uracile remplace la thymine dans les molécules d'ARN. Trois types d'ARN sont retrouvés dans le cytoplasme de la cellule bactérienne, l'ARN de transfert (ARNt), l'ARN ribosomal (ARNr) et l'ARN messager (ARNm). L'ARNm, qui est linéaire, est synthétisé au cours de la transcription d'un brin d'ADN et va servir de matrice lors de la traduction au sein des ribosomes pour la synthèse des protéines bactériennes. Les ARNt, qui sont constitués de 75 à 80 bases, ont une structure grossièrement identique en forme de feuille de trèfle. Ils assurent le transport des acides aminés du cytoplasme vers les ribosomes pour la traduction. Les ARNr sont au nombre de trois, ARN 23S, ARN 16S et ARN 5S, et ils entrent dans la composition des sous-unités ribosomales en association avec les protéines ribosomales. L'ARN 16S rentre dans la composition de la petite sous-unité ribosomale 30S, tandis que les ARN 23S et 5S entrent eux dans la composition de la grande sous-unité 50S.

Chez une bactérie, les gènes codant pour les ARNr sont organisés en opéron. Trois gènes séparés par un espace codent pour les ARNr 16S (gène *rrs*), 23S (gène *rrl*) et 5S (gène *rrf*). Ces opérons existent en un ou plusieurs exemplaires sur le chromosome. Globalement, le nombre de copies est corrélé à la taille du génome et à la vitesse de croissance des bactéries. Par exemple, il n'en existe qu'une copie chez les mycobactéries à croissance lente ou chez certains mycoplasmes, deux copies chez *Helicobacter pylori*, trois chez *Brucella*, sept chez *Escherichia coli*, dix ou onze copies chez *Bacillus*. Selon l'International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP), toute description d'une nouvelle espèce devrait inclure la séquence du gène codant l'ARNr 16S de la souche type. Le gène codant l'ARNr 16S comprend environ 1540 nucléotides chez *E. coli*. Le gène codant l'ARNr 16S contient des régions nucléotidiques conservées qui encadrent des zones variables renfermant des séquences spécifiques d'espèce bactérienne. Ainsi, des amorces choisies dans les régions conservées permettent d'amplifier les zones variables dont le séquençage aboutira à une identification bactérienne. L'ARNr 16S a été choisi comme index phylogénique des procaryotes. Cela a permis la construction de la plus grande banque de données actuelle. Les données concernant le séquençage des ARNr 16S s'accumulent en permanence dans les banques de séquence en ligne. Les séquences du gène codant l'ARNr 16S sont connues pour plus de 4000 souches (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi, http://www.ridom-rdna.de).

## Extraction des acides nucléiques

Quel que soit l'échantillon, prélèvement ou culture bactérienne pure, l'ADN doit dans un premier temps en être extrait avant de procéder aux tests moléculaires. Suivant la nature du prélèvement ou du micro-organisme, la méthode d'extraction pourra varier.

L'extraction de l'ADN à partir d'un produit pathologique ou d'une souche en culture constitue une étape critique avant la recherche spécifique ou non d'un pathogène par amplification génique (PCR ou PCR temps réel).

C'est une étape capitale dont la qualité va conditionner les performances des techniques mises en œuvre ultérieurement. Il faut que le rendement d'extraction soit le meilleur possible puisque le but de la détection moléculaire

va être de détecter la plus petite quantité possible d'ADN bactérien dans le prélèvement. Ce rendement d'extraction est le reflet d'une purification optimale de l'ADN bactérien en évitant une destruction de cet ADN. L'extraction repose donc sur un compromis entre des moyens agressifs d'extraction de l'ADN à partir d'un mélange complexe comprenant les constituants biologiques des tissus et des bactéries et une préservation de l'intégrité de cet ADN ciblé. Il faut également éliminer les inhibiteurs de PCR qui peuvent perturber l'amplification ultérieure et éviter à tout prix la contamination du produit d'extraction par de l'ADN extérieur au prélèvement.

Il n'y a donc pas de recette universelle ni de kit ou d'automate idéal qui permette une extraction optimale quels que soient le prélèvement et la bactérie recherchée. De très nombreux produits pathologiques d'origine variée sont susceptibles de contenir une grande diversité d'espèces bactériennes. Le rendement d'extraction va être aussi bien lié au type de tissu prélevé qu'aux types de bactéries présentes. Il est difficile de comparer les performances d'extraction d'un liquide céphalorachidien contenant des pneumocoques en partie lysés à un fragment osseux infecté par des mycobactéries à la paroi épaisse et résistante.

L'extraction se déroule en deux phases :

- la lyse du tissu collecté qu'il faut adapter à la consistance du tissu et aux bactéries recherchées ;
- la purification de l'ADN à partir du mélange de lyse

Plusieurs types de **lyse** peuvent être utilisés seuls ou combinés :

- lyse mécanique par broyage à l'aide de billes, de Potter, d'ultrasons ;
- lyse thermique au bain-marie en eau bouillante ou au micro-ondes ;
- lyse chimique à l'aide de sodium-dodécyl-sulfate (SDS) ou de Chelex® (agents chélateurs) ;
- lyse enzymatique à l'aide de protéinase K, de lysozyme.

La lyse mécanique par broyage et la lyse enzymatique par protéinase K sont les plus utilisées.

La diversité d'agents pathogènes et de matériels biologiques explique le fait que la lyse reste manuelle, non automatisable, sauf dans certains kits spécifiques de prélèvements et de bactéries (aspiration nasotrachéale/*Bordetella*, tubage gastrique/mycobactéries, sécrétions génitales/*Chlamydia*, etc.).

La **purification** est bien standardisée. Elle peut être :

- manuelle, utilisant le phénol/chloroforme dont la toxicité limite de plus en plus l'utilisation, suivie d'une précipitation à l'éthanol qui reste délicate ;
- semi-manuelle, utilisant des colonnes de silice prêtes à l'emploi vendues par plusieurs fournisseurs ;
- automatisée à l'aide d'automates ; une dizaine d'automates sont disponibles sur le marché européen

Le choix entre purification semi-manuelle ou entièrement automatisée est seulement dicté par les moyens financiers que l'on veut ou peut y consacrer. Le choix entre les différents automates est délicat. Prix (de l'équipement et des consommables), capacité (nombre d'échantillons purifiés ensemble), robustesse (fréquence des pannes) sont faciles à appréhender, mais les performances d'extraction elles-mêmes peuvent être différentes d'un appareil à l'autre suivant les prélèvements et les bactéries concernés. Des essais au laboratoire sont nécessaires. Il faut signaler que certains kits sont fréquemment contaminés par de l'ADN bactérien lors de la production, ce qui peut entraîner des faux positifs en cas d'amplification « universelle » à l'aide d'amorces ciblant l'ADNr bactérien de façon non spécifique.

## Amplification de l'ADN bactérien

L'amplification est une technique de biologie moléculaire très utilisée en microbiologie. Elle permet, à partir d'une simple molécule d'acide nucléique (non visible donc non étudiable), d'obtenir des quantités suffisamment importantes de matériel cible afin de pouvoir l'analyser par différentes techniques. Actuellement, la technique de PCR est la plus utilisée pour amplifier de l'ADN bactérien.

### *Principes de la PCR* (fig. 4.1)

La PCR repose principalement sur trois éléments :

- le chauffage d'un ADN double brin jusqu'à au moins 90 °C permettant de le séparer en deux simples brins (étape de dénaturation) ;
- après le chauffage et une séparation de l'ADN double brin en simples brins, un refroidissement progressif permettant une hybridation entre des séquences complémentaires (étape d'hybridation des amorces) ;
- la propriété de recopiage d'un brin cible à partir d'une amorce complémentaire hybridée sur le brin grâce à des ADN polymérases, enzymes thermostables (étape d'élongation).

Le facteur essentiel de la réaction de PCR est la connaissance d'une séquence d'au moins 25 bases située à l'extrémité 5′ de chacun des brins d'ADN que l'on veut amplifier. Ainsi, ces amorces complémentaires des deux brins, encadrant le fragment d'ADN que l'on veut amplifier, pourront être utilisées comme point de départ pour la synthèse du brin complémentaire (élongation) par polymérisation grâce à la polymérase. Dans un même tube, on mettra en contact l'ADN cible, les deux amorces en quantité suffisante, des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) ainsi que de l'ADN polymérase, le tout dans un tampon assurant un pH stable (Tris HCl à pH basique 8,5 à 9) contenant des cations bivalents $Mg^{2+}$, cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température répétés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur. Cet appareil permet de faire varier la température de manière rapide et précise par effet Peltier. Les trois étapes constituant un cycle de PCR sont les suivantes :

- la **dénaturation** à 95 °C, qui permet une dissociation complète des deux brins d'ADN ;
- l'**hybridation** à une température qui sera définie selon la nature des amorces. Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces/matrice est réalisé ;

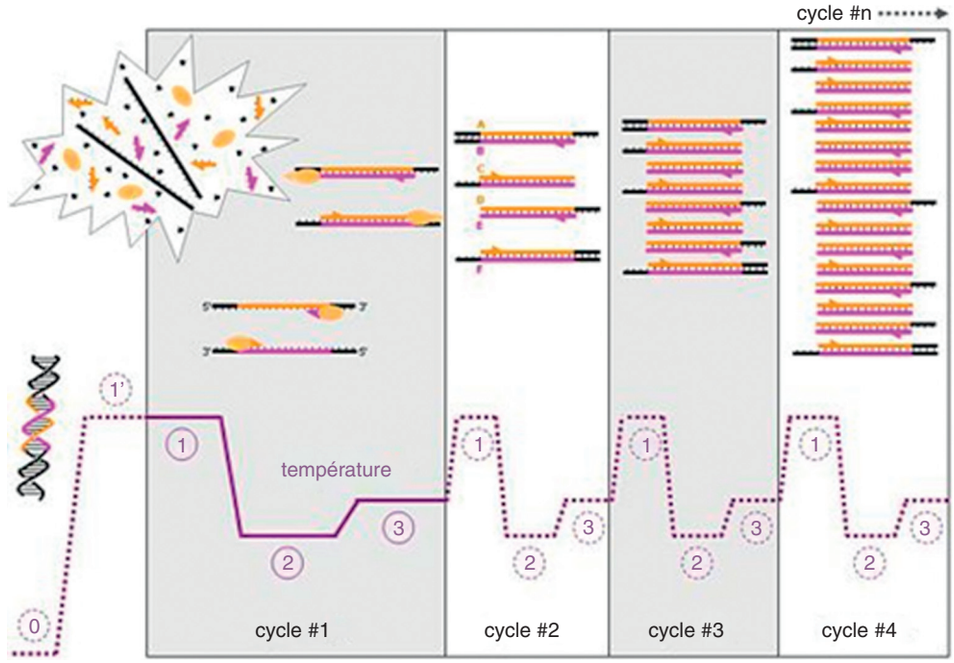



**Fig. 4.1.** – *Principe de la PCR.*
Chaque cycle se décompose en trois temps auxquels correspondent trois températures, 1 : phase de dénaturation à 95 °C; 2 : phase d'hybridation ou d'appariement des amorces par exemple ici à 60 °C; 3 : phase d'élongation 72 °C permettant l'action de l'ADN polymérase.

- l'**élongation** à 72 °C, qui correspond à la température de « travail » de l'ADN polymérase qui va synthétiser les brins complémentaires d'ADN à partir des extrémités 3′OH libres des amorces hybridées.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes ; seule la température d'hybridation (Tm) pourra être modifiée pour chaque nouvelle PCR en fonction de la composition en nucléotides des amorces. Pour calculer le Tm d'une amorce inférieure à 30 nucléotides, on peut utiliser la formule suivante :

$$Tm = 2(A + T) + 4(G + C)$$

où A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide. À chaque cycle, les fragments synthétisés au cycle précédent servent à leur tour de matrice. Au bout de quelques cycles, l'amplicon prédominant correspond à la séquence d'ADN comprise entre les régions où les amorces s'hybrident. Il faut compter 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN (environ 0,1 µg). En théorie, chaque cycle voit doubler la quantité d'ADN présente au cycle précédent. Le facteur d'amplification devrait donc être $2^n$, où n représente le nombre de cycles. En pratique, le rendement de la réaction est plutôt de l'ordre de 85 %. Parmi les raisons pour lesquelles la réaction atteint un plateau, on peut citer notamment : la dimérisation des amorces, l'apparition de sous-produits de réaction ayant un pouvoir inhibiteur (pyrophosphates), l'épuisement et la dénaturation des composants de la réaction, la compétition entre les amorces, et enfin les fragments d'ADN amplifié qui peuvent s'hybrider entre eux ou avec la cible plutôt qu'avec les amorces, et ce d'autant plus que leurs concentrations varient en sens inverse au cours de la réaction.

## *Les différents types de PCR*

### PCR en point final

En PCR conventionnelle, la technique est dite en « point final » car ce n'est qu'une fois la réaction de PCR terminée que la détection du produit amplifié est effectuée.

### PCR en temps réel

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus usitée. Historiquement, Russel Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse de cinétiques de PCR en élaborant un système qui détectait le produit amplifié au fur et à mesure de son accumulation. Cette méthode consiste en la détection et la quantification d'un *reporter* fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction. Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chaque échantillon doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction. La PCR en temps réel permet donc le suivi, cycle par cycle, de la production des amplicons (fig. 4.2), à l'opposé de la PCR conventionnelle

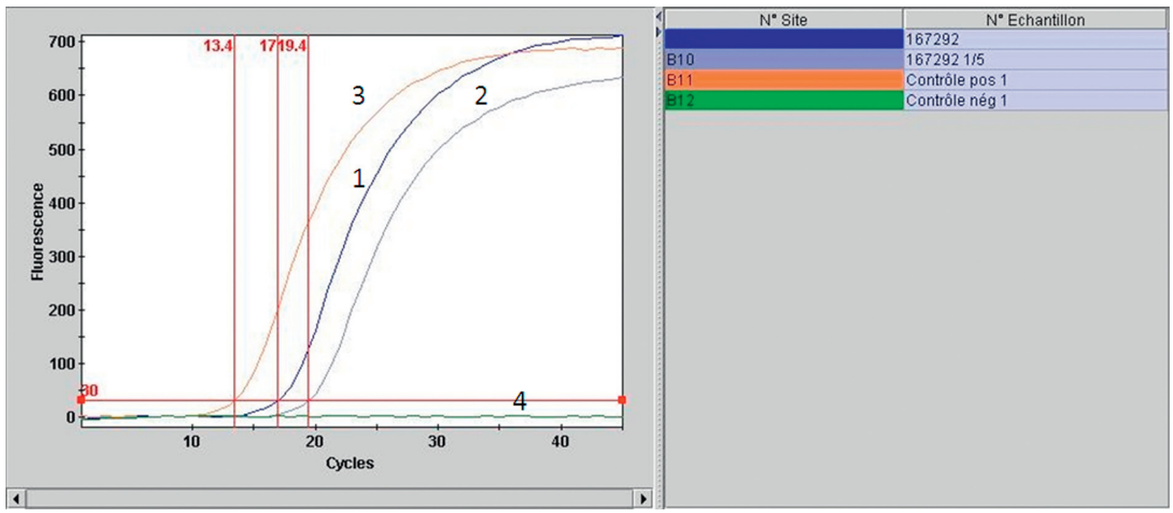



**Fig. 4.2.** – *Exemple de courbe obtenu par PCR en temps réel, recherche de* Bordetella pertussis.
1 : ADN d'un patient positif ; 2 : ADN d'un patient positif dilué au 1/5e ; 3 : témoin positif ; 4 : témoin négatif.

où les amplicons ne sont détectés que dans la phase finale du processus d'amplification.

Une instrumentation sophistiquée a été développée pour capitaliser ces nouvelles approches de PCR (Mocellin et al., 2003). Tous les systèmes proposés combinent un thermocycleur et un module de détection fluorimétrique pilotés par une station de travail permettant l'acquisition et le traitement des données obtenues. La PCR en temps réel nécessite donc l'utilisation de molécules fluorescentes venant interagir avec l'ADN amplifié. Pour cela, il existe deux types de chimie : les agents se liant à l'ADN double brin et les sondes fluorescentes.

### *Agents se liant à l'ADN double brin* (fig. 4.3)

L'émission fluorescente apparaît lorsque l'agent est lié à l'ADN double brin. Au cours de la réaction de PCR en temps réel, on observera une augmentation de la fluorescence pendant l'étape de polymérisation, puis une chute lors de la dénaturation. L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation de chacun des cycles. L'agent le plus utilisé est le SYBR Green® I dont le mécanisme de liaison est mal défini. Le colorant libre en solution relargue peu de fluorescence. En revanche, lié à l'ADN double brin et soumis à une excitation en ultraviolet, ce dernier émet un signal de fluorescence, dont la mesure quantifie l'ADN double brin, qu'il soit d'intérêt ou non. C'est là la principale limitation de cette technique : sa spécificité repose uniquement sur ses amorces. Cependant, cette méthode reste très sensible et reproductible.

### *Sondes d'hydrolyse ou sondes TaqMan®* (fig. 4.4)

Il s'agit d'une sonde fluorogénique spécifique de la séquence que l'on souhaite amplifier. Elle présente à son extrémité 5′ un *reporter* (fluorochrome émetteur) et à son extrémité 3′ un *quencher* (fluorochrome suppresseur). Tant que ces fluorochromes sont à proximité sur la sonde, il ne peut y avoir émission de fluorescence. En effet, lorsqu'il est stimulé, le *reporter* transfère son énergie au *quencher* par phénomène de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) et le *quencher* dissipe cette énergie sous forme de chaleur. Lors de la phase d'hybridation/extension, la sonde vient s'accrocher à sa séquence complémentaire mais ne génère aucune fluorescence du fait du phénomène de *quenching*. Au cours de la phase d'élongation, l'activité 5' exonucléasique de la *Taq* polymérase vient cliver *reporter* et *quencher*, générant un signal détectable dans la longueur d'onde d'émission du *reporter*. À chaque cycle, l'émission de fluorescence augmente proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde. Comme l'activité de la polymérase est spécifique de l'ADN double brin, les sondes libres demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Par rapport aux agents liant l'ADN, les sondes fluorescentes possèdent l'avantage d'une spécificité accrue, ce qui réduit les émissions de fluorescence par mauvais appariements ou dimères d'amorces.

### *Hybridation de deux sondes* (fig. 4.5)

Appelée aussi HybProbes, sondes FRET en tandem ou sondes LightCycler®, cette technologie utilise deux sondes dont les séquences cibles sont espacées de moins de 10 nucléotides. La première sonde est bloquée à son extrémité 3′ pour empêcher toute élongation et porte en 3′ un fluorochrome donneur (isothiocyanate de fluorescéine) émettant une fluorescence verte sous excitation par la lumière. Son spectre d'émission est plus large que celui du fluorochrome accepteur placé à l'extrémité 5′ de la deuxième sonde. Le FRET nécessite une certaine distance entre les deux fluorochromes. Aussi, en solution, il n'existe qu'un bruit de fond de fluorescence verte émis par le donneur. Lors de l'hybridation, les

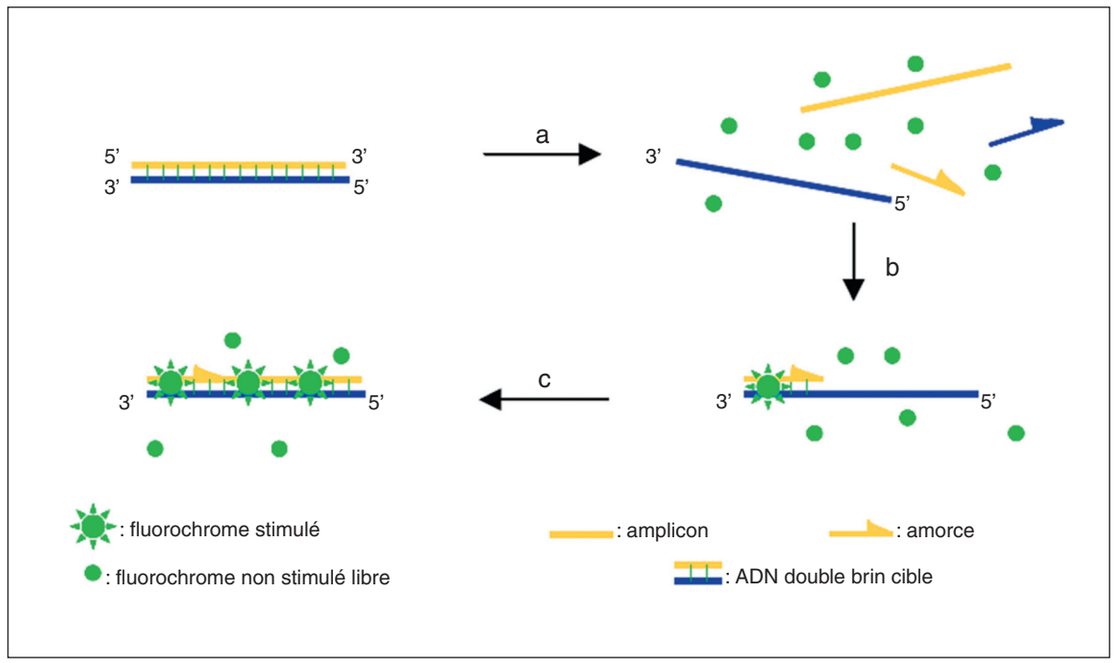



**Fig. 4.3.** – *Agents se liant à l'ADN double brin (d'après Poitras et al.).*
a) Durant la dénaturation, le SYBR Green® I libre exhibe peu de fluorescence. b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant ; il en résulte une émission de fluorescence lors de l'excitation. c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel.

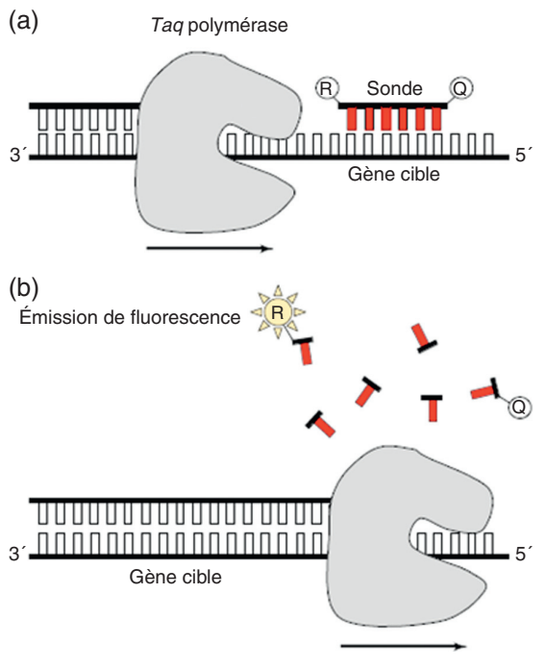



**Fig. 4.4.** – *Principe d'une sonde d'hydrolyse (d'après Mocellin et al.).*
a) Phase d'hybridation : la sonde se fixe sur le gène d'intérêt mais n'émet pas de fluorescence. b) La *Taq* polymérase libère *reporter* et *quencher* de la sonde, le *reporter* peut alors émettre en fluorescence.

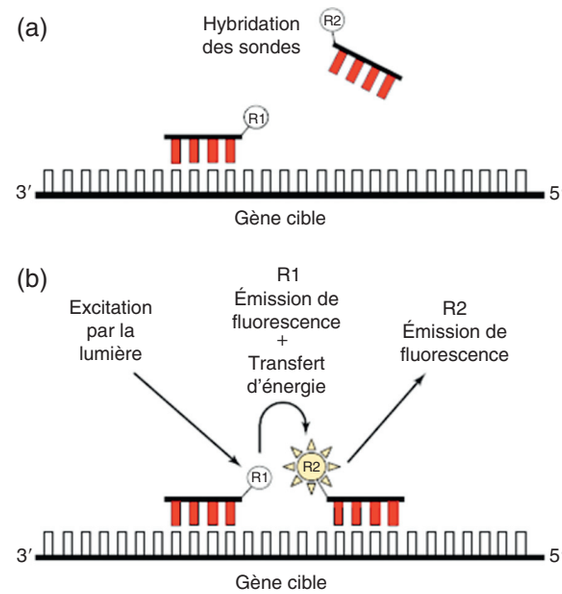



**Fig. 4.5.** – *Hybridation de deux sondes (d'après Mocellin et al.).*
a) Fixation des deux sondes fluorogéniques sur leurs séquences spécifiques proches. b) Excitation du premier *reporter*, émission d'une fluorescence, excitation du deuxième *reporter* par FRET et émission d'une fluorescence différente.

amorces se fixent et permettent, par phénomène de FRET, le transfert d'énergie fluorescente verte au fluorochrome rouge, lequel émet alors dans le rouge. Ensuite, lors de l'étape de polymérisation, les sondes retournent libres en solution et il n'y a alors plus de fluorescence rouge émise. À chaque cycle, on note une augmentation de fluorescence rouge proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé durant la réaction de PCR. La fluorescence diminue ensuite lorsque la quantité d'amplicons produits est assez importante pour entrer en compétition avec l'hybridation simultanée des deux sondes sur l'ADN cible. L'HybProbes possède une grande spécificité ; de plus, les sondes n'étant pas hydrolysées, elles sont réutilisées à chacun des cycles.

### *Balises moléculaires* (fig. 4.6)

Ce sont des sondes d'hybridation en épingle à cheveux (sondes d'hybridation phare ou *molecular beacons*). Il s'agit d'une sonde fluorogénique spécifique d'une séquence, et dont la conformation tridimensionnelle à l'état non lié fait qu'un *reporter* fluorescent et un *quencher* non fluorescent dissipant l'énergie sous forme de chaleur se trouvent très près l'un de l'autre, n'émettant ainsi aucun signal. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde se lie à sa séquence complémentaire ; le changement de conformation spatiale induit une séparation des deux fluorophores et ainsi le *reporter* peut générer un signal mesurable dans sa longueur d'onde d'émission. La spécificité de cette technique est de pouvoir détecter des différences de séquence au nucléotide près ; elle est donc utilisable pour la détection et le criblage à grande échelle des SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Comme pour l'HybProbes, les sondes n'étant pas hydrolysées, elles sont réutilisées à chacun des cycles. La principale difficulté de ces sondes réside dans le design crucial de la boucle.

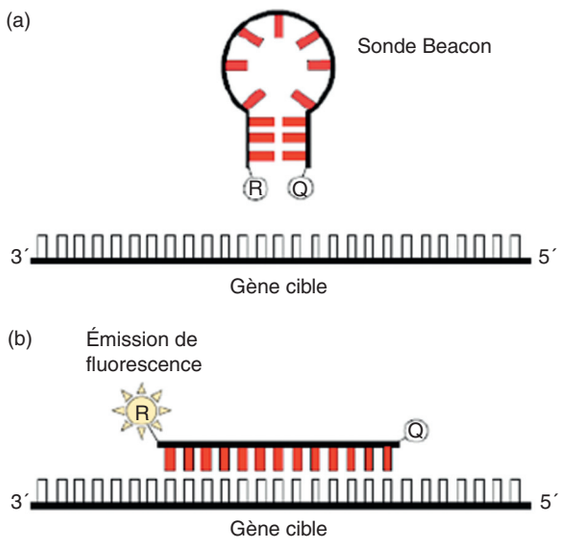



**Fig. 4.6.** – *Principe d'une sonde d'hybridation phare (d'après Mocellin et al.).*
a) En solution, la sonde n'émet pas de fluorescence.
b) Après hybridation spécifique, le *reporter* est assez éloigné du *quencher* pour émettre une fluorescence.

### *Amorces scorpion* (fig. 4.7)

C'est une variante des *molecular beacons*, avec une structure en épingle à cheveux complétée de la sonde et de ses fluorochromes (partie « balise moléculaire »). À la suite du *quencher* est ajoutée une molécule d'hexéthylène glycol (HEG) suivie d'une région amorce. L'HEG empêche la réplication de la balise moléculaire par l'ADN polymérase et l'amorce permet d'intégrer la balise moléculaire dans le nouvel amplicon lors de la réaction de PCR. La balise moléculaire est donc liée de façon irréversible à l'amplicon durant l'amplification. La boucle change de conformation (retournement rappelant la queue d'un scorpion). Lors de la dénaturation, la sonde change de conformation et vient s'hybrider à sa séquence complémentaire sur l'amplicon, permettant l'éloignement du *quencher* et l'émission du *reporter*. Ces sondes présentent une grande sensibilité et une grande spécificité. Ce système est préféré lors de PCR comportant des cycles courts. Leur conception est délicate et leur prix élevé.

## *Détection et analyse des produits de PCR*

### PCR en point final

Plusieurs méthodes sont disponibles pour détecter le(s) produits(s) amplifié(s). L'électrophorèse en gel (agarose ou acrylamide) est la plus courante. Son principe repose sur le fait que les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées, que l'on peut donc faire migrer dans un champ électrique. La charge relative étant constante, le système de discrimination utilisé est l'effet de filtration sur gel. La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique sera fonction de deux paramètres : sa masse moléculaire (nombre de bases ou de paires de bases) et la concentration du gel. L'ADN migre vers l'électrode chargée positivement dans la cuve d'électrophorèse. La révélation est possible grâce au bromure d'éthidium (BET), agent intercalant de l'ADN présentant un risque cancérigène. Lorsqu'on excite le BET par des ultraviolets (UV), celui-ci présente une fluorescence orange uniquement si il est intercalé entre les bases du double brin d'ADN. En pratique, le BET est introduit dans le gel avant qu'il ne soit coulé et il s'intègre aux acides nucléiques pendant la migration. À la fin de l'électrophorèse, sous illumination par des UV courts (~300 nm), l'ADN est visualisé sous forme de bandes. La taille en paires de bases des produits d'amplification est appréciée comparativement à un marqueur de poids moléculaire de taille connue, placé à chaque extrémité des puits du gel (fig. 4.8).

Le produit d'amplification peut aussi être analysé par hybridation sur une bandelette de nitrocellulose sur laquelle sont disposées une ou plusieurs sondes spécifiques du produit amplifié que l'on recherche. Dans ce cas, les amorces sont marquées afin de pouvoir visualiser les fragments hybridés. Le marqueur utilisé est souvent la biotine. La révélation est alors fondée sur l'addition du couple streptavidine–peroxydase suivie de la mise en évidence de l'activité enzymatique. Sur cette bandelette sont aussi disposés des contrôles, contrôle positif et contrôle de révélation notamment (fig. 4.9).

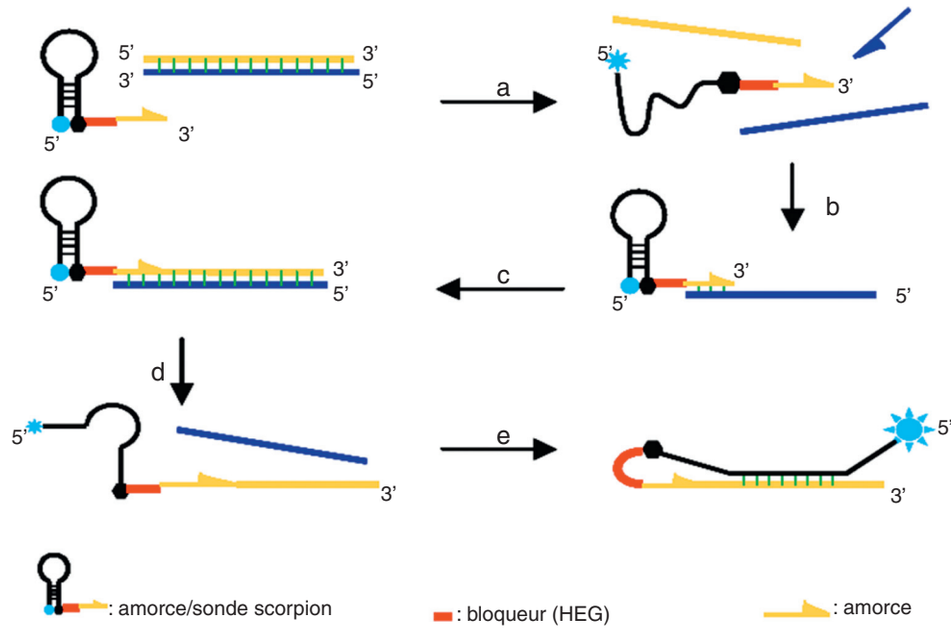



**Fig. 4.7.** – *Amorces scorpion (d'après Mocellin et al.).*
a) Étape de dénaturation : balise moléculaire sous forme relaxée, libre en solution. La proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. b) Étape d'hybridation : l'amorce scorpion se fixe à sa séquence complémentaire cible. c) Polymérisation du brin complémentaire. d) Dénaturation des brins d'ADN. e) Hybridation de la séquence complémentaire de la partie balise moléculaire à sa séquence cible permettant l'émission de fluorescence.

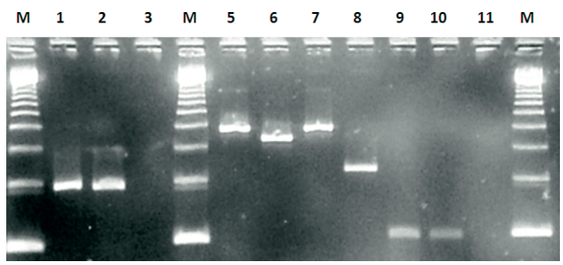



**Fig. 4.8.** – *Migration électrophorétique d'une PCR en point final pour la recherche de génome de* Neisseria meningitidis *et la détermination du sérogroupe.*
M : marqueurs de taille ; puits 1 à 3, identification du méningocoque, 1 : patient, 2 : témoin positif, 3 : témoin négatif ; puits 5 à 11, détermination du sérogroupe, 5 : patient, 6 à 10 : témoin positif de sérogroupes A, B, C, W135 et Y respectivement, 11 : témoin négatif.

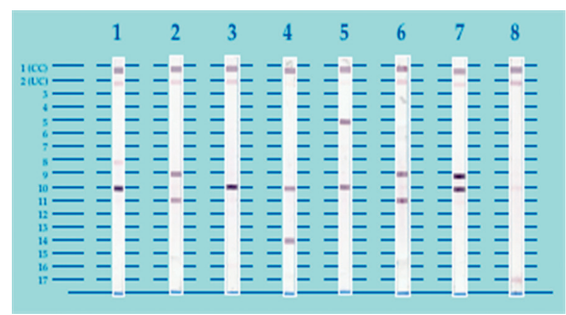



**Fig. 4.9.** – *Exemple de génotypage de mycobactéries après hybridation sur bandelettes de nitrocellulose et révélation.*

## PCR en temps réel

Les étapes de PCR en temps réel consistent tout d'abord en une étape de pré-incubation pour activer l'enzyme. Puis, intervient l'étape de PCR proprement dite (dénaturation, hybridation, élongation), répétée pendant un nombre n de cycles. Enfin, lorsqu'un agent intercalant est utilisé, une étape de fusion pour caractériser les amplicons peut être ajoutée. Dans ce cas, il est programmé une élévation de température de 0,2 à 0,5 °C par seconde avec une acquisition en continu de la fluorescence. Par ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe fusion, de caractériser les différentes phases de la cinétique de réaction et de mesurer la quantité d'amplicon générée en un point de la phase exponentielle. C'est uniquement au cours de cette phase qu'il sera possible d'extrapoler la quantité de matrice cible initialement présente avant amplification. Le résultat d'une PCR en temps réel est représenté graphiquement sous forme de courbes sigmoïdes. Au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est très faible. Elle permet de définir la ligne de base de la courbe. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de PCR entraîne une variation de l'intensité de fluorescence émise mesurable.

### *Cycle seuil* (fig. 4.10)

Le point de départ de la phase exponentielle, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante, est appelé cycle seuil optique. C'est le nombre fractionnaire de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise dépasse une valeur seuil (ou seuil de détection optique), significativement différente du bruit de fond. Selon l'algorithme utilisé pour son calcul, il est symbolisé par les lettres Ct (*threshold cycle*) ou Cp (*crossing point*). Il sert de base à une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. En effet, de la valeur du Ct peut être déduit un résultat quantitatif en la comparant aux valeurs de Ct générées à partir d'une gamme d'étalonnage. Plus il y a de matrice à amplifier au départ, moins le nombre de cycles requis pour atteindre le Ct sera élevé.

### *Courbes d'intérêt*

À la fin du programme de PCR, l'interprétation prend en compte trois courbes d'intérêt :

- la **courbe de température** (température en fonction du temps) permet de s'assurer que les cycles de température ont bien été réalisés ;
- la **courbe de l'agent intercalant** (fluorescence en fonction du nombre de cycles, fig. 4.2 et 4.10) permet de déterminer le Ct de chaque échantillon. Le Ct est inexistant pour les échantillons où il ne se produit aucune amplification ; on observe alors une droite horizontale sur l'écran. Ce doit être le cas du témoin négatif (T–). Les échantillons pour lesquels on observe une amplification (allure de sigmoïde) ont un Ct calculé. Le témoin positif (T+) doit montrer une amplification. Au-delà d'un certain nombre déterminé de cycles d'amplification, la réaction est considérée comme négative car aspécifique ;
- la **courbe de fusion dérivée** (dérivée primaire de la fluorescence en fonction de la température, fig. 4.11) n'est utilisable que pour les technologies de détection avec SYBR Green®. Elle complète l'interprétation en vérifiant qu'il n'y a qu'un seul type de produit de PCR amplifié. Pour cela, on détermine sur les courbes de fusion dérivées le Tm (*melting temperature*) des échantillons pour lesquels il y a eu amplification. Le Tm correspond à la température de fusion des amplicons. Ces Tm sont comparés à celui du T+. Pour être considérés comme positifs, les échantillons patients doivent avoir des températures de fusion proches de celle du T+. Si l'on obtient plusieurs pics à des températures différentes ou des pics décalés par rapport au Tm attendu (Tm du T+), c'est que l'on est en présence d'un mélange d'amplicons. Il est recommandé en cas de doute de procéder à une électrophorèse du produit PCR pour vérifier la présence et la taille des amplicons. Si plusieurs fragments sont observés, on peut les purifier sur gel puis les séquencer. Pour valider ces résultats, aucune amplification ne doit être observée pour le T–. Par ailleurs, en présence de dimères d'amorces, une émission de fluorescence peut être détectée par l'automate pour certains échantillons. Si on ne peut pas réduire ce phénomène lors de la mise au point de la méthode (par exemple diminution des concentrations d'amorces), il est alors nécessaire que la température de fusion des dimères d'amorces soit suffisamment différente de celles des amplicons.

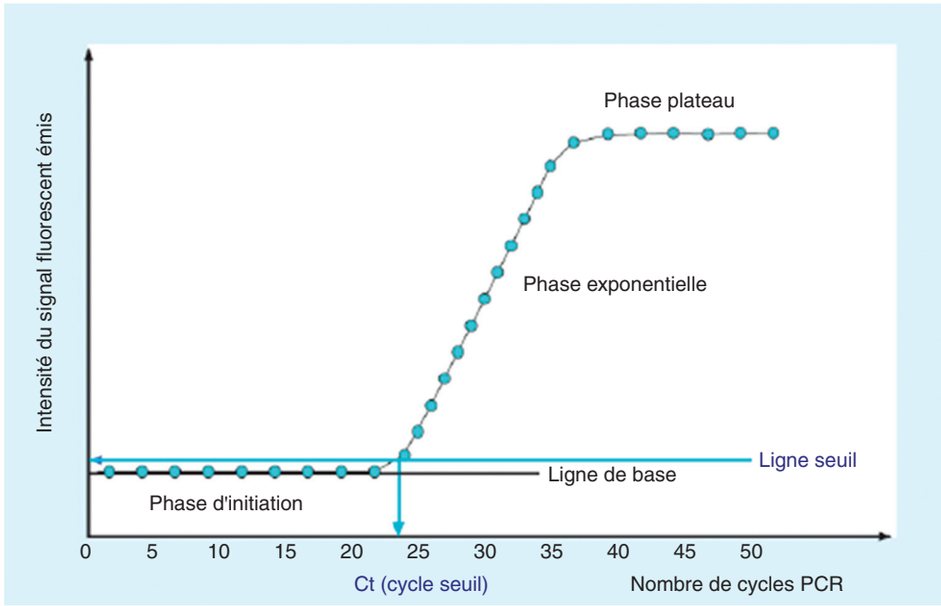



**Fig. 4.10.** – *Profil d'une courbe de PCR en temps réel.*

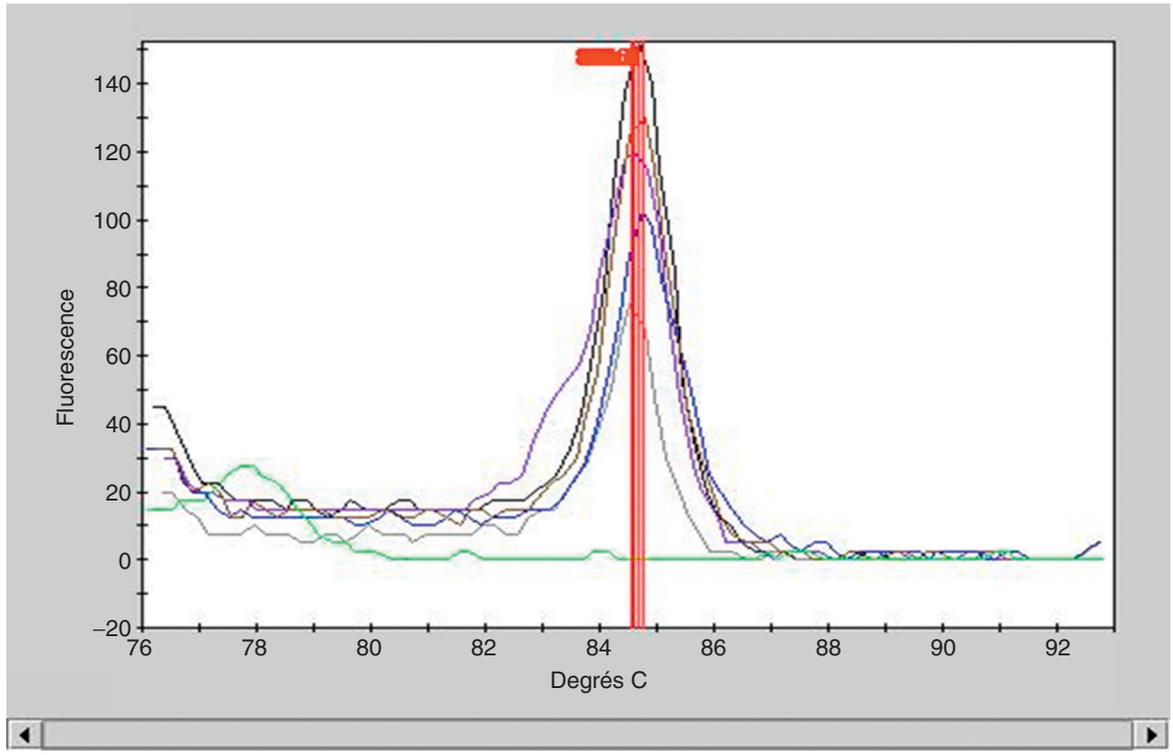



**Fig. 4.11.** – *Courbe de fusion dérivée.*
Toutes les courbes sont superposables, confirmant l'amplification d'un seul et même produit dans chacune des réactions.

## Séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste en la détermination de la succession des nucléotides le composant. C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie spécialisés. Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN. Plusieurs techniques peuvent être utilisées en routine.

### *Méthode de Sanger*

Le séquençage selon la technique de Sanger utilise l'ADN polymérase capable de synthétiser un brin complémentaire à partir d'un brin matrice. Pour le séquençage, des nucléotides légèrement différents sont utilisés : les didésoxyribonucléotides (ddNTP) au lieu des désoxyribonucléotides. Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3′. Ainsi, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

### *Mélange réactionnel*

La réaction de séquençage nécessite la préparation d'un mix réactionnel contenant : le fragment d'ADN à séquencer, une amorce complémentaire à l'extrémité 3′ du fragment à séquencer, les quatre dNTP (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), l'ADN polymérase et un tampon contenant du MgCl2. Dans les réactions non automatisées, on prépare quatre mix réactionnels et on ajoute dans chaque tube de faibles quantités d'un ddNTP fluorescent ou radioactif. La PCR de séquençage est ensuite réalisée à l'aide d'un thermocycleur selon un programme approprié. À la phase d'élongation, l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN à séquencer. Dans le milieu de réaction se trouve un déséquilibre entre des dNTP en grand nombre et une faible proportion d'un ddNTP. À un moment totalement aléatoire, un ddNTP sera ajouté à la chaîne en cours de synthèse par l'ADN polymérase. Cette élongation s'arrêtera donc à cet endroit. Par exemple, si le milieu réactionnel contient une faible proportion de didésoxyribonucléotide à guanine (ddGTP), on obtiendra à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddGTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été stoppée (ce qui correspond, du fait de la complémentarité des bases, à la présence d'une cytosine dans le brin d'ADN séquencé). Ainsi, on obtient à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné. On sépare alors les copies selon leur taille par une migration électrophorétique de 2 à 4 heures sur gel d'acrylamide ; le contenu de chaque tube étant déposé dans un puits distinct. Ces gels permettent de séparer deux fragments différents d'un seul nucléotide.

Les fragments sont ensuite visualisés soit en observant la fluorescence (sur l'amorce utilisée), soit par utilisation de nucléotides marqués radioactivement en exposant un film photographique au gel (après révélation, des bandes sombres apparaissent là où se trouvait de l'ADN). Suivant la taille des gels, la séquence lue est limitée de 200 à 750 nucléotides environ ; au-delà, les bandes ne sont plus assez espacées et leur ordre n'est plus déterminable.

### *Technique de séquençage* dye terminator sequencing

Décrite en 1986, c'est la technique la plus utilisée actuellement. Elle nécessite des ddNTP, chacun marqué par un fluorophore spécifique. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou *BigDye terminators* ou *dye-labeled terminator*. Lorsque le séquençage est automatisé, on utilise dans un même mélange réactionnel les quatre ddNTP marqués. Il n'y a donc qu'une seule réaction de séquençage. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. L'excitation se fait à deux longueurs d'onde différentes à l'aide d'un laser à l'argon. L'émission de fluorescence est mesurée à quatre longueurs d'onde correspondant aux quatre fluorophores. Chaque base a donc un signal spécifique qui permet de l'identifier lors de son passage dans le faisceau d'un photomètre situé à la sortie du capillaire. L'analyse des signaux reçus est réalisée par un ordinateur et permet de reconstituer la séquence avec une grande précision. Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité, jusqu'à mille pour les appareils les plus performants.

### *Pyroséquençage*

Il s'agit d'une méthode permettant d'analyser la synthèse d'ADN cible en temps réel. Le principe de base de la méthode consiste à hybrider une amorce à l'ADN cible (amplifié par PCR), puis à ajouter séquentiellement et dans l'ordre une base à partir de l'extrémité 3′ de l'amorce. Chaque base est marquée par un fluorophore différent dont le signal est mesuré par bioluminescence, à condition que la base complémentaire de la cible soit incorporée.

La séquence est déduite en fonction de l'ordre d'incorporation des nucléotides sur l'ADN complémentaire de la cible néosynthétisée. Quatre enzymes sont nécessaires pour la réaction : une ADN polymérase, une ATP sulfurylase, une luciférase et une apyrase. Le mélange réactionnel contient, par ailleurs, les substrats de ces différentes enzymes : adénosine phosphosulfate (APS), D-luciférine, l'amorce de séquence (complémentaire de l'ADN cible). Les nucléotides alpha-thio-dATP (dATP-αS), dCTP, dGTP, dTTP sont ajoutés de manière cyclique un par un, toujours dans le même ordre et successivement.

Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse en libérant un pyrophosphate. Grâce à une ATP sulfurylase, ce pyrophosphate est transformé en ATP qui est utilisé par une luciférase pour émettre un signal lumineux. C'est ce signal qui est capté par le séquenceur qui le reproduit sous la forme d'un pic sur le pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. On peut donc déduire la séquence de la taille des pics obtenus. L'apyrase dégrade les nucléotides non incorporés et l'excès d'ATP. Une caméra CCD mesure le signal de bioluminescence produit. Cette méthode performante totalement automatisée permet de séquencer de courts fragments d'ADN, en moyenne 60 pb pour l'automate commercialisé par Biotage, et 106 pb sur l'automate 454 commercialisé par Roche, voire, dans certains cas, jusqu'à 200 pb. La limitation du nombre de bases séquencées est liée à l'inhibition progressive de l'apyrase par l'accumulation de désoxymononucléotide phosphate (dNMP) et de son produit intermédiaire, le désoxydinucléotide phosphate (dNDP), ou l'élimination incomplète des nucléotides résiduels après lavage.

### *Exploitation de la séquence*

L'électrophorégramme est exploité par l'utilisateur à l'aide de logiciels tels que FinchTV® ou Chromas®. Ils permettent de vérifier les fichiers des séquenceurs d'ADN afin de réaliser un « alignement » des séquences d'intérêt, c'est-à-dire situées entre les amorces utilisées. En effet, les réactions de séquences sont réalisées soit avec l'amorce sens, soit avec l'amorce antisens. Le logiciel permet de reverser et compléter une de ces séquences afin de comparer base par base les deux séquences orientées dans le même sens. La séquence obtenue après correction des erreurs peut être exportée par le logiciel dans des banques de données en ligne contenant des moteurs de comparaison avec des séquences de référence et celles déposées par de multiples équipes de recherche à travers le monde. Genbank BLAST (*basic local alignement search tool*) par exemple, banque publique libre, réalise l'alignement de la séquence avec les séquences existantes et les arbres phylogénétiques proposant l'identification la plus probable (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cette identification est rendue avec un pourcentage de similitudes entre la séquence présentée et la séquence prototype de la souche. D'autres banques libres existent telle que BiBi. Il existe également des banques commerciales spécialisées dans la microbiologie médicale telles que MIDI ou RIDOM (http://www.ridom-rdna.de). En fait, ces différentes banques nous donnent un pourcentage de similarité entre notre séquence et les leurs. Lorsque l'on travaille avec le gène de l'ARN 16S, il est admis qu'un pourcentage entre 99 et 100 % nous permet d'avoir une identification précise quant à l'espèce, alors qu'entre 97 et 99 %, nous ne serons qu'au niveau du genre.

## Applications de la biologie moléculaire en bactériologie médicale (tableau 4.1)

Les méthodes de bactériologie «classiques» présentent un certain nombre de limites que cherchent à contourner les méthodes moléculaires. En effet, certaines bactéries ne cultivent pas sur milieu artificiel ou bien se développent lentement ou difficilement, ou bien encore ont été tuées lors d'un traitement antibiotique sans que le germe ait été identifié (infections «décapitées»). Les techniques le plus souvent employées reposent sur l'amplification génique et notamment la PCR. Elles ciblent soit des gènes spécifiques d'une espèce bactérienne ou d'un genre bactérien, soit des gènes conservés chez l'ensemble des bactéries ; dans ce cas, on parle plus couramment de PCR «universelle» et l'amplification est suivie d'un séquençage et d'une comparaison de la séquence obtenue avec les bases de données. La PCR spécifique permet de détecter une bactérie directement dans un prélèvement, qu'il

**TABLEAU 4-1**

**Tableau récapitulatif des principales applications de la biologie moléculaire en bactériologie médicale.**

| *Contexte* | *Pathogène recherché* | *Prélèvement* | *Gène cible* |
|---|---|---|---|
| Infections respiratoires | Mycobactéries tuberculeuses | Aspiration bronchique, expectoration, tubage gastrique | *IS6110, ADNr 16S, ADNr 23S* |
| | *Bordetella pertussis/ B. holmesii* | Aspiration nasopharyngée/autres respirations | *IS481* |
| | *B. parapertussis* | Prélèvements respiratoires | *IS1001* |
| | *Legionella pneumophila* | Prélèvement respiratoire (expectoration, aspiration bronchique, LLBA), liquide pleural | *mip, ADNr 16S, ADNr 23S–5S* |
| | *Chlamydophila pneumoniae* | Prélèvement respiratoire (expectoration, aspiration bronchique, LLBA) | *ompA, pst1, ADNr 16S* |
| | *Mycoplasma pneumoniae* | Prélèvement respiratoire (expectoration, aspiration bronchique, LLBA) | *ADNr 16S, P1* |
| Infections invasives | *Streptococcus pneumoniae* | LCR, sang, liquide pleural | *ply, lytA* |
| | *Neisseria meningitidis* | LCR, sang, biopsie lésions purpuriques | *ctrA, crgA, porB* |
| | *Neisseria meningitidis* (génogroupe) | | *siaD, mynB/sacC* |
| Infections bactériennes sexuellement transmises | *Chlamydia trachomatis* | Prélèvements génitaux (urètre, vagin, endocol), brossage de trompe, liquide péritonéal, urine | Plasmide cryptique, *ompA, ADNr 16S* |
| | *Neisseria gonorrhoeae* | Prélèvements génitaux (urètre, vagin, endocol), brossage de trompe, liquide péritonéal, urine | *pgi1, opa, porA, gene, ADNr 16S* |
| | *Mycoplasma genitalium* | Prélèvements génitaux | *mgpa, ADNr 16S* |
| Autres recherches | *E. coli* entérohémorragique (EHEC) | Selles/colonies | *stx1/stx2* |
| | *Kingella kingae* | Liquide articulaire, biopsie os, valve cardiaque | *rtxA, cpn60, ADNr 16S* |
| | *Bartonella* spp., *B. henselae/ B. quintana* | Sang/valve cardiaque/ganglion | *gltA, ribC, ADNr 16S* |
| | *Tropheryma whipplei* | Ganglion, biopsie duodénale, valve cardiaque | *ADNr 16S–23S, IS* spécifique |
| | *Clostridium difficile* | Selles/colonies | *ADNr 16S, tcdC cdtA* |
| Recherche de gènes de résistance | *M. tuberculosis* | Souche bactérienne, produit pathologique | *rpoB, inhA, katG, pncA* |
| | *S. aureus* | Souche bactérienne, produit pathologique | *mecA* |
| | *Enterococcus* | Souche bactérienne, produit pathologique | *van A, van B* |

soit polymicrobien ou monomicrobien, tandis que la PCR universelle ne pourra être utilisée que pour rechercher une bactérie dans des prélèvements normalement stériles. Cette approche est également appliquée à l'identification bactérienne à partir de colonies lorsque les bactéries isolées ne sont pas identifiables aisément à l'aide de caractéristiques phénotypiques. Dans d'autres circonstances, il s'agit uniquement de rechercher des gènes de virulence chez une bactérie qui ne pose pas de problème d'identification phénotypique par ailleurs. Il s'agit dans ce cas de détecter uniquement certaines souches de cette espèce qui possèdent ces gènes de virulence. Les méthodes moléculaires permettent également de détecter la présence de gènes de résistance aux antibiotiques ou de mutations conférant une résistance aux antibiotiques.

Enfin, certaines méthodes moléculaires permettent la comparaison génotypique des bactéries lorsque les éléments comparatifs phénotypiques ne permettent pas de distinguer les isolats cliniques ; ce sont les méthodes de typage moléculaire.

Les méthodes d'amplification génique peuvent présenter néanmoins des inconvénients. Les prélèvements peuvent contenir des inhibiteurs d'amplification, ou la cible peut présenter une mutation dans la zone d'hybridation des amorces, ce qui pourra faussement négativer le résultat. Au contraire, il peut arriver que le résultat soit faussement positif en raison notamment de contaminations. La maîtrise de ces approches moléculaires est primordiale pour la qualité et la validité du résultat. En bactériologie, à la différence d'autres disciplines, les prélèvements biologiques à partir desquels un pathogène sera recherché pourront présenter une très grande hétérogénéité influant sur la reproductibilité des résultats. Enfin, les techniques moléculaires ne sont pas informatives sur la viabilité des bactéries, et l'interprétation du résultat, dans certains domaines de la bactériologie, doit être prudente, la biologie moléculaire pouvant détecter des cadavres témoins d'infections plus ou moins anciennes guéries.

Dans tous les cas, ces méthodes ne doivent s'appliquer que lorsque la suspicion d'une infection bactérienne est suffisamment forte, et le choix de la meilleure approche diagnostique est discuté conjointement entre le clinicien et le bactériologiste.

Seules les techniques les plus couramment employées seront décrites ici. Les cibles le plus souvent utilisées ainsi que les applications principales seront abordées. Ces points seront davantage détaillés dans les chapitres spécifiques.

## Méthodes de biologie moléculaire utilisées dans la détection de pathogènes de l'appareil respiratoire

### *Détection des mycobactéries du groupe de la tuberculose*

Les techniques d'amplification génique, parmi lesquelles la PCR, permettent d'identifier les mycobactéries tuberculeuses soit directement à partir du prélèvement initial, soit à partir de la culture. Elles permettent également la mise en évidence d'éventuelles mutations conférant aux bactéries une résistance aux antituberculeux. Cette recherche de résistance peut être combinée avec l'identification de mycobactérie tuberculeuse. Les techniques moléculaires sont également utilisées pour identifier précisément au rang d'espèce l'ensemble des mycobactéries, tuberculeuses et non tuberculeuses, qui regroupent plus de 80 espèces. À partir des cultures positives, des techniques d'hybridation par sondes moléculaires sont également utilisables, permettant d'identifier rapidement entre autres les mycobactéries tuberculeuses.

Les techniques d'amplification génique par PCR afin de détecter *M. tuberculosis* utilisent très fréquemment comme cible la séquence d'insertion *IS*6110 qui existe en plusieurs copies chez cette espèce. L'ADNr 16S peut également être utilisé. L'ADNr 23S est utilisé dans une technique d'amplification d'ARN (méthode NASBA [*nucleic acid sequence-based amplification*]) et permet l'amplification et la détection des mycobactéries du groupe de la tuberculose, de *M. avium*, de *M. intracellulare*, de *M. kansasii* et de *M. malmoense* directement à partir d'échantillons respiratoires décontaminés. Compte tenu de l'hétérogénéité des prélèvements, les techniques d'amplification appliquées au prélèvement comportent des limites. Ces méthodes sont recommandées uniquement en cas d'examen direct positif évoquant une mycobactérie ou lors d'une très forte suspicion après dialogue clinicobiologique. Lorsque l'examen direct est négatif, la sensibilité de ces méthodes est inférieure à celle de la culture. L'approche moléculaire est à réserver à des situations cliniques ciblées.

Dans un objectif d'identification à partir des cultures, deux approches principales peuvent être mises en œuvre : soit une hybridation moléculaire en phase liquide utilisant une sonde spécifique des mycobactéries du groupe de la tuberculose (ou d'une autre espèce) ; soit la PCR, qui comporte en plus de la phase d'amplification une étape d'hybridation sur bandelettes (différente en fonction de la présence du complexe *tuberculosis* et d'une mycobactérie atypique) ou une étape de séquençage. Les techniques moléculaires utilisent également, pour l'identification des espèces au sein du complexe de la tuberculose, le fait que certaines séquences nucléotidiques sont délétées chez certains membres du groupe de la tuberculose et qui sont appelées régions de différence (RD).

### *Détection des bordetelles*

L'agent de la coqueluche, *Bordetella pertussis*, est une bactérie fragile, qui se développe uniquement sur des milieux particuliers (gélose au sang frais de Bordet-Gengou ou milieu de Regan-Lowe au charbon). Le délai d'ensemencement des prélèvements sur ces milieux doit être inférieur à 2 heures. De plus, le diagnostic est souvent suspecté tardivement après le début des symptômes et la probabilité d'isoler la bactérie en culture devient plus faible avec le temps. En outre, la croissance de cette bactérie est lente. Aussi, la PCR présente un intérêt majeur dans le diagnostic de la coqueluche. En effet, ces techniques sont

très sensibles et spécifiques. La cible principale utilisée dans les différentes techniques est l'*IS*481 pour *B. pertussis* qui est présente en de nombreuses copies sur le génome de la bactérie. Ce gène est également présent dans l'espèce *B. holmesii* qui une espèce qui semble émerger. Le promoteur de la toxine pertussique ainsi qu'un gène codant une porine constituent également des cibles potentielles pour la recherche génomique de *B. pertussis*. L'*IS*1001 est utilisée pour détecter *B. parapertussis*. Certaines techniques, en particulier la PCR temps réel, associent en multiplex la recherche de *B. pertussis* et celle de *B. parapertussis*. Cette PCR est désormais à la nomenclature des actes de biologie médicale.

### *Détection de légionelles*

Les techniques d'amplification génique permettent de détecter les légionelles à partir des échantillons respiratoires voire de l'environnement (eau, etc.) de façon plus rapide que les cultures qui demandent plusieurs jours avant que des colonies suspectes puissent être mises en évidence sur milieu particulier (BCYE notamment). En effet, en dehors de la recherche rapide par immunochromatographie de l'antigène urinaire des souches de *Legionella pneumophila* de sérogroupe 1 qui sont majoritaires en France, la recherche par culture peut s'avérer décevante. La PCR permet donc de détecter voire de quantifier rapidement les différents sérogroupes. La cible préférentielle des différentes méthodes est le gène *mip* (*macrophage infectivity potentiator*). L'ADNr 16S et la région intergénique ADNr 5S-23S peuvent aussi être des cibles.

### *Détection de* Mycoplasma pneumoniae

La détection directe des bactéries pathogènes intracellulaires nécessite des techniques de culture cellulaire plus complexes à mettre en œuvre. Quant à la recherche d'antigènes de *M. pneumoniae*, elle n'est pas spécifique d'espèce. Les techniques sérologiques sont intéressantes, mais le diagnostic indirect est souvent tardif. D'où l'intérêt de la mise en évidence de la cytadhésine P1 ou d'un fragment spécifique de ADNr 16S qui permet d'identifier rapidement cette bactérie dans les échantillons d'origine respiratoire.

### *Détection de* Chlamydophila pneumoniae

La problématique de la détection de *C. pneumoniae* est la même que celle de *M. pneumoniae*. Dans ce cas, les gènes cibles sont des gènes codant des protéines de membrane externe *ompA* (*outer membrane protein*) et l'ADNr 16S.

## Méthodes de biologie moléculaire utilisées dans la détection de pathogènes de la sphère génitale

### *Détection de* Chlamydia trachomatis

Les techniques moléculaires sont devenues depuis plus de 10 ans les techniques de référence pour la détection de *C. trachomatis*. En effet, les techniques sérologiques sont inutiles dans les infections aiguës et peuvent être d'interprétation délicate dans un contexte d'infection chronique. La recherche directe de la bactérie faisant appel à la recherche antigénique par immunofluorescence ou technique immuno-enzymatique présente une sensibilité voisine de 75 % et la spécificité est variable. Les techniques moléculaires apparaissent plus performantes que la culture cellulaire, qui est de réalisation difficile et dont la sensibilité est voisine de 80 %, avec une sensibilité de 95 % pour les méthodes d'hybridation, et supérieure à 95 % pour les techniques d'amplification génique. Ces dernières sont les techniques de choix pour le diagnostic d'infection à *C. trachomatis*. La cible principale de détection de *C. trachomatis* est une séquence hautement conservée d'un plasmide cryptique présent à raison d'environ 7 à 10 copies par corps élémentaire de chaque sérovar de presque toutes les souches de *C. trachomatis* mais absent des autres espèces. En 2006 sont apparus en Suède des isolats présentant une délétion dans la région du plasmide ciblée par les amorces initialement utilisées pour détecter ce plasmide (« variant suédois »). Afin de rester capable de détecter ces souches, dont rien ne permet de dire qu'elles se sont répandues en Europe, d'autres cibles ont été utilisées et notamment ajoutées dans les kits d'un certain nombre de fabricants. Il s'agit notamment du gène *omp*A codant une protéine membranaire ainsi que l'ADNr 16S.

### *Détection de* Neisseria gonorrhoeae

Compte tenu en partie de la grande fragilité de la bactérie, les techniques moléculaires ont montré une plus grande sensibilité que la culture, en particulier pour les tests d'amplification. Les cibles utilisées sont soit le gène d'opacité (*opa*), soit l'ADNr 16S, le gène *por*A et un gène conservé chez *N. gonorrhoeae*, le gène *pgi*1.

Certains kits d'amplification permettent maintenant une recherche couplée de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae*.

### *Détection de* Mycoplasma genitalium

De découverte assez récente, cette bactérie constitue la deuxième cause d'urétrite non gonococcique chez l'homme après *C. trachomatis*. Deux cibles principales permettent la mise en évidence de cette bactérie par amplification génique : l'ADNr 16S et le gène *mgPa* codant une adhésine (*Mycoplasma genitalium adhesin protein*).

## Méthodes de biologie moléculaire utilisées dans la détection de pathogènes impliqués dans les infections invasives

### *Détection de* Neisseria meningitidis

La mise en évidence par culture du méningocoque à partir du prélèvement de liquide céphalorachidien ou de l'hémoculture est devenue plus difficile compte tenu de la précocité du traitement antibiotique par céphalosporines de troisième génération injectables instauré au lit du malade devant toute suspicion d'infection invasive à méningocoque. Ainsi, l'identification du pathogène en cause par

culture est devenu relativement rare. En raison de l'intérêt de mettre en place une prophylaxie des cas contacts (antibioprophylaxie et/ou vaccination spécifique), les méthodes moléculaires permettent de pouvoir confirmer l'étiologie méningococcique de ces infections invasives et sont capables d'identifier le sérogroupe en cause dans bon nombre de cas. Les cibles diffèrent en fonction de l'objectif fixé. Pour l'identification de la bactérie, les cibles sont le gène *ctr*A, codant une protéine de membrane externe impliquée dans le transport de la capsule, le gène *crg*A codant un régulateur transcriptionnel, le gène *por*B codant une porine. Lorsque l'ADN spécifique de *N. meningitidis* est détecté, se pose la question du sérogroupe en cause. La détermination du génogroupe par amplification génique est fondée sur l'amplification du gène *sia*D codant une polysialyl transférase responsable de la sialylation des polysaccharides de capsule correspondant aux sérogroupes B, C, Y et W135. Le sérogroupe A est identifié par amplification du gène *myn*B/*sac*C. Ces techniques d'amplification génique peuvent être réalisées sur LCR, sérum ou biopsies des lésions purpuriques in vivo voire en post-mortem.

### *Détection de* Streptococcus pneumoniae

Le diagnostic d'une infection invasive à pneumocoque peut également être effectué par amplification génique à côté des techniques de culture et de recherche d'antigènes de pneumocoque par méthode immunochromatographique dans le LCR pour les méningites ou dans le liquide pleural lors de pleurésie, même si cette dernière application n'est pas validée. La recherche des antigènes dans les urines n'est effectuée que dans un contexte de pneumonie. Les techniques d'amplification génique, notamment en PCR classique ou en temps réel, sont apparues comme très intéressantes. Les gènes ciblés sont habituellement le gène *ply*, qui code la pneumolysine mais qui manque de spécificité, et le gène *lyt*A codant l'autolysine plus spécifique. La recherche de pneumocoque par PCR dans un échantillon de LCR dans un contexte de méningite est performante, compte tenu notamment des charges bactériennes élevées, avec une sensibilité supérieure à 92 % et une très bonne spécificité eu égard au fait que le site est normalement stérile et que la place des autres streptocoques oraux est extrêmement limitée. C'est également le cas pour les PCR effectuées sur un échantillon de liquide pleural. Le bénéfice des amplifications effectuées à partir de prélèvements sanguins pour le diagnostic de pneumococcémie reste plus discuté.

### *Détection par PCR universelle*

Certaines cibles des méthodes d'amplification génique correspondent à des séquences conservées chez toutes les bactéries au moins sur certaines séquences. La cible le plus souvent utilisée est l'ADN codant l'ARN ribosomal 16S ou ADNr 16S. Les gènes *rpo*B (codant une ARN polymérase), *sod*A (codant une superoxyde dismutase) et *hsp*65 (codant une *heat shock protein*) sont également utilisés. Cette approche par PCR « universelle » permet de détecter la présence d'ADN bactérien dans un échantillon et de pouvoir identifier la bactérie en cause soit par une sonde spécifique, soit par séquençage du produit amplifié et comparaison de la séquence obtenue avec les séquences présentes dans les bases de données. En effet, alors que les amorces s'hybrident sur des régions conservées entre les différents genres bactériens, certaines parties du gène sont spécifiques d'un genre et/ou d'une espèce bactérienne donnée, ce qui permet l'identification des bactéries en cause. Ces approches sont particulièrement intéressantes lorsqu'elles sont appliquées à des produits pathologiques normalement stériles, lorsque les cultures sont négatives, en raison d'un traitement antibiotique préalable par exemple, ou lorsque les bactéries sont de culture fastidieuse. La PCR ciblant l'ADNr 16S peut être spécifique de genre ou d'espèce lorsque les amorces s'hybrident avec les régions spécifiques correspondantes.

## Méthodes de biologie moléculaire utilisées dans la détection d'autres pathogènes ou dans des circonstances particulières

### *Détection de* Kingella kingae

*Kingella kingae* constitue la première cause d'infection ostéoarticulaire de l'enfant de moins de 3 ans devant *S. aureus*. Ce pathogène se développe difficilement et pratiquement uniquement lorsque le produit pathologique est ensemencé directement en flacon d'hémoculture. L'amplification de l'ADNr 16S a été utilisée longtemps pour le mettre en évidence. Des amorces plus spécifiques sont actuellement disponibles ciblant le gène *cpn*60 codant pour la protéine Cpn60 qui appartient à la famille des protéines chaperonnes, ou plus récemment le gène *rtx*A appartenant au locus RTX codant une toxine bactérienne. Les produits pathologiques adaptés à la recherche de ce pathogène sont les liquides articulaires, les ponctions-biopsies osseuses.

### *Détection de* Bartonella *spp*

La PCR des gènes codant pour une enzyme de la voie de synthèse de la riboflavine (gène *rib*C), pour la citrate synthétase (*gltA*) et l'ADNr 16S pour les cibles les plus fréquemment utilisées s'effectue à partir de la ponction-aspiration de ganglion, sur la biopsie d'exérèse ou sur valve cardiaque. Elle permet la mise en évidence, en fonction du choix des amorces, soit de l'espèce *B. henselae*, soit du genre *Bartonella*. La mise en évidence de l'ADN de *B. henselae* par PCR, dans les prélèvements bactériologiques obtenus par ponction ou exérèse chirurgicale, est la meilleure technique de diagnostic des adénites à *B. henselae*.

### *Détection de* Tropheryma whipplei

La découverte de la bactérie responsable de la maladie de Whipple, décrite initialement en 1907, est liée à l'utilisation de la biologie moléculaire, en particulier grâce à l'amplification de l'ADNr 16S. C'est actuellement plus

souvent la région intergénique 16S–23S qui sert de cible, mais l'utilisation d'une séquence d'insertion – ce qui permet d'augmenter la sensibilité de la PCR – comme cible est aussi décrite. La PCR est un élément clé du diagnostic biologique de cette pathologie. Les produits pathologiques adaptés à la recherche de ce pathogène sont la salive, le sang total et les biopsies duodénales.

### *Détection de* Clostridium difficile

Au côté des méthodes antigéniques de recherche des toxines A et B de *C. difficile* ont été développées des techniques de PCR appliquées directement sur les selles ciblant l'ADNr 16S, les gènes codant les toxines et les gènes codant la GDH (glutamate déshydrogénase). Plus récemment, les techniques de PCR en temps réel commercialisées permettent par multiplexage de détecter, toujours à partir d'un échantillon de selles : le gène *tcd*B codant la toxine B ; le gène *tcd*C codant un répresseur, notamment en mettant en évidence une délétion de 117 paires de bases responsable de l'hyperproduction de toxine, entraînant l'hypervirulence des souches de ribotype 027 ; ainsi que le gène *cdt*A avec par exemple le test GenExpert® (Cepheid).

### *Détection d'*Escherichia coli *entérohémorragique*

La mise en évidence des gènes de virulence constitue la méthode la plus sensible pour le diagnostic d'infection à *E. coli* entérohémorragique. La PCR est réalisée au moyen de couples d'oligonucléotides spécifiques des gènes *stx1* et/ou *stx2*, éventuellement couplée à la recherche du gène *eae*, soit en temps réel, soit par PCR classique suivie d'une hybridation sur bandelette (Genotype® EHEC, Hain). Cette méthode s'applique soit sur colonies, soit, pour un diagnostic un peu plus précoce, sur une culture de quelques heures des selles en bouillon suivie d'une extraction d'acides nucléiques et d'une amplification des gènes cibles.

### *Détection de* Streptococcus agalactiae

Dans un contexte de suspicion d'infection maternofœtale ou d'accouchement sans que le dépistage du portage par culture, normalement effectué à la 34e–38e semaine d'aménorrhée, ait été fait, la recherche par PCR d'ADN de *S. agalactiae* ciblant en particulier le *CAMP factor* (gène *cfb)* peut être effectuée.

### *Détection de* Staphylococcus aureus

La mise en évidence de *Staphylococcus aureus* dans un prélèvement, notamment dans une recherche de portage ou à partir d'une hémoculture positive, peut être accélérée par détection du gène *nuc*A codant la DNase de *S. aureus*. Cette recherche est souvent couplée à la recherche de la résistance à la méticilline.

### *Détections d'autres germes*

Des techniques d'amplification génique ont également été développées pour la détection des leptospires, de *Francisella tularensis*, de *Coxiella* spp., de *Borrelia burgdorferi*, de *Campylobacter* spp., de *Listeria monocytogenes*, de *Clostridium botulinum.* La recherche de ces pathogènes a été développée sous forme de tests « maison ».

## Détection de gènes de résistance aux antibiotiques

### Mycobacterium tuberculosis

Des techniques de biologie moléculaire qui permettent de mettre en évidence la résistance aux antituberculeux majeurs ont été développées. Cette approche permet en quelques heures d'identifier les mutations de résistance alors que l'antibiogramme classique nécessitera 7 à 10 jours en milieu liquide et 3 semaines en milieu solide. En effet, la recherche de mutations sur certains gènes spécifiques est synonyme de résistance. Elle est appliquée en particulier pour les gènes *rpo*B (résistance à la rifampicine), *inh*A et *kat*G (résistance à l'isoniazide), *pncA* (résistance au pyrazinamide). La corrélation entre la détection d'une résistance génotypique et le phénotype est très élevée ; en pratique, supérieure à 99 % pour la résistance à la rifampicine et de l'ordre de 70 % pour la résistance à l'isoniazide compte tenu d'une variabilité plus grande des cibles potentiellement mutées. En dehors du séquençage qui permet de détecter la totalité des mutations, deux techniques commercialisées sont disponibles. La première technique est composée d'une PCR « classique » suivie d'une hybridation sur bandelette ; c'est le cas du test Genotype® MTBDR plus (Hain), qui permet d'identifier les mycobactéries du groupe de la tuberculose en plus des mutations entraînant la résistance à la rifampicine ainsi que les mutations les plus fréquentes impliquées dans la résistance à l'isoniazide sur le gène *katG* et le promoteur du gène *inhA* ; et du test INNO-LiPA Rif-TB® (Murex, Innogenetic). Un autre test est fondé sur une PCR en temps réel qui permet également la recherche des mycobactéries du groupe de la tuberculose ainsi que de détecter la résistance à la rifampicine (GeneXpert MTB/Rif®, Cepheid). Ces tests peuvent s'appliquer directement sur l'échantillon biologique.

### Staphylococcus aureus *résistant à la méticilline (SARM)*

La mise en évidence de la résistance à la méticilline (chef de file des pénicillines du groupe M) est un élément clé dans la prise en charge des infections à staphylocoque. En effet, la résistance à la méticilline entraîne une résistance à toutes les β-lactamines. La recherche du gène *mec*A, à l'origine de cette résistance, constitue la cible privilégiée pour prédire la résistance. La recherche du gène *mecA* ne doit être réalisée qu'à partir de colonies isolées car, dans

les prélèvements, il y a souvent présence de staphylocoques à coagulase négative qui rendent le résultat difficile à interpréter.

### *Entérocoques résistants aux glycopeptides*

La résistance d'*Enterococcus faecalis* et d'*E. faecium* aux glycopeptides est principalement médiée par des opérons hébergeant différentes ligases, *vanA*, *vanB*, *vanD, vanE, vanG, vanL, vanM* et *vanN*. Les deux génotypes les plus fréquemment retrouvés sont *vanA* et *vanB* chez deux espèces, *E. faecalis* et *E. faecium*. La détection de ces gènes permet d'identifier cette résistance qui pose des problèmes de prise en charge pour le patient et qui expose à un risque épidémique. Cette recherche est effectuée sur prélèvements ou sur colonies à l'aide de « PCR maison » ou de kits commercialisés.

### *Helicobacter pylori*

L'infection par *H. pylori* est fréquente. Les indications du diagnostic de cette infection et de son traitement sont nombreuses et bien codifiées par des recommandations de consensus. La fréquence élevée des résistances aux antibiotiques recommandés impose maintenant l'abandon des traitements empiriques et le recours nécessaire à des traitements orientés par la détection des résistances. L'isolement et l'antibiogramme par culture de la bactérie à partir de biopsies gastriques sont longs et difficiles et ne répondent pas au large besoin de détection de la résistance d'*H. pylori*. La PCR en temps réel, par sa rapidité, sa possibilité d'automatisation et ses performances, est une alternative aux méthodes qui impliquent la culture.

Le délai prolongé et les difficultés de la culture ont motivé la mise au point de techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP, PCR temps réel, sondes) pour pouvoir apporter une réponse dans les 24 heures qui suivent la fibroscopie en recherchant directement à partir des biopsies les mutations responsables de la résistance. Ces techniques ont surtout été développées pour la recherche des mutations conférant la résistance à la clarithromycine. Elles restent réservées à des laboratoires spécialisés. Elles reposent sur des techniques « maison » développées par ces équipes et nécessitent une maîtrise technique qui limite leur diffusion dans les laboratoires non spécialisés. De plus, la non-prise en compte de ces techniques récentes dans la nomenclature des actes de biologie et leur non-remboursement freinent leur diffusion.

La PCR temps réel qui mesure la fluorescence émise par une sonde spécifique du produit amplifié à chaque cycle d'amplification a permis de réduire le délai de réponse à 2 à 3 heures, a diminué les risques de contamination et a simplifié les manipulations. La majorité des techniques rapportées dans la littérature utilisent un appareil LightCycler® (Roche) et nécessitent une étape d'analyse de la température de fusion du fragment d'ADN amplifié pour déterminer la mutation en cause. Cette analyse ne permet pas de faire la différence entre les deux mutations les plus fréquentes car leur température de fusion est trop proche. Cette étape supplémentaire est un frein à la diffusion de la technique.

Une technique multiplex utilisant des amorces scorpions permet dans un seul tube et en une seule étape de détecter les trois mutations qui confèrent la résistance à la clarithromycine. Ce test a été utilisé dans plusieurs études sur l'épidémiologie de la résistance d'*H. pylori*.

## Typage génétique des bactéries

Le typage des bactéries constitue une étape importante dans le cadre d'une enquête épidémiologique qui est déclenchée en cas de suspicion d'épidémie. Il permet de confirmer ou d'infirmer l'épidémie, d'identifier la source, le cas index, les voies de transmission. Il utilise des marqueurs épidémiologiques pour caractériser et comparer les bactéries. Ces marqueurs doivent être les plus performants et surtout les plus appropriés à la situation épidémiologique. On oppose classiquement les marqueurs phénotypiques (exprimés par la bactérie) aux marqueurs génotypiques (caractérisant le génome de la bactérie) en pensant parfois à tort que les marqueurs génotypiques sont plus performants que les marqueurs phénotypiques. En fait, les performances d'un marqueur sont variables selon les situations épidémiologiques, et chaque nouvelle alerte épidémique doit faire discuter l'indication et l'intérêt des marqueurs à mettre en œuvre. De plus, chaque typage doit comporter une étape de validation des marqueurs pour vérifier à l'aide de témoins leur pouvoir discriminant dans la situation étudiée.

Une souche isolée d'un patient, d'un soignant ou de l'environnement est appelée un **isolat**. Le typage consiste à comparer des isolats.

Le typage permet de confirmer un **lien épidémiologique** entre deux isolats, lien épidémiologique suspecté par une proximité spatiale et temporelle de ces isolats (même service, même chambre, même bloc, et même jour ou semaine).

Le lien épidémiologique doit être confirmé par le typage pour démontrer une **transmission**. La transmission d'une bactérie d'un patient à l'autre implique un **lien génétique** entre les deux isolats. Les bactéries sont des êtres vivants dont la multiplication peut être très rapide, le doublement pouvant parfois se faire en moins de 20 minutes. Au cours d'un événement de transmission, ce sont les descendantes des bactéries qui colonisaient ou infectaient le premier malade que l'on isole chez le deuxième malade. Ainsi, au cours d'une épidémie comportant une période courte de forte transmission, les bactéries isolées ont toutes un ancêtre commun et proche qui colonisait ou infectait le cas index ou la source de l'épidémie (fig. 4.12). L'ensemble des isolats descendants proches d'un même ancêtre forme un **clone épidémique** d'isolats génétiquement très proches (fig. 4.12).

L'isolement répété et proche dans le temps et l'espace de bactéries de la même espèce doit déclencher une alerte et faire suspecter une épidémie due à la transmission de

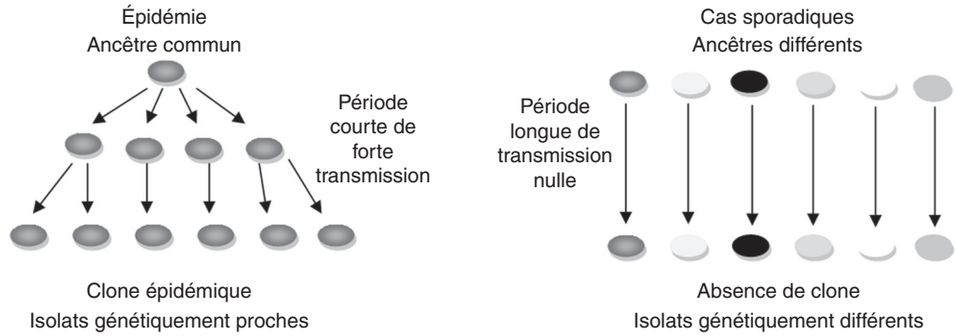



**Fig. 4.12.** – *Schéma représentatif et comparatif d'une épidémie et de cas sporadiques.*

cette bactérie d'un malade à l'autre. Seule l'utilisation de marqueurs de typage peut permettre la distinction entre un début d'épidémie et l'isolement fortuit d'isolats sans lien entre eux.

De nombreuses espèces bactériennes présentent une très grande diversité génétique due à une fréquence élevée de mutations ou d'acquisitions d'ADN. Cette diversité génétique est exploitée dans les typages génétiques ; des isolats sans lien de transmission récents ont peu de risque d'être génétiquement proches.

La structure génétique, la stabilité génétique d'une espèce et la vitesse d'acquisition de sa diversité génétique, c'est-à-dire sa rapidité ou sa lenteur à muter, vont avoir des conséquences fortes sur la capacité des marqueurs génotypiques ou phénotypiques de distinguer deux isolats sans lien. Une espèce de structure clonale, c'est-à-dire dont la diversité génétique est due essentiellement à des mutations qui s'accumulent dans son génome, et dont la fréquence des mutations est faible, va être difficile à analyser à l'aide de la plupart des marqueurs génotypiques du fait des très faibles différences génétiques mises en évidence entre des isolats sans proximité. C'est le cas par exemple des SARM dont seuls quelques clones sont responsables de la pandémie mondiale que nous connaissons. Pour les espèces de structures recombinantes, c'est-à-dire dont la diversité génétique est due essentiellement à des acquisitions de gènes entiers par transfert et recombinaison, et si ces recombinaisons sont fréquentes, ces échanges génétiques peuvent masquer la proximité génétique de deux isolats proches. Les choses ne sont pas simples et un bon marqueur dans une situation peut se révéler peu performant dans une autre. Il n'y a donc pas, malgré ce qu'affirment certains fournisseurs, de recette et de marqueur universel permettant de résoudre n'importe quelle situation. Le typage bactérien est donc un artisanat qui exige adaptations et réglages, remise en cause et prudence.

Les **performances** d'un marqueur de typage sont :

- la **typabilité** : évaluée par le pourcentage d'isolats de l'espèce bactérienne qui sont typables par ce marqueur ;
- la **reproductibilité** : le marqueur doit classer les isolats toujours de la même façon ;
- la **faisabilité** qui fait intervenir le coût, l'accessibilité, la difficulté de réalisation ou d'analyse, le temps de rendu ;
- le **pouvoir discriminant** qui mesure la capacité d'un outil de typage de bien différencier des isolats non liés.

Le pouvoir discriminant est d'une grande importance ; son niveau doit être adapté à chaque situation.

## Techniques génotypiques (fig. 4.13)

Au fur et à mesure de l'acquisition des techniques de biologie moléculaire, celles-ci ont été successivement appliquées au typage de l'ADN bactérien. Ainsi, depuis les années 1980, l'extraction de l'ADN bactérien génomique ou plasmidique, sa migration électrophorétique classique ou en champ pulsé, sa restriction enzymatique puis les techniques de PCR ont été utilisées pour typer les isolats bactériens (fig. 4.13). La grande majorité de ces techniques de typage génère des profils génétiques constitués de bandes. La comparaison de ces profils permet de comparer les isolats voire de construire des dendrogrammes, véritables arbres généalogiques des isolats testés. Le séquençage permet maintenant de comparer la séquence de plusieurs gènes bactériens ; c'est la **MLST** (*multilocus sequence typing*) au pouvoir discriminant et à la reproductibilité maximale, mais qui exige un séquenceur et dont l'analyse est encore lourde. Les techniques d'hybridation à l'aide de puces à ADN (*macro-* et *micro-arrays*) analysent l'hybridation de l'ADN de la souche typée avec de nombreuses sondes de séquence connue.

Les techniques de PCR sont rapides et peu chères mais parfois moins reproductibles.

Comparer les isolats, c'est comparer les profils (fig. 4.14).

La technique génotypique de référence a longtemps été le **champ pulsé**. La MLST a pris sa place du fait de son universalité (applicables à de très nombreuses espèces), de son excellente reproductibilité et de la possibilité de l'utiliser en réseau pour comparer ses isolats avec ceux du monde entier. Cette technique lourde et onéreuse est donc souvent réservée aux centres de référence ou aux étapes de confirmation. Elle est difficilement utilisable en temps réel au cours même d'un épisode épidémique où les isolats sont collectés chaque jour et où les attentes sont fortes et pressées de la part de la cellule de crise. Les techniques rapides utilisant la PCR (RAPD, Rep-PCR), bien que difficilement reproductibles d'un centre à l'autre, ont l'avantage de la simplicité et de la rapidité (4 heures). Leur pouvoir discriminant est à vérifier à chaque étude, mais la possibilité de moduler facilement ce pouvoir discriminant en fonction de la température d'hybridation de la PCR en fait un outil universel et rapidement opérationnel, adaptable rapidement à chaque situation.

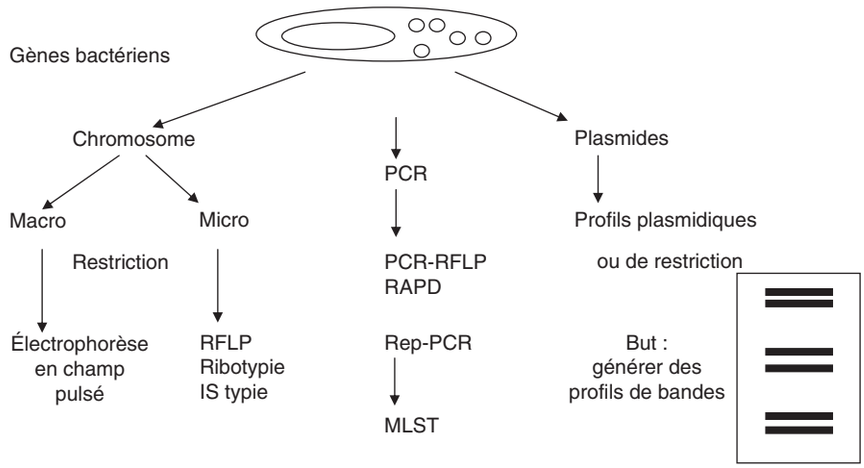



**Fig. 4.13.** – *Représentation schématique des différentes techniques de typage.*

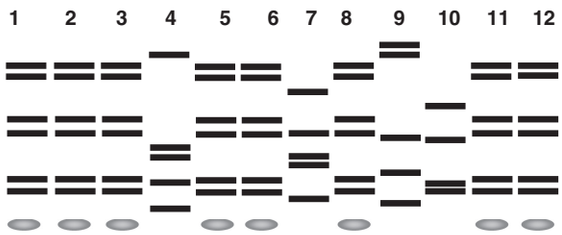



**Fig. 4.14.** – *Comparaison de souches de même espèce dans un contexte épidémique par la technique du champ pulsé.* Le même clone épidémique est sur les pistes 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11 et 12.

## *Cas particuliers*

### Technique du MVLA (*multilocus variable number of tandem repeats analysis*)

Le MVLA repose sur l'analyse de séquences répétées en tandem, qui sont des séquences nucléotidiques répétées en nombre variable dont l'élément de base est constitué d'une séquence habituellement comprise entre 10 et 100 nucléotides. Cette technique récente permet simplement de comparer les isolats les uns aux autres avec une possibilité d'échange des informations d'un laboratoire à l'autre. Elle présente l'avantage d'être facilement mise en œuvre, d'être plus rapide que le MLST et que l'électrophorèse en champ pulsé PFGE. Cette technique, initialement appliquée aux mycobactéries du groupe de la tuberculose (MIRU-VNTR [(*mycobacterial interspersed repetitive units – variable number of tandem repeats*]), a ensuite été appliquée avec succès à d'autres bactéries, comme les pneumocoques, les staphylocoques, les légionelles, *Pseudomonas aeruginosa*.

### Techniques de typage moléculaire des mycobactéries du groupe de la tuberculose

Ces techniques présentent un intérêt épidémiologique permettant de confirmer des chaînes de transmission suspectées. Elles peuvent également faire la distinction entre rechute et nouvelle contamination, mais elles permettent aussi le suivi de souches multirésistantes. Ces méthodes permettent de documenter les éventuelles contaminations de laboratoire et servent également dans les analyses de phylogénie. La technique de référence est fondée sur la détection des *IS*6110 par hybridation après restriction de l'ADN génomique. Cette technique est remplacée le plus souvent par le typage MIRU-VNTR, qui consiste en la recherche (par PCR) de régions répétées polymorphiques en fonction des souches. Une technique fondée sur l'étude des CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) de *M. tuberculosis* appelée le *spoligotyping* est également utilisée.

## Précautions

La vérification du pouvoir discriminant d'une technique de typage nécessite de la tester sur des isolats témoins aux liens épidémiologiques connus : des isolats épidémiologiquement liés, collectés au cours d'une épidémie précédente, et des isolats indépendants sans lien entre eux (isolats de services différents et de périodes différentes). Le marqueur utilisé doit bien regrouper les isolats liés et distinguer les isolats indépendants. La constitution de collections d'isolats des espèces les plus fréquemment responsables d'épidémies est donc un pré-requis indispensable.

Il faut également signaler que, lors d'un typage, les isolats ont la même relevance, qu'ils soient responsables d'infection ou de colonisation, ou même qu'ils soient issus de l'environnement. C'est une chaîne de transmission que l'on cherche à remonter ; n'importe quel chaînon a son importance, d'autant plus qu'il est impossible d'être exhaustif. L'ensemble des isolats collectés ne représente souvent qu'une petite partie des bactéries responsables de l'épidémie. Comme pour une enquête policière, beaucoup d'indices ont déjà disparu quand l'enquête commence.

Le typage épidémiologique d'une épidémie ne peut être réalisé que si l'on a collecté suffisamment d'isolats. Cette affirmation triviale est pourtant à rappeler fortement : sans isolat pas de typage. Il faudra donc sensibiliser et solliciter les cliniciens pour obtenir des isolats en prélevant leurs patients même si l'intérêt diagnostique est faible. Ainsi, même en cas d'antigénurie positive à *Legionella pneumophila*, l'isolement de la souche à partir d'un prélèvement invasif peut avoir un intérêt collectif majeur en permettant la comparaison avec des isolats environnementaux pour identifier la source alors que l'intérêt personnel pour le patient infecté est nul.

Cette sollicitation des cliniciens souligne l'importance et la nécessité du travail multidisciplinaire qui doit être déployé en cas d'alerte épidémique. Il est également important de souligner l'intérêt que les bactériologistes constituent des souchothèques de souches hors prélèvements pathologiques voire de prélèvements de l'environnement. Le typage s'intègre dans un travail d'équipe ; c'est un des outils de l'enquête. Il est donc réalisé en lien avec les autres acteurs de la lutte contre l'épidémie, et doit intégrer et surtout confirmer les hypothèses avancées. La confrontation avec les données épidémiologiques des enquêtes d'exposition ou cas-témoins est capitale.

## Évolutions

Comme dans d'autres domaines de la bactériologie, l'automatisation et l'analyse bio-informatique du typage bactérien sont deux évolutions récentes. L'automatisation

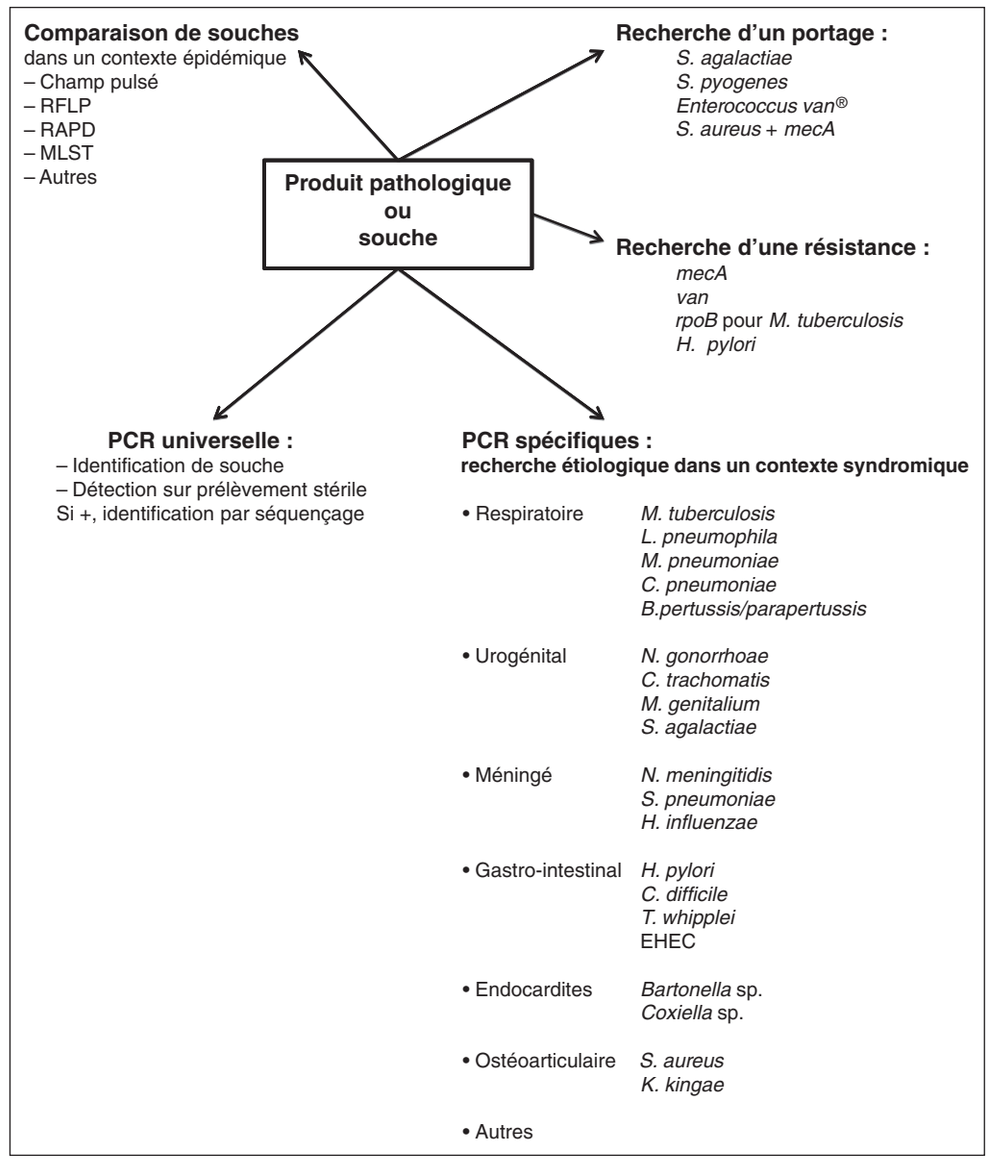



**Fig. 4.15.** – *Principales orientations des applications de la biologie moléculaire.*

est nécessaire pour que ces techniques diffusent vers des laboratoires non spécialisés. Elle se heurte au fait qu'aucune technique ne permet de répondre seule à toutes les situations auxquelles on peut être confronté, et au prix de ces automates pour une activité peu rémunératrice bien qu'inscrite à la nomenclature. L'analyse bio-informatique est maintenant indispensable pour exploiter les données complexes de profils, de séquences ou de puces.

On voit que la biologie moléculaire occupe dans les laboratoires une place centrale (fig. 4.15) et croissante qui évoluera probablement vers une approche syndromique combinant dans le futur recherches bactériennes, virales et parasitaires. Cette perspective sera dominante si, parallèlement au diagnostic étiologique, progressent les connaissances des supports génomiques des résistances aux antimicrobiens.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris : Elsevier; 2005.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology : applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev 2006; 19 : 165–256.

Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol Rev 2009; 33 : 892–916.

Millar BC, Xu J, John JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. Curr Issues Mol Biol 2007; 9 : 21–40.

Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR : a powerful ally in cancer research. Trends Mol Med 2003; 9 (5) : 189–95.

Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications. Rev Biol Biotech 2002; 2 (2) : 2–11.

Samuel Y, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases : uses, limitations, and future applications in acute-care settings. Lancet Infect Dis 2004; 4 : 337–48.


**Rappel sur sites de séquences**

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.
http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi.
http://www.ridom-rdna.de.

CHAPITRE

5

# Automatisation et laboratoire de bactériologie

C. Martin, F. Garnier

## Généralités

L'automatisation des laboratoires de bactériologie est actuellement en plein développement. Le laboratoire de bactériologie est un des derniers secteurs de la biologie à être automatisé, principalement en raison de la variété des échantillons à traiter (sang, tissus, sécrétions, liquides, matériels) et des techniques mises en œuvre (étude cytologique, mise en culture, identification, étude de la sensibilité aux antibiotiques, détection moléculaire et comparaison génomique des souches). Certaines étapes de l'analyse bactériologique proprement dite ont été automatisées de façon plus ou moins complète depuis de nombreuses années, comme la détection des hémocultures positives, l'identification et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Certaines étapes de l'analyse cytologique (cytologie urinaire et détection de la bactériurie, coloration de frottis) ont bénéficié de l'apparition de nouvelles technologies et permettent d'améliorer une automatisation dont les premières tentatives remontent aux années 1980 (fig. 5.1). Enfin, plus récemment, l'apparition d'automates d'ensemencement des prélèvements permet d'envisager une chaîne d'analyse complète. Les analyses moléculaires sont aussi de plus en plus automatisées avec l'apparition d'automates d'extraction des acides nucléiques, d'amplification et de détection génomique.

La place de l'informatique dans l'automatisation des étapes analytiques est également importante puisqu'elle a permis de développer, autour de systèmes de détection, des systèmes d'exploitation, de disposer de données toujours plus nombreuses, de réaliser des interfaces machine–utilisateur plus conviviales, de pouvoir consulter, valider à distance. De plus, cela permet aujourd'hui une concentration des données issues des automates et de mesurer les flux de travail. Ces logiciels, appelés *middleware*, réalisent ainsi une interface avec le système de gestion du laboratoire, lui-même interfacé avec les logiciels de prescriptions, de mouvements des patients.

## Automates de coloration

L'automatisation des colorations en bactériologie existe depuis les années 1970. Le principe des automates est le transfert de portoirs contenant les lames dans les différents bacs de coloration et de rinçage. Depuis quelques années sont apparus des automates permettant de mieux prendre en compte l'aspect sécurité comme la toxicité des produits, qui se traduit par la mise en place d'enceinte étanche pour la protection du manipulateur, de système de récupération des déchets pour éviter la dispersion dans l'environnement, et de systèmes de fixation et de rinçage plus performants pour éviter les contaminations entre les échantillons.

Le principe de ces automates repose sur le passage dans différents bains de colorants ou l'aérosolisation de ceux-ci. Les principales caractéristiques des automates de coloration actuellement commercialisés sont résumées dans le tableau 5.1.

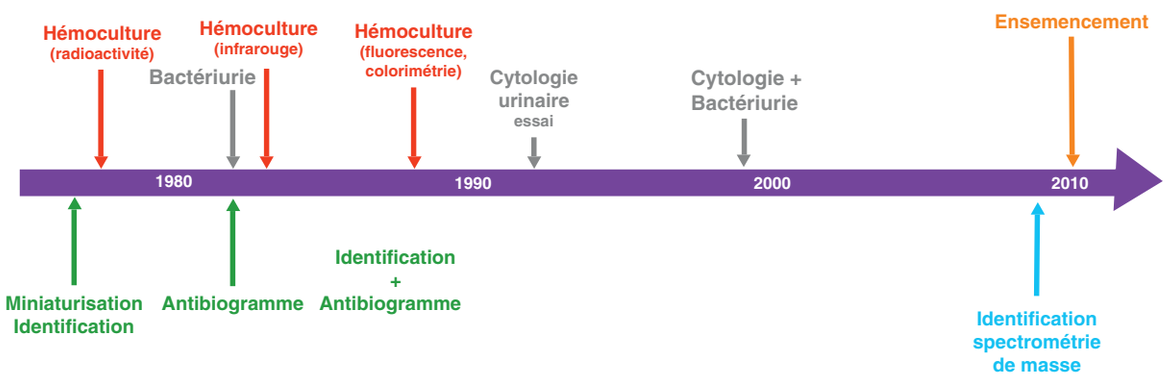



Fig. 5.1. – *Étapes de l'automatisation en bactériologie depuis 1970.*

**TABLEAU 5-1**

**Principales caractéristiques des automates de coloration de bactériologie.**

| | *RALstainer®* | *Polystainer®* | *Autostainer®* | *Aerospray®* | *Prévicolor®* |
|---|---|---|---|---|---|
| Fabricant/ distributeur | RAL/i2A | IUL-instrument | Dagatron/biocentric | Elitech | bioMérieux |
| Principe | Immersion transfert de station en station | Immersion transfert bac à bac | Immersion lame sur carrousel | Spray par buse | Spray par buse |
| Caractéristiques | 4 stations coloration<br>1 station rinçage<br>2 stations séchage | 4 bacs coloration<br>1 station rinçage<br>1 chambre séchage | Cytocentrifugeuse carrousel | Cytocentrifugeuse carrousel | Cytocentrifugeuse carrousel |
| Enceinte étanche | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui |
| Nombre de lames | 1–20 | 1–20 | 1–10 ou 1–20 | 1–12 | 1–12 ou 1–30 |
| Nombre de programmes | 10 | 10 (10 étapes) | | 9 | |
| Colorations disponibles | Gram, auramine, Ziehl-Neelsen, MGG | Gram | Gram, auramine, Ziehl-Neelsen, MGG | Gram, auramine, Ziehl-Neelsen, MGG | Gram, auramine, Ziehl-Neelsen, MGG |
| Gestion des déchets | Oui | Non | Oui | Oui | Oui |

MGG : May-Grünwald-Giemsa

## Automates de cytologie urinaire et de détection de la bactériurie

Dans les années 1980, l'automatisation de l'analyse cytobactériologique des urines a débuté par la détection de la bactériurie par des systèmes mesurant la croissance bactérienne après 3 à 6 heures d'incubation afin de dépister rapidement les urines à culture négative (Autobac MTS®, General Diagnostics, AutoMicrobic system ; Vitek Systems, MS-2®, Abbott). La détection était réalisée par mesures photométriques (turbidimétrie) répétées à partir d'échantillon dilué dans un bouillon nutritif incubé et agité à 37 °C. Avec ces automates, la cytologie urinaire était réalisée à l'aide de cellule type Lemaur par exemple, et seules les urines détectées positives faisaient l'objet d'un isolement, d'un antibiogramme et d'une identification. Les études avaient montré que les urines positives (sans contaminants) étaient détectées après 3 à 4 heures d'incubation. L'antibiogramme pouvait être réalisé ensuite à l'aide de cassettes spécifiques permettant d'étudier la sensibilité aux antibiotiques.

La quantification des leucocytes et des hématies dans les urines a fait l'objet de tentative d'automatisation dès le début des années 1990. Le principe de détection reposait soit sur l'analyse d'images, soit sur la différence d'impédance générée par le passage de particules de l'échantillon dilué dans une solution isotonique entre deux électrodes.

Les automates de cytologie et détection de la bactériurie commercialisés actuellement sont fondés soit sur l'analyse d'images (IQ Elite®, Iris Diagnostics ; Urised®, 77 Elektronika, i2A) permettant la caractérisation et la numération des éléments figurés et des particules, soit sur la détection laser par cytométrie de flux après marquage par des fluorochromes des cellules (UF 500i® et 1000i®, Sysmex, bioMérieux).

Ces automates réalisent la numération des hématies et des leucocytes de manière dynamique sur des volumes (allant de 2,4 à 500 µl. Les études disponibles montrent de bonnes performances en termes de sensibilité et de spécificité de l'automate pour les leucocytes par rapport à la technique manuelle. Les faibles valeurs prédictives positives obtenues pour les hématies, levures et cylindres sont liées à la meilleure détection de ces éléments par les automates que par la méthode manuelle. Les valeurs prédictives négatives sont bonnes pour ces paramètres. La reprise de l'analyse ou un contrôle par la méthode manuelle est nécessaire pour des échantillons dont les paramètres sont en alarme ou lorsque les urines sont troubles (Urised®).

Certains automates présentent également un module permettant l'étude cytobactériologique de liquides biologiques (liquides céphalorachidien [LCR], articulaire, pleural, ascite, péricardique, dialyse péritonéale).

Les principales caractéristiques des systèmes de cytologie et de détermination des sédiments urinaires actuellement commercialisés sont résumées dans le tableau 5.2.

## Gestion des hémocultures

La détection de la positivité des hémocultures a été une des premières étapes de l'automatisation des laboratoires, justifiée notamment par la gestion et la manipulation biquotidienne d'un nombre de flacons souvent conséquent. L'automatisation a d'abord visé à effectuer une détection plus rapide des flacons positifs, puis à prendre en charge la gestion des flacons. La détection de la positivité était une méthode visuelle nécessitant la manipulation de nombreux flacons et sujette à des variations individuelles du lecteur.

Les premiers automates, à la fin des années 1970, utilisaient des milieux de cultures contenant des substrats radioactifs ($CO_2$ marqué au carbone 14). La détection de la radioactivité du $C^{14}$ dans l'atmosphère du flacon (respirométrie) permettait la construction de courbes cumulatives de radioactivité, et était déclaré comme positif tout flacon pour lequel le seuil de positivité était atteint. Le délai de positivité a été raccourci par l'utilisation de cette méthode par rapport à la lecture « à l'œil ». Ce type d'appareil semi-automatique nécessitait le chargement des flacons.

L'évolution s'est faite au cours des années vers des automates intégrant des étuves et des systèmes de chariotage des flacons afin de favoriser des lectures rapprochées permettant d'affiner les algorithmes de détection ; et vers des systèmes de détection de $CO_2$ non radioactifs infrarouges qui ont été remplacés par la détection de l'augmentation de pH en fluorométrie et colorimétrie, mais également par des capteurs de détection de la pression de gaz à l'intérieur des flacons. La multiplication des détecteurs dans des modules thermostatés (1 cellule par puits contenant un flacon) est la dernière évolution évitant les pannes mécaniques liées aux déplacements des flacons sur des chariots.

Les technologies de détection de $CO_2$ fondées sur la fluorimétrie, la colorimétrie ou la détection de pression présentes actuellement sur les automates ont montré une meilleure sensibilité comparativement au mirage des flacons par un observateur même expérimenté, notamment pour des bactéries ne troublant pas les bouillons de cultures (*Campylobacter* sp. par exemple). De même, la mise au point de milieux pour les bactéries à croissance difficile a concouru à augmenter la sensibilité de la méthode. L'adjonction de systèmes d'adsorption ou de neutralisation des antibiotiques (résine, charbon, supplément) a montré un meilleur taux de détection de culture chez des patients sous antibiothérapie. L'amélioration des performances a conduit à préconiser des délais d'incubations plus courts (5 jours). La répercussion sur le délai de rendu des résultats de l'examen direct est certaine. En revanche, l'impact sur le rendu final comprenant identification et antibiogramme est fonction de l'organisation mise en place pour conserver le bénéfice de cette détection plus précoce.

Les principales caractéristiques des systèmes de détection des hémocultures sont résumées dans le tableau 5.3.

## Automates d'identification et d'antibiogramme

L'automatisation de l'identification n'a pu être réalisée qu'après une étape de miniaturisation initiée par la société API Systems au début des années 1970.

La première étape a consisté à automatiser la lecture des galeries d'identification, d'antibiogramme et l'interprétation

**TABLEAU 5-2**

**Principales caractéristiques des automates d'études des sédiments urinaires.**

| *Automates* | *IQ Elite®* | *Urised®* | *UF 500i/1000i®* |
|---|---|---|---|
| Fabricant/distributeur | IRIS Diagnostics | 77 Electronika/I2A | Sysmex/bioMérieux |
| Principe | Analyse et reconnaissance d'images | Analyse et reconnaissance d'images | Cytométrie de flux |
| Détection cellules épithéliales | Oui | Oui | Oui |
| Détection cylindres | Oui | Oui | Oui |
| Détection levures | Oui | Oui | Oui |
| Détection/Caractérisation des cristaux | Oui/Oui à l'écran | Oui/Oui automatique | Oui/non Nécessité microscopie |
| Volume nécessaire (ml) | 2,1 | 2,0 | 4,0 (automatique) 2,0 (manuel) |
| Volume aspiré (ml) | 2,1 | 2,0 | 0,8 |
| Volume analysé (µl) | 500 | 2,4 | 9 |
| Homogénéisation | Bullage | Aspiration/refoulement | Aspiration/refoulement |
| Nécessité dilution | Non | Oui (urine trouble) | Non |
| Passage tube borate | Oui | Oui | Oui |
| Consommables | Liquide de gainage Contrôles Tube | Eau osmosée Contrôles Cuvette de centrifugation Tube | Liquide de gainage Contrôles Fluorochromes GB et GR Diluants sédiments et bactéries Tube |

**TABLEAU 5-3**

**Principales caractéristiques des systèmes des automates d'hémocultures.**

| *Automates* | *Bactec® 9240/9050/9120/LX* | *Bact'Alert 3D®* | *VersaTREK®* |
|---|---|---|---|
| Fabricant/distributeur | Becton Dickinson | bioMérieux | Trek.Diagnostic Systems/i2A |
| Principe de détection | Fluorimétrie (↑ $CO_2$) | Colorimétrie (↑ $CO_2$) | Pression gaz ↓ $O_2$ ↑ $CO_2$, $N_2$, $H_2$ |
| Volume sang/bouillon dans les flacons (en ml) | 0,5–10/25–40 | 0,5–10/10–40 | 0,1–10/40–80 |
| Fréquence de lecture | 10 minutes | 10 minutes | 24 minutes |
| Inhibition des antibiotiques | Résine | Charbon | Supplément aminoside dans le flacon anaérobie |
| Remarques | | | Agitation des flacons aérobies (barreau aimanté) |

des résultats en constituant des bases de données. La distribution des galeries a ensuite été automatisée (Vitek 2®, bioMérieux). La préparation de l'inoculum demeure aujourd'hui encore une étape manuelle. En ce qui concerne l'antibiogramme, l'automatisation des systèmes en milieu liquide couplée à une galerie d'identification a précédé l'automatisation de la lecture des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé (SIRscan 2000 automatic®, i2A). Les automates disponibles actuellement sur le marché permettent l'identification et l'antibiogramme sur des galeries ou des cartes séparées ou combinées en 4 à 18 heures suivant les espèces.

Le pouvoir discriminant des systèmes automatisés d'identification est limité par la diversité des bactéries isolées en pratique médicale en dépit d'un nombre accru

de tests biochimiques. Les automates permettent l'identification des espèces courantes (entérobactéries, staphylocoques, streptocoques) qui représentent la majorité des espèces isolées. Pour certains groupes bactériens (streptocoques, bacilles à Gram positif, bacilles à Gram négatif non fermentaires), l'identification est moins fiable et rend souvent nécessaire le recours à des méthodes moléculaires.

Les automates présentent des systèmes experts qui permettent la détection de mécanismes de résistance ou de phénotypes impossibles après confrontation avec l'identification. Ces systèmes doivent tenir compte des recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) concernant les concentrations minimales inhibitrices (CMI). L'harmonisation des recommandations nationales avec les recommandations européennes va permettre une mise à jour plus rapide des systèmes experts des antibiogrammes en milieu liquide. La mesure de la sensibilité des automates d'antibiogramme en milieu liquide repose soit sur la mesure de la CMI vraie sur une large gamme de diffusion, soit sur la détermination d'une CMI calculée à partir d'une gamme restreinte.

La lecture des antibiogrammes en milieu gélosé est moins automatisée ; elle nécessite la saisie de l'identification ou la liaison avec un automate d'identification. Cependant, l'adjonction d'un incubateur et une lecture automatisée des boîtes, dont la croissance est suffisante, ont permis une ergonomie plus importante tout en gardant l'avantage d'une plus grande souplesse dans le choix des antibiotiques et des fournisseurs de réactifs.

Les inconvénients des systèmes automatisés en milieux liquides sont inhérents à l'utilisation de ce type de milieux (absence de contrôles de pureté), liés au caractère fermé des automates (réactifs spécifiques, absence de choix des antibiotiques) et à l'impossibilité de modifier le système expert (mise à jour des recommandations du CA-SFM de l'année par exemple). Le principal avantage est de permettre le traitement rapide du flux important des analyses concernant des bactéries à croissance rapide et présentant des profils de résistance connus. En revanche, pour des centres ayant un recrutement avec des isolats moins typiques et plus résistants aux antibiotiques ou pour l'identification de groupes bactériens particuliers (*Burkholderia*, bacilles à Gram positif), l'utilisation respectivement d'un système d'antibiogramme en milieu gélosé ou de méthodes moléculaires est vivement recommandée.

Les systèmes d'identification utilisant la technologie MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight*), apparus récemment, comparent à une base de données le spectre des protéines totales obtenu à partir d'une préparation bactérienne bombardée par un faisceau d'électrons (annexe 5.1), peuvent être couplés aux automates d'antibiogrammes déjà existants. Cette association d'automates nécessite la mise en place de processus permettant d'assurer la traçabilité entre l'identification et l'antibiogramme. Cette traçabilité est

**ANNEXE 5.1**

## La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est une nouvelle technique décrite pour l'identification bactérienne. Cette technique repose sur l'analyse du profil des protéines bactériennes (fig. A).

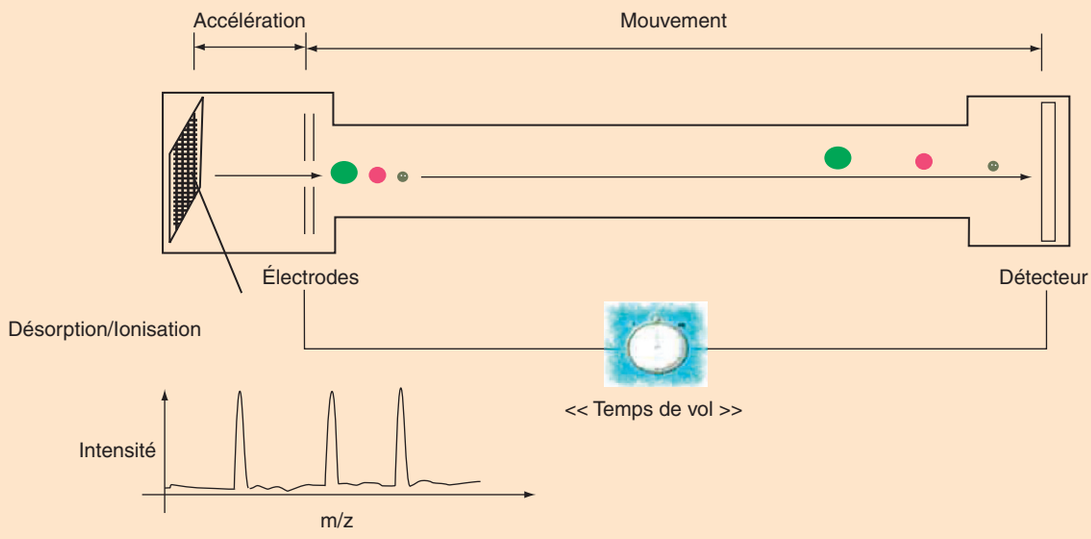



**Fig. A.** – *Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.*
Adapté de : Lottspeich F, Zorbas H, Eds, *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag ; 1998.

La spectrométrie de masse se compose de trois parties distinctes :
• ionisation des molécules, étape la plus importante. Avec la technique MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionisation*) ou désorption laser assistée par la matrice d'inclusion de l'échantillon, le produit à identifier est inclus dans une matrice (l'alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamique ou l'acide sinapinique par exemple) et immobilisé sous forme de cristaux. Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. Les ions gazeux alors générés sont accélérés sous haut voltage dans un champ électrique qui les dirige vers l'analyseur ;
• l'analyseur qui permet de séparer et de classer les ions libres selon leur « temps de vol » ou *time of flight* (TOF) qui dépend du rapport masse/charge (m/Z). Les ions présentant le rapport m/Z le plus petit sont les premiers à arriver ;
• le détecteur qui transforme le courant ionique en courant électrique. Le courant généré est alors amplifié, numérisé et enregistré sous forme de spectres de masse, rapport m/Z en fonction de l'intensité.
Afin de minimiser les interférences pouvant provenir de la collision de particules entre elles, toutes ces opérations sont réalisées dans une enceinte soumise à un vide poussé.

**Identification bactérienne**

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification de bactéries par étude de leurs protéines totales. Le dépôt peut être réalisé sous deux formes : soit on part directement de la culture bactérienne, soit on effectue au préalable une extraction des protéines. Quelle que soit la méthodologie choisie, le dépôt est réalisé sous forme d'une couche mince sur un support puis recouvert de la matrice donneuse d'électron ; le tout sera ensuite bombardé par un faisceau laser. Les spectres sont lus pour des masses comprises entre 2000 et 20 000 Daltons (Da).

Une banque de spectres est construite par plusieurs mesures d'une espèce bactérienne ou d'une souche connue sous différentes conditions de cultures. Un profil moyen est alors obtenu après mesure d'environ 20 spectres. Le logiciel génère automatiquement les listes des pics obtenus de tous les spectres et extrait les pics typiques présents dans un certain nombre de spectres d'une seule espèce.
L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance qui considère la position des pics dont l'intensité est comprise dans une échelle de 1 à 1000. Une fois le spectre obtenu, il est comparé aux spectres de la banque de données en tenant compte de la masse et de l'intensité des pics. Un score d'appariement ou de vraisemblance classe les spectres et précise l'identification bactérienne la plus plausible. Un score supérieur à 2,00 indique une bonne fiabilité de l'identification.
Par cette méthodologie, l'identification bactérienne est obtenue en moins de 2 heures.

**Données actuelles**

Selon les différentes études publiées jusqu'à maintenant, 95 à 97,5 % des bactéries isolées dans les laboratoires de microbiologie sont identifiées correctement à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ces résultats sont comparables à – voire meilleurs que – ceux obtenus avec des automates utilisant des méthodes conventionnelles.
De plus, des études ont aussi montré une bonne corrélation d'identification directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif ou d'une urine dont l'inoculum est supérieur à $10^5$ UFC/ml.
Cette technique peut aussi être utilisée en mycologie, avec notamment l'identification possible des levures et des *Aspergillus*.
Il est à noter que différentes études font état de la possibilité de faire du typage de souche par spectrométrie de masse MALDI-TOF ainsi qu'un génotypage de polymorphisme ponctuel ou SNP (*single nucleotide polymorphism*).

favorisée par la mise en place de logiciels *middleware* qui permettent d'utiliser une même technique d'échange d'informations dans toutes les applications gérées par ces systèmes.

Les modules d'épidémiologie déjà proposés par les fabricants d'automates d'hémocultures, d'identification et d'antibiogrammes seront intégrés à ces logiciels *middleware*.

Les principales caractéristiques des automates d'identification et d'antibiogramme sont résumées dans le tableau 5.4.

## Automates de détection des mycobactéries et étude de la sensibilité aux antibiotiques

L'automatisation et la culture optimisée ainsi que la détection de mycobactéries sont une préoccupation datant des années 1980, avec l'utilisation du semi-automate Bactec TB 460® qui permettait la détection du $CO_2$ radioactif. L'évolution s'est faite vers des détections non radioactives, comme pour les automates d'hémoculture. Aujourd'hui,

**TABLEAU 5-4**

**Principales caractéristiques des automates d'identification et d'antibiogramme.**

| *Automate* | | *Phoenix®* | *Vitek 2®/Vitek2 Compact®* | *WalkAway® 48/76* | *VersaTREK®* |
|---|---|---|---|---|---|
| Fabricant | | Becton Dickinson | bioMérieux | Siemens | TREK Diagnostic systems |
| Année de commercialisation | | 2000 | 2005/1998 | 1999 | |
| Principe de mesure | Identification | Colorimétrie/ fluorescence | Colorimétrie | Colorimétrie/ fluorescence | Fluorescence |
| | Antibiogramme | Turbidimétrie/redox | Turbidimétrie | Turbidimétrie | Fluorescence |
| Identification | Levures | Non | Oui | Oui | Non |
| | *Haemophilus–Neisseria* | Développement | Oui | Oui | Oui |
| | Anaérobies | Développement | Oui | Oui | Oui |
| | Corynébactérie | Oui | Oui | Non | Oui |
| Antibiogramme | Antifongigramme | Développement | Oui | Non | Oui |
| | *Haemophilus* | Non (tests manuels) | Développement | Oui | Oui |
| Fréquence de mesure | | 20 minutes | 15 minutes | Point final | 24 minutes |
| Incubation | | Intégré | Intégré | Intégré | Intégré |
| Taille inoculum | | 0,5 MacFarland | 0,5 MacFarland | 0,5 MacFarland | 0,5 MacFarland |
| Lecture visuelle des panels | | Oui (sauf fluorescence) | Non | Oui, plaque chromogénique | 24 minutes |
| Présentation | | Galerie | Carte | Microplaque | Microplaque |
| Réactif additionnel pour identification | | Non | Non | Manuel/automatique | Non |
| Identification | Préparation | Manuelle | Manuelle | Manuelle | Manuelle |
| | Inoculation | Manuelle | Automatique | Manuelle | Automatique |
| Antibiogramme | Concentration/ antibiotique | 3 à 10 concentrations | 3 à 4 concentrations pour 5 à 7 CMI | 2 à 10 concentrations | 2 à 8 concentrations |
| | Préparation suspension | Manuelle | Manuelle | Manuelle | Manuelle |
| | Inoculation | Manuelle | Automatique | Manuelle | Manuelle |
| | Valeur CMI/antibiotique | CMI vraies. S/I/R | CMI calculée. S/I/R | CMI vraies. S/I/R | CMI vraies. S/I/R |

(*Suite*)

**TABLEAU 5-4**

**Suite.**

| *Automate* | *Phoenix®* | *Vitek 2®/Vitek2 Compact®* | *WalkAway® 48/76* | *VersaTREK®* |
|---|---|---|---|---|
| Support identification/antibiogramme | Séparé et combo | Séparé | Séparé et combo | Séparé |
| Inoculum bactérien commun aux galeries identification/ antibiogramme | Oui | Oui, dilution automatique entre identification et antibiotique | Oui | Oui |
| Système expert | BDXpert | Advanced Expert System | SIR | 2X Swin |
| Principe du système expert | CMI vraie : premier point de concentration d'antibiotique où le germe n'a pas poussé | Base de données, sur les valeurs de CMI | Fondé sur une lecture vraie, CMI brute lue par l'automate interprétation CA-SFM SIR : alarmes et corrections automatiques | CMI vraie : premier point de concentration d'antibiotique où le germe n'a pas poussé |

**TABLEAU 5-5**

**Principales caractéristiques des automates d'ensemencement à partir des produits pathologiques.**

| *Automates* | *Innova®* | *Prévisola®* | *WASP®* | *InoqulA®* |
|---|---|---|---|---|
| Fabricant | Becton Dickinson | bioMérieux | Copan | Kiestra |
| Type de récipients | Tube, cônes (5 à 50 ml) | Tube, cônes (5 à 50 ml) | Tube, cônes (5 à 50 ml) | Tube, cônes (5 à 50 ml) |
| Carrousel de boîte de Petri | 9 | 6 | 6 | 5 |
| Magasin échantillon | 5 | 5 | 1 | 8 |
| Ensemencement bi-boîte | Oui | Oui | Oui | Oui |
| Système d'ensemencement | Öses | Peigne (consommable) | Öses | Bille magnétique |
| Profils d'ensemencement | Multiple | Unique | Multiple | Multiple |
| Confection de frottis | Non | Non | Oui | Non |

trois automates permettent une détection automatisée. Pour deux d'entre eux (Bact'Alert®, bioMérieux ; VersaTREK®, Magellan), les flacons spécifiques à la culture des mycobactéries (hémocultures et autres prélèvements) sont introduits dans des automates utilisés pour les hémocultures classiques qui peuvent recevoir indifféremment ces deux types de flacon. Le système de détection MGIT® (Becton Dickinson) est un système dédié à la recherche de mycobactéries dans tous les prélèvements excepté les hémocultures ou les liquides hémorragiques. L'utilisation de flacons spécifiques d'hémocultures nécessite le recours à un automate de la gamme Bactec 9000®.

Ces systèmes permettent une détection plus précoce que les méthodes en milieux solides (en moyenne 12 versus 21 jours). Ces milieux sont compatibles avec l'utilisation de méthodes phénotypiques (détection de l'antigène MPT64) ou moléculaires d'identification (amplification génique suivie d'une hybridation sur support solide).

Les fabricants proposent également des coffrets de réactifs pour réaliser l'étude de la sensibilité aux antituberculeux qui nécessite 10 jours supplémentaires pour obtenir les résultats.

## De l'automate d'ensemencement à la chaîne robotisée

Avant de concevoir des chaînes automatisées complètes de l'analyse bactériologique, l'ensemencement est la dernière grande étape à automatiser. Un des défis à résoudre est de pouvoir ensemencer des prélèvements variés, liquides, solides, reçus dans des récipients également variés nécessitant des cultures semi-quantitatives ou simplement qualitatives.

Les automates d'ensemencement permettent d'éviter la répétition des tâches. Les prélèvements sont ensemencés par différents moyens (öse, peigne, bille magnétique) à partir d'une grande variété de récipients. Différents programmes, pour certains appareils (Innova®, Becton Dickinson ; InnoqiA®, Kiestra ; WASP®, Coplan), permettent de choisir le schéma d'isolement. Les prélèvements obtenus par écouvillonnage sont déchargés préalablement dans un milieu liquide ou, mieux, en utilisant des systèmes comportant un milieu de transport liquide et un écouvillon sécable (eSwab®, Coplan, Becton Dickinson). Une des limites de ces systèmes est leur impossibilité à traiter des prélèvements précieux de faible volume comme les LCR qui nécessitent une intervention humaine. Certains échantillons également précieux (osseux par exemple), nécessitant un broyage préalable avec des dispositifs spéciaux dans des conditions d'asepsie rigoureuse imposent une étape technique manuelle.

L'automatisation de l'ensemencement ainsi réalisée et la confection de frottis à partir des produits pathologiques sont les deux étapes initiales qui peuvent ouvrir la perspective de réaliser une automatisation quasi complète d'une grande majorité des étapes de l'analyse bactériologique. L'incubation avec des étuves équipées de détecteurs de croissance, des analyseurs d'images des échantillons cliniques colorés (Gram, MGG) et le repiquage de colonies isolées par des automates couplés à un spectromètre de masse et des analyseurs chargés des antibiogrammes compléteront cette évolution vers une automatisation plus aboutie. Les caractéristiques des automates d'ensemencement sont résumées dans le tableau 5.5.

## Perspectives et conclusions

L'évolution vers une automatisation des étapes techniques va entraîner une évolution des profils des postes

techniques. Une expertise humaine des prélèvements (adéquation prescription–prélèvement) avant l'introduction dans ces chaînes automatisées est nécessaire. Cette expertise humaine sera également nécessaire lors de l'étape de la sélection des colonies dont l'analyse est pertinente et doit être poursuivie afin d'éviter la production de résultats inutiles coûteux, sans valeur ajoutée pour le clinicien et par conséquent pour le patient.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Bernier M, Catelain F, Phillipon A. Place des nouveaux automates dans un laboratoire de bactériologie. Rev Fr Lab 2001 ; 335 : 49–56.

Carroll KC, Weinstein MP. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed Washington DC : ASM Press ; 2009. p. 192–217.

Courvalin P, Flandrois JP, Goldstein F, Quentin C, Sirot J. L'antibiogramme automatisé. Paris : Vigot ; 1988.

Croize J, Reculé C, Pelloux I, Chanteperdrix V, Maurin M. L'automatisation en bactériologie : un challenge continu. L'expérience du centre hospitalier universitaire de Grenoble. Spectra Biologie 2007 ; 160 : 45–51.

Goldstein F, Nguyen Van JCA. L'antibiogramme automatisé : des progrès mais pas de miracles ! Biotribune 2006 ; 19 : 13–6.

Richter SS, Ferraro MJ. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC : ASM Press ; 2009. p. 245–56.

CHAPITRE

6

# Stérilisation

A. Cubertafond, M. Mounier, F. Denis

La stérilisation a deux objectifs :

- la destruction de tous les micro-organismes ;
- la conservation de l'état stérile du dispositif médical ou autre matériel stérilisé jusqu'à son utilisation, tout en respectant son intégrité.

« Pour qu'un dispositif médical ayant subi une stérilisation puisse être étiqueté "stérile", la probabilité théorique qu'un micro-organisme viable soit présent doit être inférieure ou égale à 1 pour $10^6$ » (arrêté Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière [BPPH] du 22 juin 2001).

La stérilisation à la vapeur d'eau sous pression est la technique de référence pour les dispositifs médicaux réutilisables dans les établissements de santé. Elle est utilisée chaque fois que la nature du dispositif médical le permet.

Le plus ancien autoclave utilisé a été construit en 1880, à la demande de Charles Chamberland, pour stériliser les bouillons de culture. C'est seulement l'année suivante que le Dr Redard a adapté l'appareil pour « les instruments de chirurgie et les objets de pansements ».

Déjà en 1851, Raymond Chevallier Appert avait eu l'idée de « stériliser » dans un autoclave en utilisant un manomètre à mercure pour suivre l'évolution de la pression dans l'appareil. Mais c'est à Denis Papin que l'on doit l'invention de la soupape à contrepoids, sans laquelle les récipients chauffés seraient inexorablement condamnés à exploser.

Depuis, la stérilisation n'a cessé de prendre une place primordiale dans les établissements de santé ; l'obtention de l'état stérile et son maintien constituent une obligation de résultat. La stérilisation est un procédé spécial dont le résultat ne peut pas être contrôlé a posteriori sur le produit fini, ce qui impose la validation des procédés de stérilisation avant leur mise en application, le pilotage continu des opérations et le respect de procédures.

## Indications

Dans les laboratoires de microbiologie, la stérilisation reste d'actualité, même si elle ne concerne à l'heure actuelle que très peu de matériel :

- les milieux de culture : ils sont disponibles stériles dans l'industrie ;
- les dispositifs médicaux : ce sont ceux utilisés pour réaliser les prélèvements chez les patients. Ce peut être par exemple des spéculums, des curettes, des pinces, des ciseaux, etc. Pour la plupart, ils sont commercialisés à usage unique stériles ; l'usage unique est dans tous les cas à privilégier ; la réutilisation et donc la restérilisation de ces dispositifs médicaux sont interdites. S'ils sont réutilisables, ils suivent les mêmes règles que ceux des services de soins : la stérilisation doit impérativement se faire conformément à la réglementation. Autrement dit, ils doivent être stérilisés dans des structures spécialisées et agréées, comme les stérilisations centralisées des établissements de santé, unités faisant partie des pharmacies à usage intérieur ;
- du matériel divers, type verrerie.

Il faut noter l'usage très spécifique dans les laboratoires de la stérilisation à la vapeur d'eau pour « neutraliser » les déchets issus des cultures et/ou des produits pathologiques. Le stérilisateur utilisé ne sera pas le même que celui affecté à la stérilisation des dispositifs médicaux. Cette pratique, qui diminue le risque infectieux sans le supprimer, ne dispense en aucun cas de l'obligation réglementaire de l'élimination des déchets à risque infectieux par la filière des DASRI (déchets d'activité de soins à risque infectieux). Elle permet toutefois de reclasser les déchets qui relèvent des risques infectieux 3 et 4 vers un risque infectieux plus faible, ce qui permet leur transport dans des emballages de groupe II (étanches, rigides, aptes à recueillir les liquides), au lieu du triple emballage spécifique pour ces déchets.

## Définitions

**Stérilisation :** c'est la mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer (destruction) tous les micro-organismes vivants de quelque nature et sous quelque forme que ce soit, portés par un objet parfaitement nettoyé. Elle repose sur une méthode efficace vis-à-vis de tous les micro-organismes, sans altération du matériel ou produit à stériliser. De plus, un conditionnement perméable à l'agent stérilisant doit permettre le maintien de la stérilité du produit.

**État stérile** : absence de micro-organismes vivants.

## Étapes préliminaires de la stérilisation

On admet qu'un procédé de stérilisation doit être tel que la probabilité d'avoir une unité non stérile soit inférieure à $10^{-6}$, c'est-à-dire que la contamination doit être réduite d'au moins 6 logs.

De ce fait, l'efficacité des méthodes de stérilisation dépend du nombre initial de micro-organismes. Or un

dispositif médical réutilisable est potentiellement très contaminé. Cela explique que la stérilisation comporte une succession d'étapes pour obtenir et maintenir à l'état stérile ce dispositif médical.

Les étapes préliminaires à la stérilisation proprement dites visent à réduire au maximum cette contamination microbienne, mais aussi à diminuer « les contaminations chimiques et particulaires ainsi que la présence de substances pyrogènes » (BPPH).

Par ailleurs, les paramètres des cycles de stérilisation sont conçus pour donner une valeur stérilisatrice correspondant à une sur-stérilisation.

Les étapes respectent le principe de la marche en avant et sont successivement :

- la prédésinfection ;
- le nettoyage ;
- le conditionnement ;
- la stérilisation proprement dite ;
- le stockage et le transport.

Des contrôles sont en place à chacune de ces étapes et donnent lieu à une traçabilité.

« En dehors de la pré-désinfection, ces opérations sont obligatoirement mises en œuvre par la pharmacie à usage intérieur dans des locaux affectés à cette activité et visés dans l'autorisation d'ouverture de la pharmacie à usage intérieur pour cette activité » (BPPH).

## Prédésinfection

C'est « le premier traitement à effectuer sur les objets et matériels souillés dans le but de diminuer la population de micro-organismes et de faciliter le nettoyage ultérieur » (Afnor, Guide pour le nettoyage, la décontamination et la stérilisation des instruments de chirurgie).

La prédésinfection a aussi pour but de protéger le personnel lors de la manipulation des dispositifs médicaux et l'environnement.

Ce prétraitement se fait le plus rapidement possible, au plus près du lieu d'utilisation ; il est impératif d'éviter le séchage des souillures sur le matériel.

C'est un procédé chimique utilisant un produit :

- bactéricide, fongicide, virucide ; l'activité sur les mycobactéries n'est pas obligatoirement demandée ;
- détergent ;
- sans aldéhydes ;
- peu nocif pour le personnel et le matériel ;
- facile d'emploi ;
- biodégradable.

Après avoir préparé la solution de prédésinfection en diluant le produit selon les recommandations du fabricant, les dispositifs médicaux seront complètement immergés, sans bulle d'air et disposés de façon à assurer le meilleur contact avec le produit (les instruments seront ouverts ou démontés si possible) ; le temps d'immersion sera scrupuleusement respecté.

L'immersion sera suivie d'un rinçage abondant à l'eau du réseau.

Les dispositifs sont alors transportés dans les locaux de la stérilisation en utilisant des bacs fermés qui seront ensuite eux-mêmes nettoyés.

## Nettoyage

Le nettoyage suit obligatoirement la phase de prédésinfection.

Il se fait dans un laveur-désinfecteur ; le nettoyage manuel est à éviter car il est moins performant et polluant.

Il a pour but d'éliminer les salissures par l'action de quatre paramètres : l'action mécanique, l'action chimique d'un détergent, la température et le temps.

Les laveurs-désinfecteurs sont des équipements périodiquement contrôlés lors de qualifications et de maintenances. Ils répondent aux exigences de la norme NF EN ISO 15883. Un enregistrement des paramètres tout au long du cycle est obligatoire.

Le cycle de nettoyage doit obligatoirement être terminé par une phase de séchage.

À ce stade, la vérification du matériel est indispensable pour ne stériliser que du matériel propre, sec et fonctionnel.

## Conditionnement

L'état stérile est un état éphémère qui doit être maintenu par un emballage adapté (conditionnement) (fig. 6.1).

Les dispositifs médicaux doivent être conditionnés sans délai après le nettoyage dans un emballage qui doit :

- maintenir le niveau de propreté obtenu après nettoyage ;
- permettre le contact avec l'agent stérilisant ;
- être compatible avec le procédé de stérilisation ;
- assurer le maintien de la stérilité jusqu'à l'utilisation ;
- permettre l'extraction aseptique du matériel ;
- participer au maintien des caractéristiques du matériel.

Dans le cadre d'un laboratoire de microbiologie, le conditionnement utilisé est de type sachets à usage unique en papier et en film plastique thermosoudables. Il comporte obligatoirement un indicateur de passage et il répond aux critères de la norme NF EN ISO 11607.

Le conditionnement se fait dans une zone propre de classe ISO 8.

## Stérilisation

La « méthode de stérilisation choisie tient compte de la nature du dispositif médical, et des recommandations du fabricant ».

Fig. 6.1. – *Exemple de conditionnement en sachet en film plastique thermosoudé.*

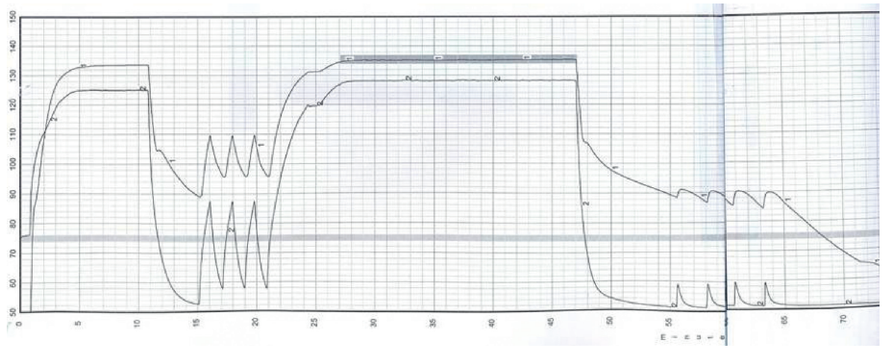


Fig. 6.2. – *Évolution de la pression et de la température au cours d'un cycle de stérilisation à l'autoclave.*

La stérilisation par la vapeur d'eau est la méthode de référence. C'est elle qui sera utilisée pour le matériel d'un laboratoire de microbiologie. Chaque fois que possible, on utilise une vapeur d'eau saturée à 134 °C pendant une durée de palier de stérilisation d'au moins 18 minutes.

La vapeur d'eau diffuse dans toute la cuve du stérilisateur ; elle est toujours à une température plus élevée que l'objet à stériliser, ce qui entraîne une condensation et des transferts d'énergie qui assurent la destruction des microorganismes ; le principe de la réaction est une hydrolyse des chaînes peptidiques.

Pour être en tous points en contact avec les produits à stériliser, la vapeur d'eau doit remplacer l'air naturellement contenu dans la cuve. L'air est donc au préalable chassé grâce à une succession de vides alternant avec des injections de vapeur. Vient ensuite le palier de stérilisation suivi d'une phase de séchage en dépression au cours de laquelle on réinjecte en petites quantités de la vapeur pour vaporiser l'eau qui s'est condensée (fig. 6.2).

Les stérilisateurs à la vapeur d'eau répondent à la norme NF EN ISO 17665-1 ; les petits stérilisateurs à la vapeur d'eau dont le volume de la chambre est inférieur ou égal à 60 litres font l'objet d'une norme spécifique, la norme NF EN 13060, et d'une information de l'Afssaps de décembre 2005.

Tous les stérilisateurs doivent subir des contrôles lors de l'installation (qualification), à intervalles réguliers (requalification), des maintenances préventives et des « contrôles de routine » :

- qualification de l'installation, ou réception administrative et essai sur site ;
- qualification opérationnelle : elle permet de vérifier que la pénétration de la vapeur dans des charges types soit homogène et reproductible ; elle est réalisée avec un ensemble de sondes de température et de pression, relié à un dispositif d'acquisition de données. Les sondes doivent être étalonnées par rapport à un système étalon national certifié ;
- requalification au moins annuelle, plus souvent s'il y a une modification de l'appareil par exemple ;
- maintenance préventive suivant une périodicité définie par le fabricant ;
- contrôles de routine : test de vide (ou d'absence de fuite) à faire à périodicité définie, test de pénétration de vapeur (dit essai de Bowie-Dick) à réaliser tous les jours.

Chaque cycle de stérilisation doit être contrôlé avant que le matériel ne soit distribué à l'utilisateur. On vérifie :

- le choix du cycle ;
- la géométrie du cycle et les paramètres grâce au diagramme d'enregistrement ou à un rapport de supervision ;
- le virage des indicateurs de passage de chaque conditionnement ;
- le changement de couleurs des indicateurs physicochimiques s'ils sont utilisés. Dans ce cas, ils sont répartis à différents endroits prédéfinis dans la charge et ils doivent changer de couleur conformément aux indications du fabricant ;
- la siccité et l'intégrité des emballages.

La charge n'est libérée que si l'ensemble des contrôles est conforme ; un seul contrôle défaillant doit amener à refuser la charge qui doit alors être reconditionnée et restérilisée après avoir identifié l'origine de la non-conformité.

## Traçabilité

### *Étiquetage*

Quand une charge est déclarée conforme, chaque matériel est étiqueté après un contrôle individuel.

Cette étiquette permet la traçabilité du produit stérile. Elle indique le nom du produit et éventuellement du service utilisateur, l'identification du stérilisateur et le numéro du cycle, un numéro de lot, la date de stérilisation et la date limite d'utilisation (fig. 6.3).

### *Dossier de stérilisation*

Tous les documents relatifs aux contrôles effectués à toutes les étapes du traitement des dispositifs médicaux sont rassemblés dans un dossier de stérilisation daté, signé et archivé 5 ans.

La traçabilité est une obligation réglementaire.

Fig. 6.3. – *Exemple de matériel stérilisé avec étiquette de traçabilité.*

## Transport et stockage

Les produits stériles doivent être livrés et stockés après avoir été mis dans un emballage de transport qui peut être soit un sachet plastique, soit un bac de protection hermétique et régulièrement entretenu.

Une zone de stockage spécifique est dédiée aux produits stériles ; le stockage se fait à l'abri de la lumière solaire directe, de l'humidité et de contaminations de toutes natures. Les conditionnements ne doivent pas être entassés ou repliés.

Quelle que soit la durée de validité, tout dispositif médical dont le conditionnement a perdu son intégrité doit être considéré comme non stérile.

## Autres méthodes de stérilisation

- L'utilisation de la chaleur sèche est prohibée (BPPH).
- La stérilisation à l'oxyde d'éthylène est en voie de disparition dans les établissements de santé ; elle était réservée aux dispositifs médicaux thermosensibles.
- La stérilisation à basse température (45 à 50 °C) par le peroxyde d'hydrogène prend la place de la stérilisation à l'oxyde d'éthylène et s'adresse aussi aux dispositifs médicaux thermosensibles.
- La stérilisation par rayonnements ionisants est un procédé exclusivement utilisé dans l'industrie.
- La stérilisation par filtration est utile pour les produits liquides ne supportant pas la chaleur. Elle s'effectue dans des conditions d'asepsie rigoureuse, avec des filtres prêts à l'emploi, stériles et un recueil du liquide filtré dans des récipients stériles.
- La pasteurisation, procédé inventé par Pasteur en 1856 pour détruire les bactéries dans le vin, ne répond pas à la définition de la stérilisation.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Cubertafond A, Mounier M, Denis F. Stérilisation. In : Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E, Quentin R, editors. Bactériologie médicale. Paris : Elsevier Masson ; 2007. p. 71–5.

Guide de bonnes pratiques. Désinfection des dispositifs médicaux. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité ; 1998.


**NORMES**


Arrêté du 22 juin 2001 relatif aux bonnes pratiques de pharmacie hospitalière. JO 3 juillet 2001 ; n° 152.

Arrêté du 3 juin 2002 relatif à la stérilisation des dispositifs médicaux. JO 11 juin 2002 ; n° 134.

Décret 2002-587 du 23 avril 2002 relatif au système permettant d'assurer la qualité de la stérilisation des dispositifs médicaux dans les établissements de santé et les syndicats interhospitaliers. JO 26 avril 2002 ; n° 98.

FDS 98-135 : stérilisation des dispositifs médicaux. Guide pour la maîtrise des traitements appliqués aux dispositifs médicaux réutilisables. Avril 2005. (Indice de classement S98–135).

Information Afssaps du 27 décembre 2005. Informations et recommandations relatives aux petits stérilisateurs à la vapeur d'eau. http://agmed.sante.gouv.fr/htm/1/grtrav/atnc/rptsteri.pdf.

NF EN 13060+A2 : Petits stérilisateurs à la vapeur d'eau. Avril 2010. (Indice de classement S98–20).

NF EN ISO 17665-1 et 2. Stérilisation des produits de santé – chaleur humide : exigences pour le développement, la validation et le contrôle de routine d'un procédé de stérilisation des dispositifs médicaux. 2006 et 2009. (Indice de classement S98–105–1 et S98–105–2).

CHAPITRE 7

# Informatique et laboratoire de bactériologie

C. Martin

## Généralités

La place de l'informatique dans le laboratoire de biologie, et en particulier de bactériologie, prend une part grandissante. Depuis 2007, une loi impose (loi Hôpital, patients, santé et territoires [HPST]) à tout laboratoire de biologie médicale privé ou public d'être accrédité Cofrac (Comité français d'accréditation) selon la norme ISO 15189. Cette norme est spécifique au domaine de la santé humaine et utilise un référentiel propre à ce domaine. Cette accréditation est une reconnaissance des compétences techniques. À l'horizon 2013, tout laboratoire devra démontrer qu'il a entrepris une démarche d'accréditation et, en 2016, tous les laboratoires publics ou privés de France devront être accrédités ISO 15189. Les champs abordés par la loi et les domaines d'application de la norme sont vastes (non-conformité des prescriptions et des prélèvements, gestion de la documentation, métrologie, gestion des stocks et des commandes, etc.), mais ils peuvent être gérés par des logiciels indépendants du SIL (système informatique de laboratoire) encore appelé SGL (système de gestion de laboratoire). Les particularités des analyses de bactériologie sont une automatisation moins avancée et des délais de réponse plus longs que pour les autres disciplines de la biologie et une intervention humaine (orientation et interprétation des analyses). L'ensemble de ces étapes techniques (tests d'orientation, colonies considérées comme contaminantes ou souillures, etc.) et les résultats intermédiaires qui ne figurent pas dans le compte-rendu final devront être tracés. Certains des résultats intermédiaires temporaires doivent cependant être mis à la disposition des services cliniques via un serveur de résultats afin que ceux-ci connaissent l'état d'avancement de l'analyse.

Les analyses microbiologiques en général nécessitent la connaissance du contexte clinique dans lequel les recherches sont effectuées. Une liaison avec le logiciel de gestion du dossier patient est un moyen de bénéficier des renseignements cliniques. Cependant, des paramétrages sont nécessaires pour permettre la communication entre les différents logiciels (dossier patient, prescriptions, gestion du mouvement des patients, etc.). De la même manière, des modules de prescriptions connectées au lit du malade (intégrés ou non au logiciel dossier patient) sont un moyen d'avoir une prescription sécurisée avec la présence des renseignements cliniques. La consultation des résultats biochimiques, hématologiques ou autres nécessaires à l'interprétation ou à la compréhension d'un cas clinique est possible dans les logiciels actuels.

Sur le plan technique, le laboratoire de bactériologie présente cependant certaines particularités. Ces particularités se situent à plusieurs niveaux. À l'échelon de la gestion des analyses, la formulation des résultats concernant l'aspect, la cytologie et les cultures nécessite des formats multiples (alphanumérique et numérique). Ces spécificités sont également retrouvées au niveau de l'antibiogramme (alphanumérique pour la catégorisation en S, I ou R, numérique pour les CMI). De plus, la notion d'expertise du résultat peut complexifier les données en prenant en compte les résultats bruts et après expertise par le microbiologiste ou par un système expert. Ces spécificités doivent donc être prises en considération par les logiciels de gestion d'analyses des laboratoires.

Une autre particularité des laboratoires de bactériologie est qu'ils génèrent de nombreuses données qui peuvent être exploitées d'un point de vue épidémiologique, par exemple les alertes de bactéries multirésistantes, les alertes épidémiques ou les suspicions d'infections nosocomiales concernant certains pathogènes qui doivent être transmises en temps réel à l'unité d'hygiène et au comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) (fig. 7.1).

D'un point de vue général, l'informatique des laboratoires a des spécificités qui nécessitent un dialogue entre référents des laboratoires et personnels de l'informatique pour un paramétrage optimal. Des problèmes demeurent notamment dans le cas d'un changement de système informatique où les données ne sont transférées au nouveau système et ne sont accessibles qu'à travers des systèmes d'archivages non interactifs.

## Gestion du laboratoire

Les principales tâches d'un système de gestion informatique des analyses sont décrites brièvement et chronologiquement en soulignant les spécificités liées au laboratoire de bactériologie (hors sérologie) et d'hygiène (fig. 7.2).

### Enregistrement de la demande

L'enregistrement des prescriptions peut être réalisé par saisie au clavier, par un scanneur lors de l'arrivée du prélèvement ou par prescription connectée avec arrivée différée du prélèvement accompagné ou non d'une fiche éditée par le service. Dans tous les cas, le système doit pouvoir

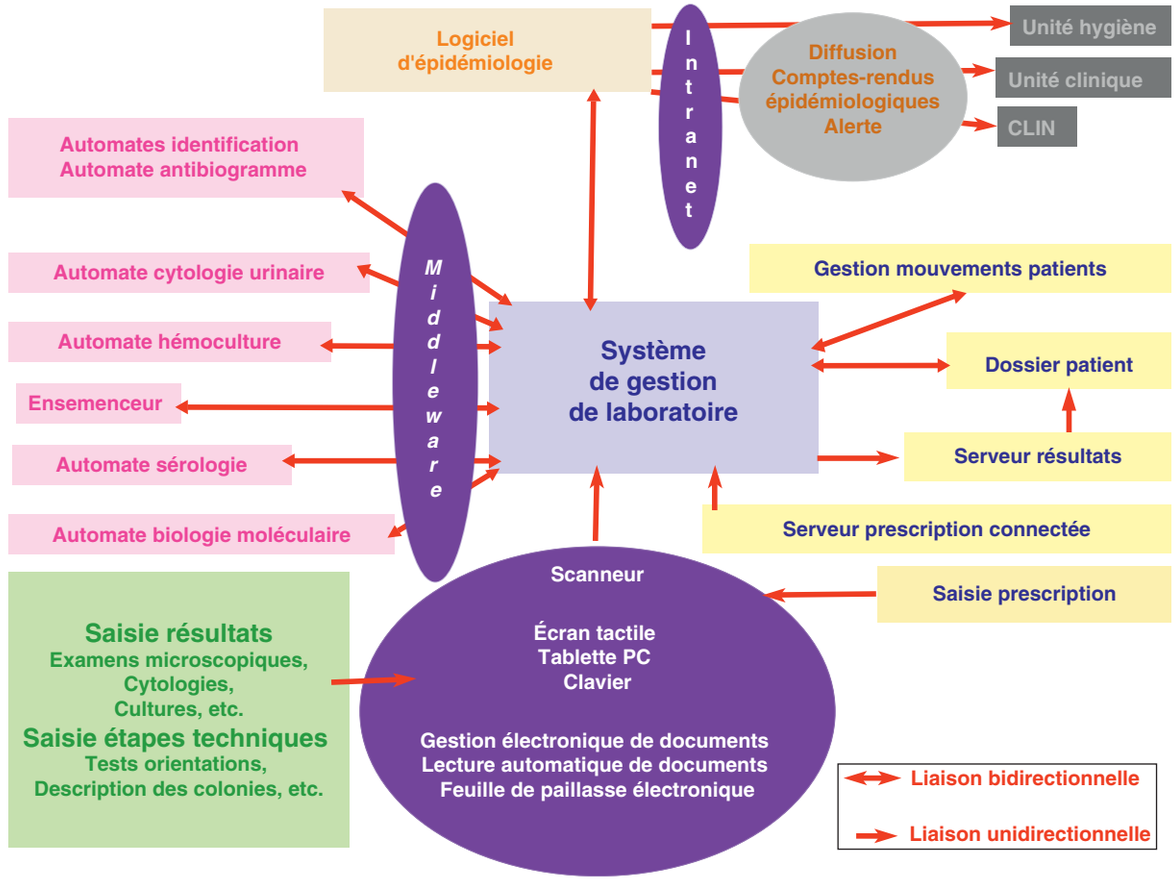



Fig. 7.1. – *Schéma organisationnel des logiciels impliqués dans la production de résultats de bactériologie.*

récupérer auprès du système les mouvements des patients. L'identification du patient doit comporter un numéro unique identifiant le patient (identifiant permanent du patient [IPP]) et un numéro de séjour (date d'entrée, durée et mouvements durant le séjour) nécessaire pour la détection des infections nosocomiales. L'avantage des saisies à l'aide d'un scanneur est d'éviter les erreurs de saisie par l'utilisation de codes barres patients et d'unités fonctionnelles, et de standardiser le libellé des analyses prescrites (une case à cocher). À l'arrivée du prélèvement, un code barre du numéro d'analyse est collé sur la demande. Un exemple de feuille de prescription est présenté à la figure 7.3A.

La prescription connectée à partir d'un logiciel spécifique ou directement à partir du dossier patient est possible dès maintenant sur certains sites.

## Création et édition des feuilles de travail

Suivant l'organisation du laboratoire, on procède à l'édition de listes de travail par types de prélèvements (urinaires, respiratoires, liquides de ponction, hémocultures, etc.) ou bien à l'édition d'une feuille de travail spécifique à l'analyse (regroupement des analyses de services ayant des activités similaires ou complémentaires par paillasse). Dans le cas de l'enregistrement des prescriptions à l'aide d'un scanneur, il est possible d'avoir au recto le fac-similé de la demande et au verso une maquette ou fiche de travail spécifique de l'analyse (ECBU, hémoculture, coproculture, etc.) (fig. 7.3B). Cette fiche paramétrable (évolutive) et adaptée au laboratoire accompagnera le prélèvement puis l'analyse dans les pièces techniques jusqu'à la validation.

## Enregistrement des résultats

Les résultats de la cytologie quantitative et qualitative et de l'examen direct peuvent être saisis au clavier avec l'aide de codes si l'ensemble des données sont négatives, mais également à l'aide du scanneur (liste de travail ou maquette unitaire). Dans le cas de maquette unitaire, les résultats acquis au fur et à mesure de l'analyse (cytologie, examen direct, antigènes solubles, recherche de toxines, culture) sont cochés puis saisis par le scanneur. Les résultats de l'antibiogramme et de l'identification sont le plus souvent transmis par les automates après expertise (lecture interprétative) vers le système informatique et intégrés à l'analyse. La transmission des résultats au SGL des antibiogrammes et des identifications provenant

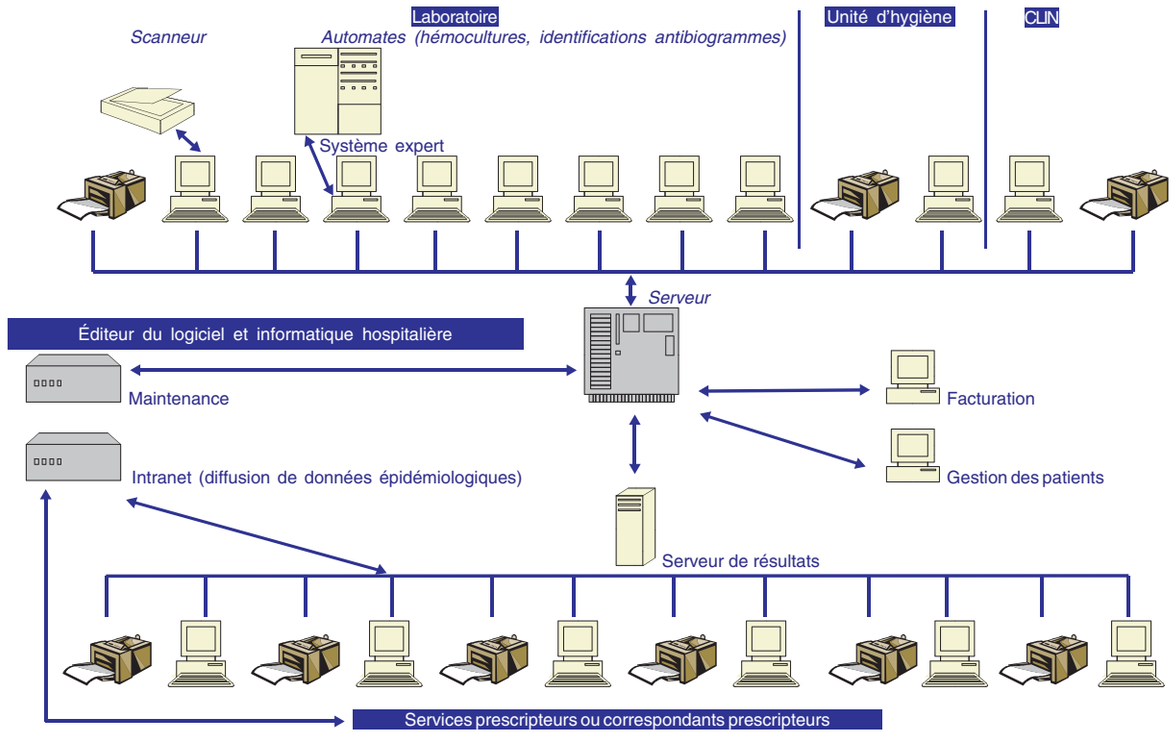



**Fig. 7.2.** – *Exemple d'un schéma de réseau informatique dans un laboratoire de bactériologie.*

des automates peut être soumise à des règles de transfert avant l'incorporation au dossier et la validation technique. Ces logiciels d'expertise placés à l'interface automates–SGL intègrent également des modules d'épidémiologie et d'alerte (surveillances des bactéries multirésistantes et infections nosocomiales). Il est possible bien sûr de saisir l'antibiogramme à l'aide du clavier ou d'un scanneur.

Des systèmes de lecture automatique de documents permettent la création et l'édition des feuilles de travail et l'enregistrement des résultats en évitant la saisie clavier par une lecture scanner et un décodage qui, sur certains systèmes, est suivi d'une gestion électronique de documents qui conserve l'image de tout document. Une évolution plus récente permet une gestion *paperless* par l'intermédiaire d'une feuille de paillasse électronique de la bactériologie. Des modules *paperless* sont également disponibles dans certains SGL adaptés à la microbiologie.

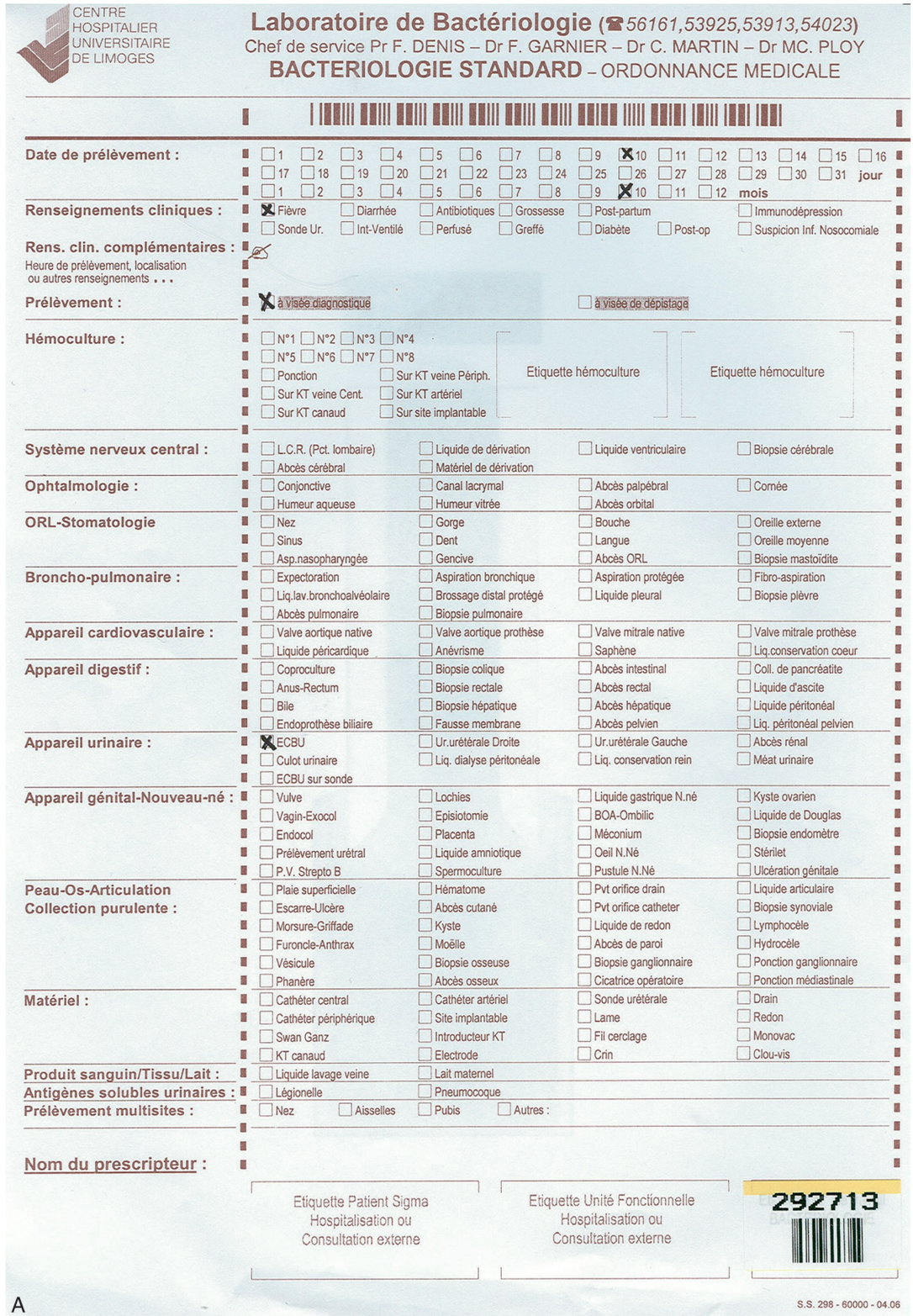
Des logiciels appelés *middleware* permettent des échanges d'informations entre différentes applications informatiques. Le réseau ainsi créé met en œuvre une même technique d'échange d'informations dans toutes les applications impliquées. Les logiciels *middleware* assurent la communication entre les applications quels que soient les ordinateurs impliqués, les caractéristiques logicielles, et les systèmes d'exploitation impliqués. Ces logiciels *middleware* sont utilisés pour relier des applications informatiques variées des systèmes d'information en s'assurant de la connectivité (connexion aux instruments, aux systèmes d'information du laboratoire, aux réseaux), et pour apprécier la gestion des flux de travail afin d'améliorer les temps de rendu de résultats.

Les responsables et techniciens de laboratoire pourront travailler à partir d'un tableau de bord qui donnera une vue d'ensemble de tous les tests réalisés dans le laboratoire. Il leur sera donc possible d'adapter les ressources pour anticiper les éventuels goulots d'étranglement et améliorer l'efficacité. Le logiciel enverra également des alertes en temps réel pour donner des informations de première importance, sur l'augmentation ou la fréquence anormalement élevée des résistances bactériennes par exemple, afin que les hôpitaux et cliniques puissent mettre rapidement en place des mesures de prévention et de contrôle spécifiques.

## Validation

La validation technique des résultats peut être réalisée à l'écran par séries, par listes de travail ou analyse par analyse. Les commentaires microbiologiques et thérapeutiques doivent pouvoir être intégrés à ce moment. De même, des masques ou filtres d'impression peuvent être mis œuvre pour éviter la prescription d'antibiotiques inducteurs de pression de sélection.

La validation biologique nécessite l'utilisation d'un code secret. Celle-ci pourra également être réalisée par séries, par listes de travail (sérologie, culture négative par exemple) ou analyse par analyse (dossier comportant un antibiogramme). Les connexions sont sécurisées et la confidentialité est assurée à l'aide de cartes à puces ou



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE LIMOGES

**Laboratoire de Bactériologie** (☎ *56161,53925,53913,54023*)

Chef de service Pr F. DENIS – Dr F. GARNIER – Dr C. MARTIN – Dr MC. PLOY

**BACTERIOLOGIE STANDARD** – ORDONNANCE MEDICALE

**Date de prélèvement :** 1 2 3 4 5 6 7 8 9 **X**10 11 12 13 14 15 16 / 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 **jour** / 1 2 3 4 5 6 7 8 9 **X**10 11 12 **mois**

**Renseignements cliniques :** **X** Fièvre ; Diarrhée ; Antibiotiques ; Grossesse ; Post-partum ; Immunodépression / Sonde Ur. ; Int-Ventilé ; Perfusé ; Greffé ; Diabète ; Post-op ; Suspicion Inf. Nosocomiale

**Rens. clin. complémentaires :** Heure de prélèvement, localisation ou autres renseignements . . .

**Prélèvement :** **X** à visée diagnostique ; à visée de dépistage

**Hémoculture :** N°1 N°2 N°3 N°4 / N°5 N°6 N°7 N°8 ; Ponction ; Sur KT veine Périph. ; Sur KT veine Cent. ; Sur KT artériel ; Sur KT canaud ; Sur site implantable — Etiquette hémoculture — Etiquette hémoculture

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Système nerveux central :** | L.C.R. (Pct. lombaire) | Liquide de dérivation | Liquide ventriculaire | Biopsie cérébrale |
| | Abcès cérébral | Matériel de dérivation | | |
| **Ophtalmologie :** | Conjonctive | Canal lacrymal | Abcès palpébral | Cornée |
| | Humeur aqueuse | Humeur vitrée | Abcès orbital | |
| **ORL-Stomatologie** | Nez | Gorge | Bouche | Oreille externe |
| | Sinus | Dent | Langue | Oreille moyenne |
| | Asp.nasopharyngée | Gencive | Abcès ORL | Biopsie mastoïdite |
| **Broncho-pulmonaire :** | Expectoration | Aspiration bronchique | Aspiration protégée | Fibro-aspiration |
| | Liq.lav.bronchoalvéolaire | Brossage distal protégé | Liquide pleural | Biopsie plèvre |
| | Abcès pulmonaire | Biopsie pulmonaire | | |
| **Appareil cardiovasculaire :** | Valve aortique native | Valve aortique prothèse | Valve mitrale native | Valve mitrale prothèse |
| | Liquide péricardique | Anévrisme | Saphène | Liq.conservation coeur |
| **Appareil digestif :** | Coproculture | Biopsie colique | Abcès intestinal | Coll. de pancréatite |
| | Anus-Rectum | Biopsie rectale | Abcès rectal | Liquide d'ascite |
| | Bile | Biopsie hépatique | Abcès hépatique | Liquide péritonéal |
| | Endoprothèse biliaire | Fausse membrane | Abcès pelvien | Liq. péritonéal pelvien |
| **Appareil urinaire :** | **X** ECBU | Ur.urétérale Droite | Ur.urétérale Gauche | Abcès rénal |
| | Culot urinaire | Liq. dialyse péritonéale | Liq. conservation rein | Méat urinaire |
| | ECBU sur sonde | | | |
| **Appareil génital-Nouveau-né :** | Vulve | Lochies | Liquide gastrique N.né | Kyste ovarien |
| | Vagin-Exocol | Episiotomie | BOA-Ombilic | Liquide de Douglas |
| | Endocol | Placenta | Méconium | Biopsie endomètre |
| | Prélèvement urétral | Liquide amniotique | Oeil N.Né | Stérilet |
| | P.V. Strepto B | Spermoculture | Pustule N.Né | Ulcération génitale |
| **Peau-Os-Articulation Collection purulente :** | Plaie superficielle | Hématome | Pvt orifice drain | Liquide articulaire |
| | Escarre-Ulcère | Abcès cutané | Pvt orifice catheter | Biopsie synoviale |
| | Morsure-Griffade | Kyste | Liquide de redon | Lymphocèle |
| | Furoncle-Anthrax | Moëlle | Abcès de paroi | Hydrocèle |
| | Vésicule | Biopsie osseuse | Biopsie ganglionnaire | Ponction ganglionnaire |
| | Phanère | Abcès osseux | Cicatrice opératoire | Ponction médiastinale |
| **Matériel :** | Cathéter central | Cathéter artériel | Sonde urétérale | Drain |
| | Cathéter périphérique | Site implantable | Lame | Redon |
| | Swan Ganz | Introducteur KT | Fil cerclage | Monovac |
| | KT canaud | Electrode | Crin | Clou-vis |
| **Produit sanguin/Tissu/Lait :** | Liquide lavage veine | Lait maternel | | |
| **Antigènes solubles urinaires :** | Légionelle | Pneumocoque | | |
| **Prélèvement multisites :** | Nez ; Aisselles | Pubis | Autres : | |

**Nom du prescripteur :**

Etiquette Patient Sigma Hospitalisation ou Consultation externe

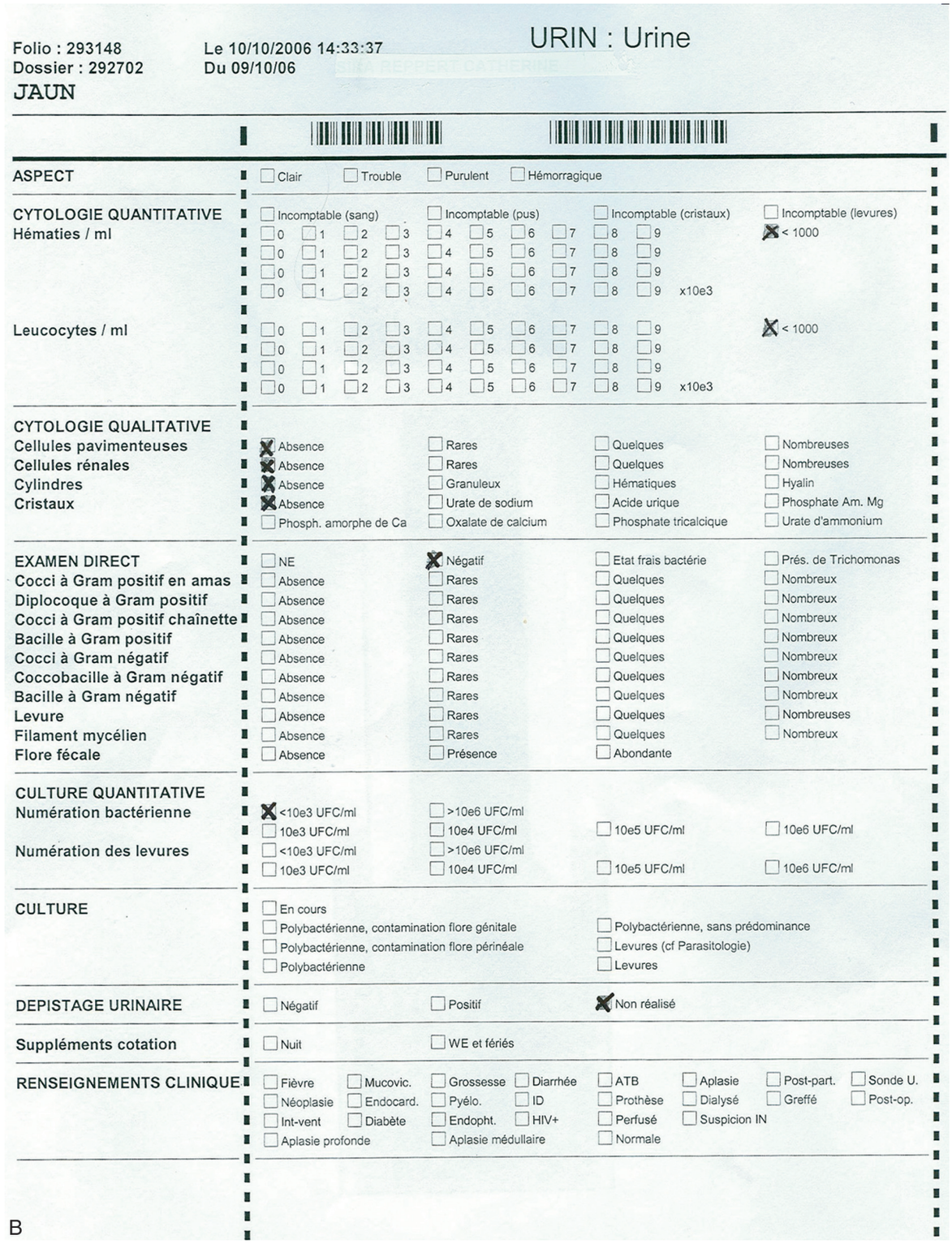
Etiquette Unité Fonctionnelle Hospitalisation ou Consultation externe

292713

A

S.S. 298 - 60000 - 04.06

**Fig. 7.3.** – *Exemples de feuille de saisie optique de prescription (A) et de maquette de recueil de résultats. (B) pouvant être saisis optiquement (scanneur).*



Folio : 293148 Le 10/10/2006 14:33:37
Dossier : 292702 Du 09/10/06
JAUN

URIN : Urine

**ASPECT**
☐ Clair ☐ Trouble ☐ Purulent ☐ Hémorragique

**CYTOLOGIE QUANTITATIVE**

| | Incomptable (sang) | Incomptable (pus) | Incomptable (cristaux) | Incomptable (levures) |
|---|---|---|---|---|
| Hématies / ml | ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 | ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 | ☐ 8 ☐ 9 | ☒ < 1000 |
| | ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 | ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 | ☐ 8 ☐ 9 | |
| | ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 | ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 | ☐ 8 ☐ 9 | |
| | ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 | ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 | ☐ 8 ☐ 9 x10e3 | |
| Leucocytes / ml | ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 | ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 | ☐ 8 ☐ 9 | ☒ < 1000 |
| | ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 | ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 | ☐ 8 ☐ 9 | |
| | ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 | ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 | ☐ 8 ☐ 9 | |
| | ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 | ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 | ☐ 8 ☐ 9 x10e3 | |

**CYTOLOGIE QUALITATIVE**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Cellules pavimenteuses | ☒ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreuses |
| Cellules rénales | ☒ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreuses |
| Cylindres | ☒ Absence | ☐ Granuleux | ☐ Hématiques | ☐ Hyalin |
| Cristaux | ☒ Absence | ☐ Urate de sodium | ☐ Acide urique | ☐ Phosphate Am. Mg |
| | ☐ Phosph. amorphe de Ca | ☐ Oxalate de calcium | ☐ Phosphate tricalcique | ☐ Urate d'ammonium |

**EXAMEN DIRECT**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ☐ NE | ☒ Négatif | ☐ Etat frais bactérie | ☐ Prés. de Trichomonas |
| Cocci à Gram positif en amas | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreux |
| Diplocoque à Gram positif | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreux |
| Cocci à Gram positif chaînette | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreux |
| Bacille à Gram positif | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreux |
| Cocci à Gram négatif | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreux |
| Coccobacille à Gram négatif | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreux |
| Bacille à Gram négatif | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreux |
| Levure | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreuses |
| Filament mycélien | ☐ Absence | ☐ Rares | ☐ Quelques | ☐ Nombreux |
| Flore fécale | ☐ Absence | ☐ Présence | ☐ Abondante | |

**CULTURE QUANTITATIVE**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Numération bactérienne | ☒ <10e3 UFC/ml | ☐ >10e6 UFC/ml | | |
| | ☐ 10e3 UFC/ml | ☐ 10e4 UFC/ml | ☐ 10e5 UFC/ml | ☐ 10e6 UFC/ml |
| Numération des levures | ☐ <10e3 UFC/ml | ☐ >10e6 UFC/ml | | |
| | ☐ 10e3 UFC/ml | ☐ 10e4 UFC/ml | ☐ 10e5 UFC/ml | ☐ 10e6 UFC/ml |

**CULTURE**

| | |
|---|---|
| ☐ En cours | |
| ☐ Polybactérienne, contamination flore génitale | ☐ Polybactérienne, sans prédominance |
| ☐ Polybactérienne, contamination flore périnéale | ☐ Levures (cf Parasitologie) |
| ☐ Polybactérienne | ☐ Levures |

**DEPISTAGE URINAIRE**
☐ Négatif ☐ Positif ☒ Non réalisé

**Suppléments cotation**
☐ Nuit ☐ WE et fériés

**RENSEIGNEMENTS CLINIQUE**

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ☐ Fièvre | ☐ Mucovic. | ☐ Grossesse | ☐ Diarrhée | ☐ ATB | ☐ Aplasie | ☐ Post-part. | ☐ Sonde U. |
| ☐ Néoplasie | ☐ Endocard. | ☐ Pyélo. | ☐ ID | ☐ Prothèse | ☐ Dialysé | ☐ Greffé | ☐ Post-op. |
| ☐ Int-vent | ☐ Diabète | ☐ Endopht. | ☐ HIV+ | ☐ Perfusé | ☐ Suspicion IN | | |
| ☐ Aplasie profonde | | ☐ Aplasie médullaire | | ☐ Normale | | | |

B

**Fig. 7.3.** – *Suite.*

par des mots de passe. Le biologiste doit s'assurer de la conformité du rendu des résultats. Les logiciels doivent permettre la consultation partagée du dossier (antériorités, évolution ou graphe d'un paramètre biologique) par l'ensemble des prescripteurs d'un patient.

### Transmission des résultats

Légalement, le compte-rendu imprimé et signé par le biologiste demeure le document de référence. Cependant, les moyens modernes de communications (serveurs de résultats intranet) permettent de transmettre les résultats rapidement en précisant le niveau de validation (technique ou biologique). Les connexions sont sécurisées et la confidentialité est assurée par des cartes à puces (carte professionnelle santé [CPS]) ou par mot de passe. Le biologiste doit s'assurer du rendu des résultats.

## Logiciels d'épidémiologie

La plupart de ces logiciels sont commercialisés par des fabricants d'automates d'hémoculture, d'identification et d'antibiogramme (tableau 7.1).

### Fonctionnalités

Les logiciels d'épidémiologie intègrent un module de sélection multicritères qui permet de réaliser des statistiques simples (listes, dénombrements et répartitions). À partir du fichier sélectionné et après dédoublonnage des données selon des critères paramétrables (nature du prélèvement, service, séjour, durée entre deux isolements), les données concernant les patients (nom, prénom, etc.), les unités ou les prescripteurs, les prélèvements (nature, type, date, etc.), les identifications (espèce, sérogroupe, sérotype, etc.) et les antibiogrammes (catégorisation SIR, diamètre d'inhibition, CMI) sont traitées. La sélection des données par requête, tri, présentation (tableau, représentation graphique) est plus ou moins ergonomique et automatisable suivant les logiciels. Les données après extraction peuvent être importées dans des tableurs ou intégrées à d'autres bases de données afin de permettre une exploitation plus fine.

### Perspectives

L'évolution des logiciels d'épidémiologie doit être réalisée dans plusieurs directions.

- Le premier champ à améliorer est la communication avec le dossier médical informatisé du patient pour l'accès à des renseignements cliniques et l'étude de paramètres biologiques en fonction du type de pathologie par exemple.

**TABLEAU 7-1**

**Liste non exhaustive des fournisseurs de logiciels de gestion de laboratoires, d'épidémiologie et de saisie optique des données.**

| *Société* | *Type de logiciel* | *Nom du logiciel* | *Site internet* |
|---|---|---|---|
| 3SI | Saisie–gestion optique | Scan'bac | www.3si.fr |
| Bayer Diagnostics | Gestion de laboratoire | Synergie | www.bayerdiag-France.com/lmx |
| Becton Dickinson | Épidémiologie | Epicenter | www.bectondickinson.com |
| bioMérieux | Épidémiologie | Vigiact | www.biomerieux.com |
| Biorad | Épidémiologie | Osiris Evolution | www.bio-rad.com |
| Biosystem Informatique | Gestion de laboratoire | Biowin | www.biosystem.fr |
| Cortex | Gestion de laboratoire | LAB/400 | www.sgscortex.com |
| Gespower New Technologies | Gestion de laboratoire | Jade | www.gnt.be |
| GWI medica | Gestion de laboratoire | Hexalis | www.gwi-medica.fr |
| I2A | Épidémiologie | Sirweb | www.i2a.info |
| Info Partner | Gestion de laboratoire | Bacterio | www.info.partner.free.fr |
| Inlog | Gestion de laboratoire | Labo Serveur | www.inlog.fr |
| Medasys | Gestion de laboratoire | Dx Lab | www.medasys.fr |
| MIPS | Gestion de laboratoire | Glims | www.mips.be |
| Progimed | Gestion de laboratoire | Alysé/Prolam III | www.progimed.fr |
| Sysmex | Gestion de laboratoire | Molis | www.sysmex.be |

- Les modules de statistique devront permettre un accès à des données administratives concernant le nombre d'entrées, la durée de séjour, l'origine du patient afin de permettre une analyse statistique plus fine, plus « personnalisée » des différentes unités de soins de l'établissement, de l'incidence d'un type d'infection, du taux d'incidence (nombre d'infections/nombre de journées d'hospitalisation) ou du taux d'attaque ou incidence cumulée calculée sur un mois (nombre de nouvelles infections survenues chez les patients exposés au cours du mois, rapporté au nombre de patients exposés). De même, les données concernant les consommations d'antibiotiques ou de solutés hydroalcooliques doivent être intégrées pour pouvoir être confrontées aux données concernant la résistance aux antibiotiques ou la survenue d'infections nosocomiales.
- La détection en temps réel de différentes alertes devra être étendue : aux alertes déjà mises en place (infections nosocomiales, bactéries multirésistantes), à la surveillance de bouffées épidémiques intégrant la notion de bruit de fond pour une unité fonctionnelle ou un service, ou à l'accroissement de la résistance d'une bactérie chez un même patient.
- Enfin, la communication et la diffusion automatisée ou non de comptes-rendus généraux ou spécifiques ou le retour d'information vers les unités de soins (caractérisation des infections nosocomiales) doivent passer dans la routine.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Cœur JR A. Les logiciels de gestion de laboratoires de biologie médicale. Spectra Biologie 2010; 184 : 43–67.

Guide technique d'accréditation – dématérialisation des données dans les laboratoires. Document LAB GTA 09. Révision 01 – septembre COFRAC section laboratoire 2008 www.cofrac.fr/documentation/LAB-GTA-09 .

Stach JL. Un système de saisie automatisée pour le laboratoire de bactériologie. Rev Fr Lab Clin 1996; 285 : 25–8.

CHAPITRE 8

# Internet et bactériologie médicale

A. Philippon

## Introduction

En un peu moins d'une décennie, Internet est devenu indispensable aux biologistes, en particulier pour ceux exerçant en bactériologie médicale (vie professionnelle) ; les utilisateurs dans leur vie privée sont de plus en plus nombreux à vanter son intérêt. D'ailleurs, le taux d'équipement en PC des ménages européens est devenu élevé et supérieur à celui des ménages américains (72 millions versus 67 millions, étude CEE, 2006). Un tel engouement pour ces nouvelles technologies s'explique aisément par les énormes possibilités offertes et, ce qui n'est pas négligeable, à titre gracieux. Enfin, l'accès à une source phénoménale d'informations (plusieurs milliards de sites en ligne) est possible et rapide.

Au plan bactériologique et à titre d'exemple, les questions que l'on peut se poser vont être explorées en un dixième de seconde ! La liste de questions ci-dessous illustrera notre perplexité à répondre aisément à divers interlocuteurs médicaux, tels les chirurgiens, les réanimateurs, les infirmiers, voire les malades dans les nombreux domaines relevant de notre spécialité. Pourquoi accumuler livres et revues ? Un simple ordinateur portable (2 à 3 kg) connecté en Wi-fi (sans fil) va aisément remplacer n'importe quelle bibliothèque devenue obsolète.

## Quelles informations rechercher ?

Il est possible depuis quelques années de trouver tout type d'informations (relatives à notre discipline), comme en témoigne la liste de questions suivantes.

- Quid des épidémies dans le Nord de la France à *Clostridium difficile* ?
- Dois-je écrire sur ma feuille de résultats, *Achromobacter xyloxydans* ou *Alcaligenes xyloxydans* ?
- Y a-t-il des infections humaines à *Bartonella alsatica* en France ?
- Quel est l'ordre (priorisation) des zoonoses non alimentaires en France ?
- Puis-je disposer de la feuille de déclaration pour un cas de brucellose, maladie à déclaration obligatoire (MDO) ?
- Comment détecter en pratique, la résistance des streptocoques par efflux ?
- Quelle est la sensibilité « normale » d'*E. coli* au céfépime ?
- Quelle est la prévalence d'*E. coli* intermédiaire ou résistant à la ciprofloxacine soit en France, soit en Allemagne ?
- Quelle est la relation entre VEB-1 et infection nosocomiale ?
- Quelles mesures prendre pour l'éradication d'une souche d'entérocoque résistante aux glycopeptides ?
- Où commander des souches de contrôles de qualité ou encore des amorces pour une PCR ?
- Disposant d'une séquence désoxyribonucléotidique de 5000 paires de bases, d'ailleurs envoyée par le centre de séquençage par Internet (courriel ou mail), puis-je rapidement (en quelques minutes) préciser les gènes, voire encore les promoteurs probables ?

Toutes ces questions, souvent d'actualité très récente, ont une réponse rapidement proposée par une utilisation correcte de cette nouvelle technologie. On retiendra que n'importe quelle question peut donc se poser quotidiennement au biologiste ; il est maintenant en mesure d'y répondre beaucoup plus rapidement avec l'accès à divers sites Internet qu'il devra sélectionner. Mais il conviendra de connaître quelques règles d'utilisation simple.

## Choix d'un méta-moteur de recherche

Diverses contraintes peuvent limiter la quête de renseignements utiles. Curieusement et en premier lieu, il y a surabondance d'informations qui peuvent nécessiter un tri préalable qui sera plus ou moins long à obtenir. Aussi convient-il de respecter certaines règles comme le choix des bons mots clés, leur équivalence anglaise permettant d'élargir considérablement la recherche sur plusieurs milliards de sites, d'affiner au maximum la quête de la solution en choisissant attentivement plusieurs mots clés. Les bonnes habitudes sont heureusement vite acquises.

Cependant, le développement rapide des méta-moteurs de recherche a considérablement simplifié notre approche, en particulier avec Google® créé en 1998 (http://www.google.fr). Un exemple de la pertinence de ce moteur explorant plus de 8 milliards de pages peut être illustré de la manière suivante. Vous tapez les mots : « épidémie, *Clostridium difficile*, France » et en moins de 0,16 seconde, vous allez pouvoir consulter 10 700 pages dont le classement par algorithme est en quelque sorte un « audimat », les plus consultées étant probablement les plus utiles. Pour la recherche précédemment citée en exemple, les premières adresses sont très pertinentes, comme le Rapport de

la mission sur l'épidémie à *Clostridium difficile* dans le Nord-Pas-de-Calais de plusieurs pages téléchargeables en quelques secondes (http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_clostridium_desailly-chanson_1206-3.pdf), ou encore un point du 30 août 2010 de l'Institut national de veille sanitaire (InVS) avec accès immédiat à plusieurs références bibliographiques consultables en ligne (http://www.invs.sante.fr/surveillance/icd/bilan_national_2010/index.htm)

Si vous aviez sélectionné « images » et non « web » et tapé : « *C. difficile* », vous avez plus de 250 sites ou adresses comportant des images sur cette espèce bactérienne. La figure 8.1 illustre la première page de cette recherche d'images.

## Carnet d'adresses

L'existence d'un métamoteur de recherche performant comme celui évoqué ci-dessus entraîne, à la moindre interrogation, une information pléthorique qui demande une analyse ou un tri ultérieur, générateur d'une éventuelle perte de temps. Cependant, une réponse est toujours obtenue quel que soit le renseignement recherché, mais au final de manière plus ou moins rapide. Dans les faits, les mêmes sites sont souvent sélectionnés dans les 30 à 40 premières adresses au cours de diverses quêtes d'informations sur Google®. Aussi, il conviendra de sélectionner les adresses qui vous apparaîtront les plus utiles ou importantes, pour ainsi constituer au final un carnet d'adresses qui deviendra indispensable à votre exercice quotidien.

Les trois exemples suivants vont illustrer cette nécessité d'archiver certaines adresses, donc de créer un carnet d'adresses.

- Compte tenu des constants remaniements taxonomiques, je désire connaître la dernière dénomination d'*Alcaligenes xyloxydans* avant de finaliser la réponse finale, par exemple pour le clinicien. Il est très simple d'aller sur un site de taxonomie, tel que celui du National Center for Biotechnology Information (NCBI) ou celui du German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). La bonne réponse est, aujourd'hui, *Achromobacter xyloxydans* ; c'est donc un retour en arrière, mais *Alcaligenes faecalis* ne change pas de dénomination. Comme les remaniements taxonomiques sont constants et nombreux, il est capital de ne pas perdre la face !

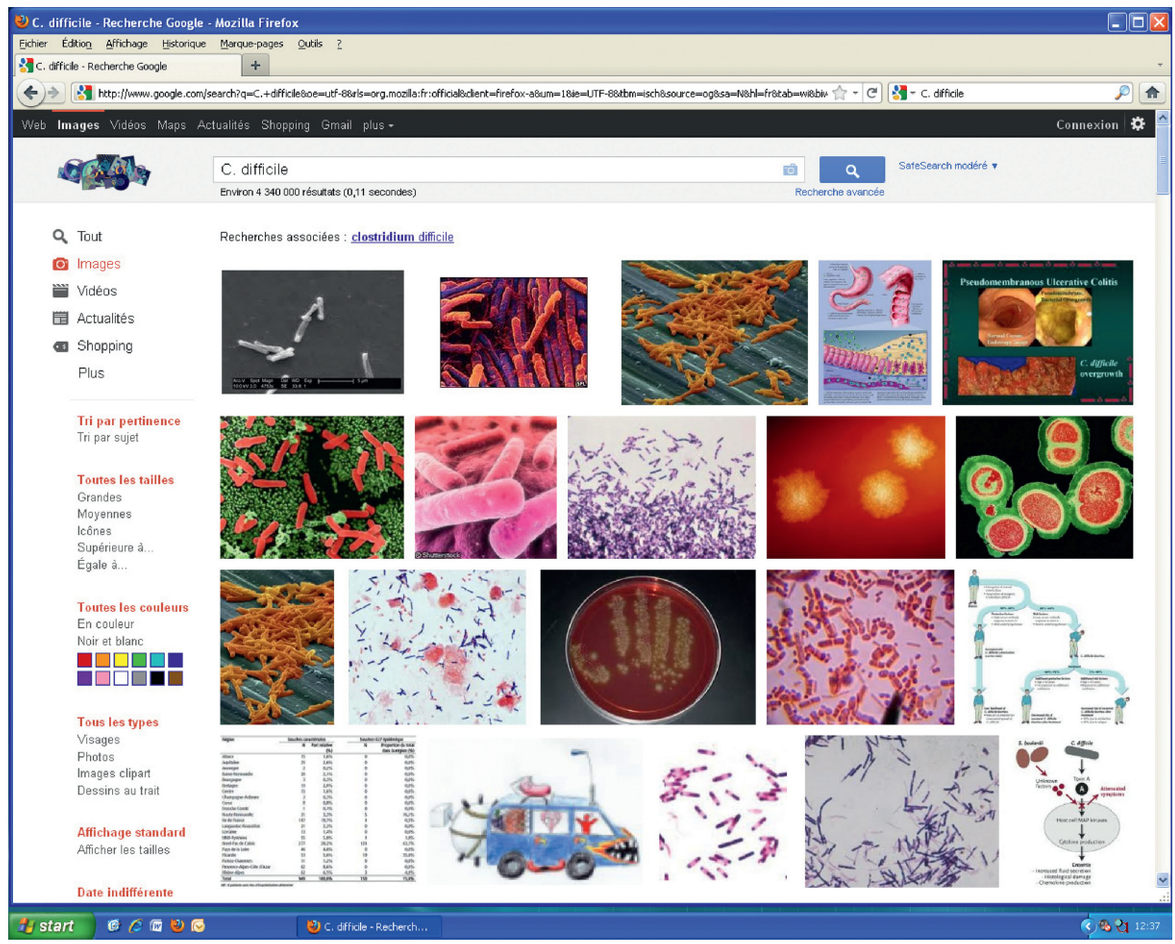



**Fig. 8.1.** – *Google® : résultat de la recherche d'images sur* C. difficile *(première page).*

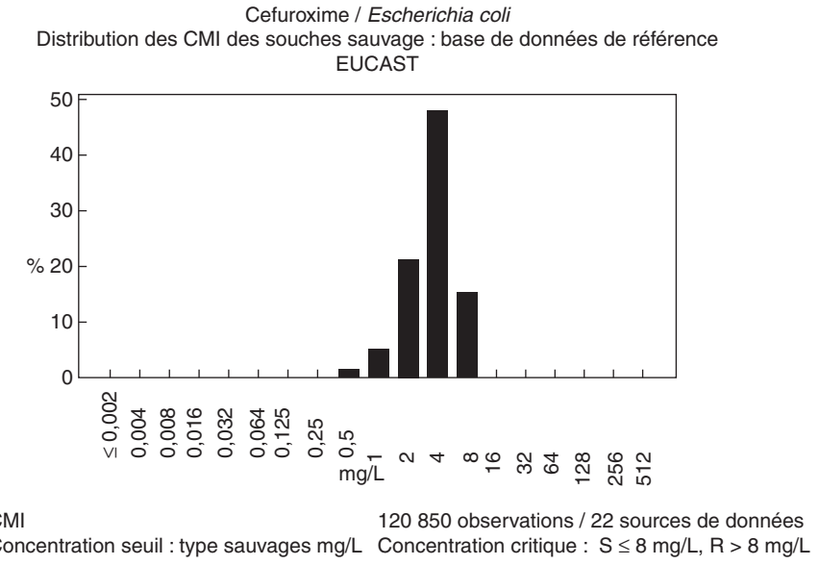



**Fig. 8.2.** – Escherichia coli *: distribution des concentrations miminales inhibitrices (CMI; mg/l du céfuroxime (Eucast, 120 850 souches).*

- Il est assez fréquent, lors de la validation d'un antibiogramme, de se poser la question de la sensibilité moyenne ou normale d'une espèce bactérienne pour un antibiotique. Le site suivant est très important. Il s'agit de celui de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast), qui harmonise les concentrations critiques en Europe. De plus, il met à disposition des biologistes, des banques de données relatives à la distribution de populations bactériennes par espèce et par antibiotique (http://217.70.33.99/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init).
- La figure 8.2 illustre la distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (mg/l) du céfuroxime pour un échantillon de 120 850 souches d'*Escherichia coli* en provenance de 20 sources différentes.

Un dernier exemple illustrant l'intérêt de disposer d'excellentes adresses est celui d'un site lyonnais de grand secours, intitulé BIBI pour Bio Informatic Bacterial Identification. Ce site assez unique va vous permettre d'établir un diagnostic bactériologique fondé sur l'analyse rapide en moins de 2 minutes sur les homologies de votre séquence désoxyribonucléotidique d'un gène utilisé pour une identification comme celui codant pour l'ADNr16S. Il s'agit donc d'un diagnostic moléculaire rapide à obtenir par rapport à diverses banques, comme celle de souches de référence. Diverses expressions graphiques tel un dendogramme sont aisément accessibles (http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi). La figure 8.3 illustre l'identification d'une souche d'entérobactérie (*query*) ayant un curieux phénotype de résistance aux β-lactamines évoquant une BLSE (β-lactamase à spectre étendu) de bas niveau. Par ailleurs, lors de la consultation, il est possible d'activer, par simple clic sur le nom de la bactérie, l'accès aux données taxonomiques, ou encore en cliquant sur le numéro d'enregistrement de la séquence, tel AF1129441 aux données du dépôt de la séquence, sur Genbank. Pour accéder à l'article sur BIBI, allez à l'adresse suivante : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Display&DB=pubmed.

## Conclusion

L'usage de cette nouvelle technologie de l'information qu'est Internet est devenu indispensable au quotidien et d'abord au plan professionnel. Lors d'une recherche bibliographique sur NCBI (Pubmed), de très nombreux articles sont maintenant librement accessibles sous un format pdf. Il suffit de l'ouvrir avec la bonne application et de l'imprimer. Certains laboratoires adressent leurs résultats, donc sans perte de temps, par courriel, ou bien ils sont consultables à distance. Nul n'a besoin d'être grand devin pour prédire un développement encore plus important dans les années à venir, d'autant qu'Internet envahit notre vie quotidienne pour de nombreuses activités telles que les réservations de train, d'avion, de théâtre ; la consultation de votre compte bancaire avec achat d'actions en temps réel ; le bulletin météo ; le plan d'une adresse d'un ami qui vous a invité à dîner ; la relecture de quelques pages de la *Chartreuse de Parme* ; toute commande, etc. Enfin, quelle facilité pour converser gratuitement avec un fils ou petit-fils en stage de l'autre côté de l'Atlantique !

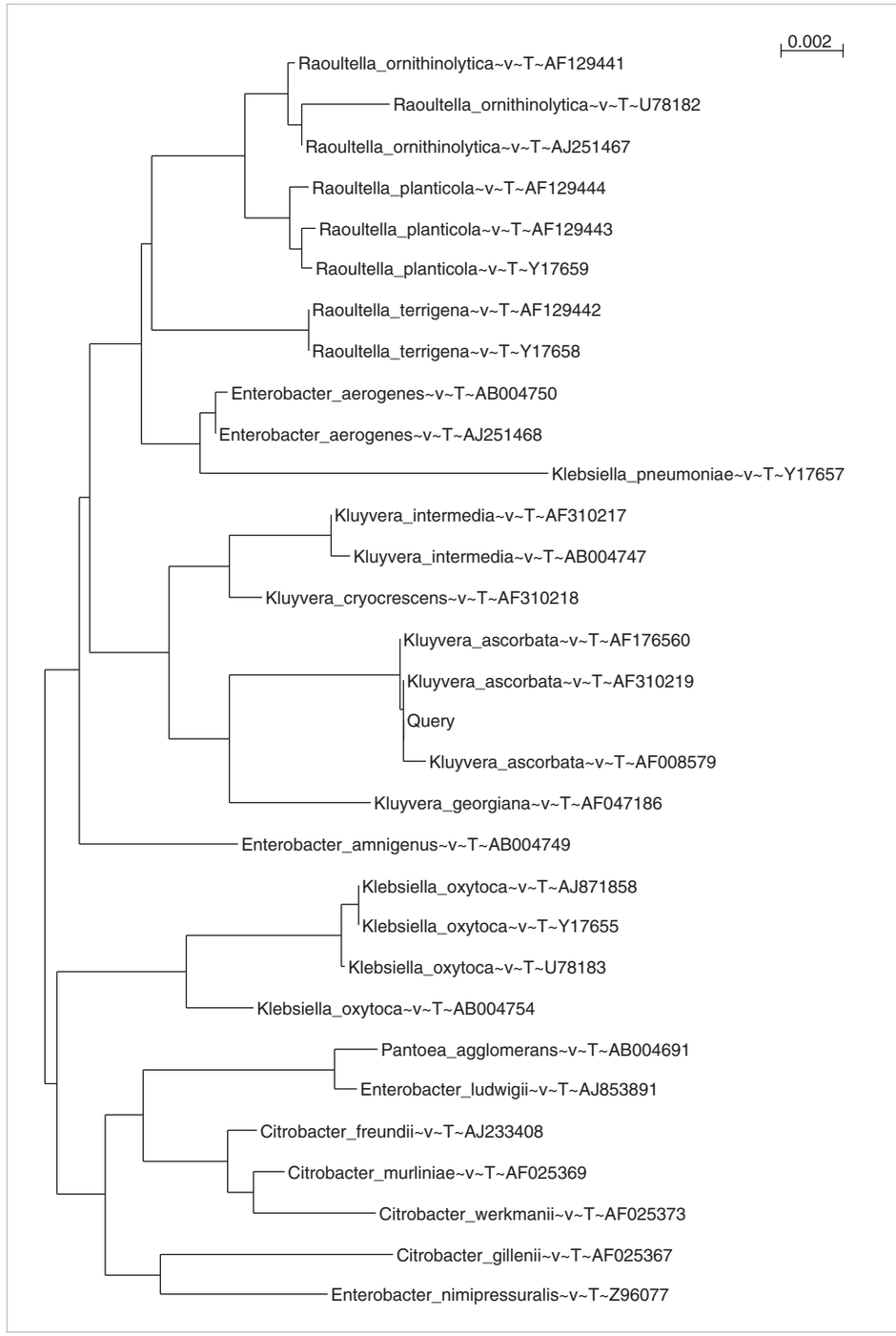



**Fig. 8.3.** – *Exemple d'une identification d'une souche d'entérobactérie par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S avec BIBI.*

CHAPITRE

9

# Sécurité biologique au laboratoire de bactériologie

M. Mounier, N. Hidri, M.-C. Ploy, F. Denis

Les laboratoires de bactériologie sont des lieux particulièrement exposés au risque infectieux puisque, du fait de l'activité exercée, tous les agents biologiques sont susceptibles d'y être manipulés. De plus, la conscience de ce risque est bien souvent minimisée puisque le personnel est souvent plus soucieux de protéger le prélèvement que de se protéger lui-même.

**ENCADRÉ**

Ces laboratoires ne sont pas exempts des autres risques (chimiques, radioactifs, etc.) qui ne seront pas pris en considération dans ce chapitre.

Le Code du travail (article L230-2) prévoit que les mesures nécessaires doivent être prises pour « assurer la sécurité physique et mentale des travailleurs » sur la base des principes généraux de prévention :

- éviter les risques ;
- évaluer les risques qui ne peuvent pas être évités ;
- combattre les risques à la source ;
- adapter le travail à l'homme (postes de travail, équipements, méthodes de travail, etc.) ;
- tenir compte de l'évolution de la technique ;
- remplacer ce qui est dangereux par ce qui n'est pas dangereux ou par ce qui est moins dangereux ;
- planifier la prévention ;
- prendre des mesures de protection collective en leur donnant la priorité sur les mesures de protection individuelle ;
- donner les instructions appropriées aux travailleurs.

L'article L231-62 précise que l'évaluation du risque d'exposition à des agents biologiques tient compte de leur classification, mais également de « toutes les informations disponibles et notamment celles relatives aux infections susceptibles d'être contractées du fait de l'activité professionnelle par le travailleur et de celles concernant les effets allergisants et toxiques pouvant résulter de l'exposition aux agents biologiques. »

Ces données générales s'appliquent bien sûr aux laboratoires de microbiologie où l'évaluation du risque devra prendre en compte toutes les étapes de l'analyse depuis le prélèvement, son acheminement, sa prise en charge et analyse au laboratoire jusqu'au rendu du résultat en n'oubliant pas la gestion des déchets.

Il faut d'emblée souligner le fait qu'aucune enceinte de sécurité, installation ou méthode ne peut, à elle seule, garantir la sécurité si l'opérateur ne respecte pas les recommandations et les techniques sécurisées reposant sur une formation et une information solides.

## Risque infectieux

Classiquement dans le cadre de la gestion des risques, le risque correspond à l'exposition au micro-organisme avec deux corollaires : la présence du micro-organisme = le danger et la contamination = le dommage.

L'évaluation du risque infectieux est donc étroitement dépendante du micro-organisme lui-même, mais aussi du mode d'exposition favorable ou non à la contamination.

La **sécurité biologique** regroupe des mesures techniques et des pratiques mises en œuvre pour protéger les personnels et l'environnement des risques liés aux agents biologiques pathogènes (micro-organismes et toxines). Elle repose, entre autres, sur les mesures définies par l'arrêté du 16 juillet 2007.

La **sûreté biologique** est l'ensemble des mesures de protection contre le vol, le détournement et le mauvais usage de souches de micro-organismes hautement pathogènes ou de toxines dangereuses pour l'homme et de tout produit en contenant, utilisables dans le cadre d'actions bioterroristes.

### Classification des micro-organismes

#### *Dans le cadre de la sécurité biologique*

Au titre de la directive 2000/54/CE du Parlement et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques biologiques au travail, un micro-organisme est défini comme « une entité microbiologique, cellulaire ou non, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique ».

Les textes réglementaires européens et français définissent des critères qui permettent de classer les micro-organismes en quatre groupes en fonction de l'importance du risque d'infection qu'ils présentent pour une personne en bonne santé.

Les critères de classification sont schématisés dans le tableau 9.1 et des extraits de la classification des bactéries sont présentés dans le tableau 9.2.

**TABLEAU 9-1**

**Critères de classification des agents pathogènes d'après l'arrêté du 18 juillet 1994 modifié par les arrêtés du 17 avril 1997 et du 30 juin 1998 et la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000.**

| *Groupe* | *1* | *2* | *3* | *4* |
|---|---|---|---|---|
| Pathogénicité chez l'homme | Non | Oui | Oui | Oui |
| Danger pour l'opérateur | | Oui (modéré) | Oui (haut risque) | Oui (haut risque) |
| Propagation dans la collectivité | | Peu probable | Possible | Risque élevé |
| Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace | | Oui | Oui | Non |
| Exemples | *Bacillus subtilis* | *S. aureus*, *S. pyogenes*, *A. fumigatus*, virus de la rougeole, etc. | *Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma capsulatum*, VIH, VHB, VHC, etc. | Virus Lassa, Marburg, Ébola, etc. |

**TABLEAU 9-2**

**Bactéries du groupe 3 (extrait de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000, Annexe III).**

| *Agent biologique* | *Classification* | *Modes de contamination* |
|---|---|---|
| *Bacillus anthracis* | 3 | Cutané |
| *Bartonella quintana* | 3 | |
| *Brucella abortus, B. canis, B. melitensis, B. suis* | 3 | Cutané-aérien |
| *Chlamydia psittaci* (souches aviaires) | 3 | |
| *Coxiella burnetii* | 3 | |
| *Escherichia coli*, souches cytotoxiques (ex. : O157 : H7 ou O13) | 3* | |
| *Francisella tularensis* | 3 | Cutané |
| *Mycobacterium africanum* | 3 | Aérien |
| *Mycobacterium bovis* (à l'exception de la souche BCG) | 3 V | |
| *Mycobacterium leprae* | 3 | Cutané-aérien |
| *Mycobacterium microti* | 3* | |
| *Mycobacterium tuberculosis* | 3 V | Aérien |
| *Mycobacterium ulcerans* | 3* | Cutané |
| *Burkholderia mallei* | 3 | Cutané |
| *Burkholderia pseudomallei* | 3 | Cutané |
| *Rickettsia akari* | 3* | |
| *Rickettsia canada* | 3* | |
| *Rickettsia conorii* | 3 | |
| *Rickettsia montana* | 3* | |
| *Rickettsia typhi* | 3 | |
| *Rickettsia prowasekii* | 3 | |

| *Agent biologique* | *Classification* | *Modes de contamination* |
|---|---|---|
| *Rickettsia rickettsii* | 3 | |
| *Orientia tsutsugasmushi* | 3 | |
| *Salmonella* Typhi | 3* V | Digestif |
| *Shigella dysenteriae* (type 1) | 3* | Digestif |
| *Yersinia pestis* | 3 V | |

V : vaccin efficace disponible.
* Ces agents biologiques peuvent présenter pour les travailleurs un risque d'infection limitée parce qu'ils ne sont pas normalement infectieux par l'air.

À cette classification de groupe à risque correspondent des conditions de manipulations des micro-organismes spécifiques, codées par les mêmes chiffres : 2, 3 ou 4.

Toutefois, un aspect limitant de cette classification tient au fait qu'elle laisse peu de latitude pour l'évaluation continue et dynamique des risques, d'autant que le risque peut se trouver modifié du fait des quantités manipulées, d'activités spécifiques ou même de nouveaux micro-organismes non listés. Cet ensemble de critères ne doit pas être négligé au laboratoire et doit imposer une évaluation adaptée du risque qui peut s'avérer :

- accru du fait de la manipulation de l'agent biologique en culture, chez l'animal, etc. ;
- relativisé du fait de l'absence d'infectiosité par voie aérienne.

Une approche « pratique » pour évaluer le risque pathogène d'un micro-organisme, en fonction du contexte de manipulation, devrait au minimum tenir compte des critères ci-après :

- pathogénicité de l'agent infectieux et dose infectante ;
- mode de transmission « normal » (voies respiratoire, digestive, cutanéomuqueuse) ;
- modes de contamination liés aux manipulations au laboratoire, en particulier potentiel de génération d'aérosols ;
- activité du laboratoire (concentration, sonication, centrifugation, etc.) ;
- manipulation génétique (travail sur les micro-organismes recombinants : gènes codant un facteur de virulence, une toxine, etc.) ;
- circonstance d'exposition ;
- stabilité de l'agent dans l'environnement ;
- concentration de l'agent et volume de matériel contaminant manipulé ;
- présence d'un hôte réceptif ;
- existence de mesures préventives efficaces ;
- existence d'un traitement efficace.

## Dans le cadre de la sûreté biologique

Les micro-organismes et toxines concernés sont les suivants :

1. Micro-organismes et toxines hautement pathogènes, présentant les risques les plus élevés pour la santé publique :
   - *Yersinia pestis* ;
   - *Mycobacterium tuberculosis* ultrarésistante (résistance à l'isoniazide, rifampicine, n'importe quelle fluoroquinolone, et à la capréomycine ou à la kanamycine ou l'amikacine).
2. Les organismes génétiquement modifiés issus ou intégrant des éléments génétiques des micro-organismes sus-mentionnés.
3. Les organismes et toxines désignés ci-après ainsi que les organismes génétiquement modifiés renfermant des séquences d'acides nucléiques des micro-organismes désignés ci-après ou renfermant des séquences d'acides nucléiques codant une des toxines désignées ci-après ou une sous-unité de l'une de ces toxines :
   - *Bacillus anthracis* ;
   - toutes les *Brucella* sauf *B. ovis* ;
   - *Burkholderia mallei* ;
   - *Burkholderia pseudomallei* ;
   - *Clostridium botulinum* ;
   - *Clostridium perfringens*, types producteurs de la toxine *epsilon* ;
   - *Francisella tularensis* ;
   - *Coxiella burnetii* ;
   - *Rickettsia prowasekii* ;
   - *Rickettsia rickettsii* ;
   - l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* ;
   - les toxines botuliques ;
   - la toxine epsilon de *Clostridium perfringens*.

Les laboratoires qui manipulent et conservent ces micro-organismes et toxines (au-delà de 30 jours) doivent mettre en place des mesures de sécurité biologique mais aussi de sûreté biologique.

Celles-ci consistent en l'obtention d'une autorisation délivrée par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps), une traçabilité des mouvements de ces micro-organismes et toxines, un bilan annuel à remettre à l'Afssaps.

« Toute opération de transport, de cession, d'importation, d'exportation, d'offre ou d'acquisition de micro-organismes ou de toxines précités doit être inscrite sur un registre spécial coté et paraphé par le maire ou le commissaire de police ou enregistrée par un système informatique spécifique répondant à des conditions particulières de sécurité » selon l'article R. 5139-1

« Sont dispensées des opérations mentionnées à l'article R. 5139-1 :

1. Les opérations relatives aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro et aux réactifs contenant des micro-organismes ou des toxines lorsqu'ils contiennent des micro-organismes ou des toxines qui ont fait l'objet d'une inactivation, ou d'une atténuation décrite dans la documentation afférente aux articles R. 5221-15 et R. 5221-17.
2. Les opérations autres que la cession, l'importation et l'exportation réalisées par les établissements recevant des échantillons biologiques aux seules fins d'analyse de biologie médicale ou vétérinaire. Cette dispense vaut seulement pour les échantillons biologiques conservés moins de trente jours au sein de ces établissements, sauf décision contraire du ministre chargé de la santé, du juge administratif ou du juge judiciaire. »

## Modes de transmission

La connaissance des modes de transmission est indispensable pour appréhender le risque de contamination lors des manipulations. En effet, il est évident que la contamination ne pourra provenir que d'une exposition correspondant au(x) mode(s) de transmission du micro-organisme. Ainsi, un aérosol fait de micro-organismes non pathogènes par voie respiratoire ne constitue pas un risque. En revanche, il faudra être vigilant pour des portes d'entrée inhabituelles, dues aux manipulations de laboratoire et qui peuvent alors constituer un risque réel, au moins local, d'infections (par exemple abcès par inoculation accidentelle d'une suspension de *Mycobacterium tuberculosis*, transmission de toxoplasmose après morsure par animal infecté, etc.).

### *Voie respiratoire*

La contamination par voie aérienne ou respiratoire résulte de l'inhalation de particules infectieuses véhiculées sous forme d'aérosol.

Le risque d'exposition aux aérosols représente un risque réel au laboratoire. Plus la particule est petite et plus la vitesse est grande, plus le risque d'aérosolisation est élevé. Ce phénomène n'étant pas macroscopiquement visible au quotidien, sa reconnaissance et son évaluation sont complexes. On estime pourtant que c'est le mode de contamination le plus fréquent au laboratoire. Le risque le plus important se situe dans l'environnement immédiat de la formation de l'aérosol, mais il peut s'étendre à la faveur de courants d'air ou de pollutions massives (bris de flacons de culture, etc.).

En pratique, au laboratoire, les aérosols sont dus :

- à la rupture de film liquide à l'orifice d'un flacon, à l'extrémité d'une pipette ou au contact d'une anse d'ensemencement ;
- au mélange gaz–liquide occasionné par l'agitation d'une culture, d'une éprouvette, ou du fait d'un brusque rejet de liquide hors d'une pipette ou d'une seringue qui contenait quelques bulles d'air ;
- au flambage d'anses d'ensemencement en métal, au passage d'un récipient à la flamme, qui, sous l'effet de la chaleur, provoque la « vaporisation » explosive de liquides résiduels, si rapidement que les gouttelettes expulsées contiennent des micro-organismes encore vivants ;
- aux vibrations induites lors de l'utilisation de certains appareils (ultrasons, vortex, etc.) projetant des gouttelettes par effet « catapulte » ;
- à l'« explosion » d'une goutte qui tombe sur une surface et engendre la formation de gouttelettes secondaires, plus importante s'il y a accélération comme celle provoquée par l'expulsion du résidu d'une pipette ;
- à la centrifugation qui, par les mouvements d'accélération, de freinage entraîne des vibrations, sources importantes de production d'aérosols ;
- à l'ouverture de récipients sous vide ; le grattage, la filtration de matériels desséchés, lyophilisés, favorisent l'émission de petites particules.
- à l'ouverture de boîtes de subcultures ou à l'examen olfactif des dites boîtes, en particulier lorsqu'il s'agit de *Brucella* ou de *Francisella* (l'arrêté du 16 juillet 2007 interdit clairement la pratique de l'examen olfactif).

### *Voie orale*

La contamination orale est due à l'ingestion de micro-organismes. Elle peut être :

- « directe » lors d'un pipetage à la bouche qui non seulement ne doit plus être pratiqué, mais de plus doit être formellement proscrit ;
- indirecte par :
  - contact de la bouche avec les mains (geste réflexe, onychophagie, etc.), ou des objets souillés (stylos, cigarettes, etc.) ;
  - consommation de boissons ou d'aliments car ils sont susceptibles d'être contaminés par des mains souillées.

Le respect des règles d'hygiène de base (lavage et/ou désinfection des mains, port de gants à condition de les utiliser correctement) constitue une mesure prophylactique efficace.

### *Voie cutanéomuqueuse*

La contamination par voie cutanéomuqueuse est la résultante :

- soit d'une effraction cutanée accidentelle (coupure, piqûre ou, dans un contexte d'animalerie, morsure ou griffure) ;
- soit d'une projection ou d'un contact direct sur peau lésée, ou même sur peau saine, certaines bactéries pouvant traverser la peau (*Leptospira, Brucella, Francisella*, etc.) ;
- soit d'une projection sur les muqueuses (surtout conjonctives).

La mise en place de procédures écrites, validées et évaluées pour prévoir la conduite à tenir en cas d'accident (accident d'exposition au sang [AES] et autres) doit être systématique dans un laboratoire de microbiologie.

## Conception du laboratoire

Un laboratoire bien conçu est la première mesure de prévention qui permet de protéger les personnes en leur fournissant des locaux adaptés en surfaces, équipements (y compris sols, murs, paillasses, etc.), circuits.

### Réglementation

Le décret fixant les conditions d'autorisation des laboratoires d'analyse de biologie médicale (n° 95-1321 du 27 décembre 1995, modifiant le décret n° 76-1006 du 4 novembre 1976) indiquait quelques obligations en termes de superficie et de nombre de pièces : réception, secrétariat, archives, salle de prélèvements, laverie et deux salles affectées aux activités de laboratoire dont une réservée exclusivement aux activités de bactériologie, virologie, mycologie et parasitologie.

Le GBEA (arrêté du 26 novembre 1999, relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale) précise que « l'aménagement du laboratoire doit permettre d'isoler les activités susceptibles d'entraîner une contamination de l'opérateur et/ou de l'analyse et éviter une pollution tant à l'intérieur qu'à l'extérieur […] ».

L'arrêté du 16 juillet 2007 « fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes » précise clairement la conception et l'aménagement des locaux. Il définit dans son annexe 1 les mesures techniques générales de prévention et de confinement minimales à mettre en œuvre ainsi que, dans son annexe 2, les niveaux de confinement minimaux à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, de développement et d'enseignement où sont utilisés des agents biologiques pathogènes des groupes 2, 3 ou 4 (tableau 9.3).

D'une manière générale, pour prévenir le risque infectieux dans un laboratoire de microbiologie, on peut considérer que la manipulation des micro-organismes nécessite un niveau de protection (confinement) équivalent à la classification en groupe (tableaux 9.1 et 9.2).

**TABLEAU 9-3**

**Mesures de confinement, arrêté du 16 juillet 2007, annexe 2.**

| *Mesures de confinement dans les salles dédiées aux activités techniques (analyses microbiologiques, mycologiques ou parasitologiques)* | *NIVEAUX DE CONFINEMENT* | |
|---|---|---|
| | *2* | *3* |
| **Conception** | | |
| 1. Accès via un sas muni de portes asservies ne pouvant pas s'ouvrir simultanément | Non | Oui |
| 2. Possibilité de fermer hermétiquement la salle dédiée aux activités techniques pour permettre la désinfection | Optionnel | Oui |
| 3. Filtration de l'air entrant dans la salle dédiée aux activités techniques (filtre à particule à très haute efficacité : HEPA) | Non | Oui |
| 4. Filtration de l'air extrait de la salle dédiée aux activités techniques (filtre HEPA) | Non | Oui |
| 5. Fenêtres fermées pendant la manipulation | Oui | Oui, hermétiquement closes |
| 6. Maintien d'une pression négative dans la salle dédiée aux activités techniques par rapport aux zones voisines | Non | Oui[1] |
| 7. Système d'alarme pour détecter tout changement anormal de la pression de l'air | Non | Oui |
| 8. Approvisionnement en énergie électrique de secours | Non | Optionnel |
| 9. Système de ventilation de secours | Non | Optionnel |
| **Aménagements internes** | | |
| 1. Présence au moins d'un poste de sécurité microbiologique | Oui[2] | Oui |
| 2. Surfaces imperméables à l'eau, résistantes aux agents de nettoyage et de désinfection sans endroits inaccessibles au nettoyage | Oui : sols et murs[2] | Oui : sols, murs et plafonds[2] |

(*Suite*)

TABLEAU 9-3

**Suite.**

| *Mesures de confinement dans les salles dédiées aux activités techniques (analyses microbiologiques, mycologiques ou parasitologiques)* | *NIVEAUX DE CONFINEMENT* | |
|---|---|---|
| | *2* | *3* |
| 3. Présence d'une douche à proximité de la salle dédiée aux activités techniques | Non | Optionnel |
| 4. Présence d'un autoclave | Optionnel. Si oui, facilement accessible et, si possible, dans le bâtiment | Oui, dans la salle dédiée aux activités techniques, à double entrée ou à proximité immédiate[3] |
| **Pratiques opératoires** | | |
| 1. Inactivation des déchets contaminés avant leur sortie de l'établissement | Optionnel | Oui |
| 2. Inactivation des agents biologiques dans les effluents par des moyens appropriés | Optionnel | Oui |

Oui : exigence.
Non : pas d'exigence.
Optionnel : doit être décidé, au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront – ou non – être appliquées.
1 Pour les installations existantes, cette exigence est applicable au plus tard 3 ans après la publication du présent arrêté.
2 Pour les installations existantes, cette exigence est applicable au plus tard 2 ans après la publication du présent arrêté.
3 Mise en place de procédures validées, permettant le transfert vers un autoclave extérieur au local, conférant la même protection, et contrôlées dans leur déroulement.

## Conception générale

La démarche à adopter lors de la conception d'un laboratoire de biologie médicale est décrite dans le guide édité par l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS).

L'accès sera limité aux seuls travailleurs habilités et les circuits seront prévus pour favoriser la « marche en avant » et privilégier le positionnement des équipements au plus près de leur utilisation pour éviter les risques liés au transport des produits biologiques (prélèvements, cultures, etc.).

Toute salle dédiée aux activités techniques sera séparée des autres locaux par au moins une porte verrouillable.

Toutes les surfaces en contact avec les produits biologiques, quel que soit le niveau de risque, seront imperméables à l'eau, résistantes aux acides, bases, solvants, désinfectants. Elles seront faciles à nettoyer et à désinfecter (surfaces lisses). Pour les sols, des remontées en plinthes, sans angles droits, prolongeant les revêtements de sols permettront un nettoyage efficace. De même, les plans de travail seront lisses, non poreux, sans joints et avec une remontée au bord externe pour éviter les écoulements de liquides si un accident survient.

Des postes de lavage des mains, exclusivement réservés à l'hygiène des mains, correctement équipés, seront installés dans toutes les pièces ayant une activité de laboratoire ou de prélèvement. Il faudra prévoir un espace suffisamment haut entre le robinet et l'évacuation pour pouvoir laver les mains et les avant-bras.

On veillera également à l'ergonomie du poste de travail, avec en particulier des sièges stables et adaptés aux différences de morphologie entre les personnes (réglages de la hauteur, barre d'appui des pieds, etc.).

Les postes informatiques (clavier et souris), de même que les téléphones sans fil sont des « repères » à bactéries et des sources d'exposition importantes aux micro-organismes, d'où l'importance d'une vigilance particulièrement accrue pour ce type de matériel. Les solutions hydroalcooliques peuvent être un moyen efficace pour éviter la contamination, à condition qu'elles soient correctement utilisées avant la manipulation de ces objets.

## Zones confinées

La manipulation de produits biologiques requiert des conditions strictes qui sont réglementées en fonction du classement du micro-organisme manipulé. Les zones de travail seront donc plus ou moins sécurisées en fonction de ce risque, l'objectif étant de faire en sorte que le micro-organisme ne puisse pas diffuser à l'extérieur de la zone où il est manipulé. Le confinement qui en résulte est plus ou moins poussé en fonction du risque évalué.

Le confinement est un « acte d'isolement » qui, pour le risque biologique, a été mis en œuvre il y a fort longtemps avec la pratique de mise en quarantaine, cantonnant dans un lieu les personnes « contagieuses » pour éviter les épidémies.

Le mot a pris ses lettres de noblesse dans le domaine de l'industrie atomique où le manipulateur et le produit à risque sont séparés physiquement. Depuis, la diversification des applications (industrie, santé, agriculture, enseignement et recherche) s'est accompagnée d'un grand nombre de recommandations, textes réglementaires, décrets et normes tentant d'encadrer le sujet ; il en a résulté plusieurs classifications. Toutefois, la désignation la plus courante va de 1 à 4, où 4 est le risque majeur, précédé d'une lettre spécifique au domaine d'application ou à l'activité.

Le confinement a pour but essentiel de protéger les personnes en présence d'un risque dont le vecteur est l'air et le champ d'application concerne, bien sûr, les micro-organismes pathogènes, mais aussi les produits chimiques toxiques. Les moyens mis en œuvre doivent protéger l'activité, l'environnement et en première ligne l'opérateur. Il s'agit le plus souvent de locaux spécifiques où les moyens architecturaux (locaux en dépression, traitement de l'air, etc.) vont de pair avec des règles strictes de comportement (tenue, ouverture des portes, gestion des déchets, etc.). Le tableau 9.3 rapporte les mesures de confinement dans les laboratoires de microbiologie pour les niveaux de 2 à 4.

## Postes de sécurité microbiologiques (PSM)

Les postes de sécurité microbiologique sont des enceintes de sécurité pour manipuler les micro-organismes dès le niveau 2 (tableau 9.3).

### *Généralités*

#### Terminologie

Les **sorbonnes** sont des espaces de travail parfaitement fermés et ventilés par l'induction d'un courant d'air destiné à diluer les polluants chimiques pour les évacuer, via le rejet dans l'atmosphère. Elles ne peuvent en aucun cas être utilisées lors d'une utilisation à des fins microbiologiques.

Seuls les **postes de sécurité microbiologique (PSM)** proposent une protection de l'opérateur face à une contamination aérienne et, suivant la catégorie du PSM, un confinement dynamique des produits manipulés. Ce sont des enceintes à empoussièrement contrôlé où l'air est traité puis réparti dans l'enceinte en « flux laminaire vertical ». Mais les PSM ne sont pas de simples flux laminaires et doivent impérativement être conformes à la norme EN 12469 et sont, en France, certifiés par le laboratoire national d'essai (LNE). Ils sont alors reconnaissables car le fabricant ou l'importateur doit inscrire sur la face avant les indications rapportées ci-après (fig. 9.1 et 9.2).

#### Laminarité

La technologie du traitement de l'air en écoulement laminaire permet d'obtenir un empoussièrement rigoureusement contrôlé :

**Fig. 9.1.** – *Indications nécessaires sur la face avant d'un PSM.*

- en apportant sur le plan de travail de l'air filtré ;
- en évitant la sédimentation des particules émises par le manipulateur et ses activités.

Contrairement à un flux turbulent (mouvement d'air multidirectionnel introduit dans le volume à traiter), le flux laminaire est un flux d'air provoqué, unidirectionnel et continu. Le principe physique est d'obtenir une « laminarité » des filets d'air filtré, ceux-ci devant s'écouler en filets rectilignes, parallèles, de même vitesse et de même sens.

Ce résultat est la somme de trois conditions :

- répartition homogène de la pression délivrée par les ventilateurs de soufflage, « plenum de répartition » ;
- vitesse de soufflage de 0,45 m/s (± 20 %) à l'intérieur du volume de travail ; des vitesses de soufflage supérieures ou inférieures créent des turbulences nuisant à l'écoulement du flux autour d'un obstacle (fig. 9.3 et 9.4) ;
- filtration de l'air à très haute efficacité (filtres HEPA [*high efficiency particulate air*], à 99,999 % DOP [dioctylphtalate]).

**Fig. 9.2.** – *Exemple de marquage d'un PSM.*

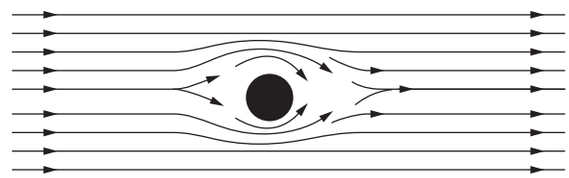


**Fig. 9.3.** – *Comportement d'un écoulement laminaire autour d'un obstacle.*
(V = 0,45 m/s ± 0,1 m/s).

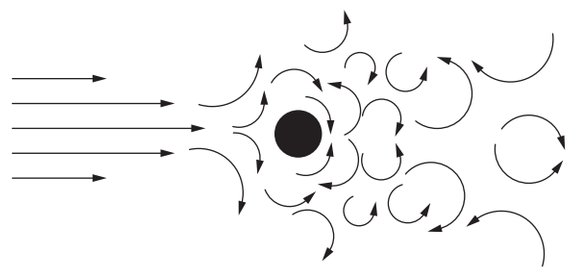


**Fig. 9.4.** – *Comportement d'un écoulement turbulent autour d'un obstacle.*
(V > 0,55 m/s ou V < 0,35 m/s).

### *Différents PSM : postes de sécurité microbiologique* (fig. 9.5 à 9.7)

Contrairement aux sorbonnes qui n'assurent aucun traitement de l'air, les PSM assurent au moins la filtration de l'air rejeté dans le milieu extérieur (PSM I) (fig. 9.5) et au mieux le « confinement » dans une enceinte close (« boîte à gants » ou PSM III). Les pathogènes du groupe 4 doivent obligatoirement être manipulés dans un PSM de classe III (fig. 9.7) et dans une zone de confinement adaptée.

Un PSM I permet de protéger le manipulateur et l'environnement (fig. 9.5). Un PSM II permet en plus de protéger la manipulation contre les « polluants » présents dans le laboratoire (fig. 9.6 à 9.8).

Le choix du plan de travail perforé ou plein se fera en fonction des manipulations à effectuer :

- le plan de travail perforé assure une meilleure laminarité du flux au niveau des échantillons ;
- le plan de travail plein est conseillé pour éviter le passage de contaminant dans le bac de rétention (produits pulvérulents, animaux, etc.).

**ENCADRÉ**

La barrière immatérielle constituée par la veine de garde n'a pas une efficacité absolue. C'est la contrepartie de la facilité d'accès à la manipulation. Toutefois, la normalisation est suffisamment rigoureuse pour qu'un PSM **bien installé, bien entretenu et** *bien utilisé* offre une protection efficace. Les PSM doivent être vérifiés par du personnel spécialisé au moins une fois par an (comptage de particules, vitesse de soufflage, recherche de fuite au niveau du filtre, etc.)

### *Comment utiliser un PSM II*

La zone où est installé le PSM doit être choisie dans un environnement limitant les perturbations de l'air (pas de portes, fenêtres, passages, etc.). Il est impératif de limiter les circulations dans la pièce pendant les manipulations. Les courants d'air ainsi générés peuvent occasionner une rupture de la veine de garde risquant de provoquer des fuites de produits vers le laboratoire ou de contaminer le produit manipulé.

La constance de l'air entrant sera d'autant plus difficile à gérer que le PSM a une ouverture frontale large. Il est donc vivement conseillé de choisir la taille du PSM en fonction des manipulations et de proscrire l'usage de PSM à deux postes de travail.

Il est intéressant de rappeler de manière détaillée le principe des PSM (à titre d'exemple, ici, le PSM II ; fig. 9.8).

Les distances frontales et latérales entre le PSM et les différents obstacles ainsi que la distance sous plafond doivent être conformes à celles indiquées par le constructeur.

Il est vivement conseillé de laisser le PSM en régime de veille et de le mettre en fonctionnement (régime de travail) avant la manipulation.

Une procédure de nettoyage-désinfection du PSM doit être écrite. Le nettoyage doit être pratiqué avant et après chaque manipulation à l'aide de chiffonnettes libérant peu de particules (non tissées), alors que le PSM est en marche afin d'éviter la stagnation des particules. Il est impératif de ne jamais poser un chiffon dans le PSM car celui-ci et/ou ses constituants peuvent être aspirés par le ventilateur et s'insérer dans les palettes, occasionnant une augmentation du

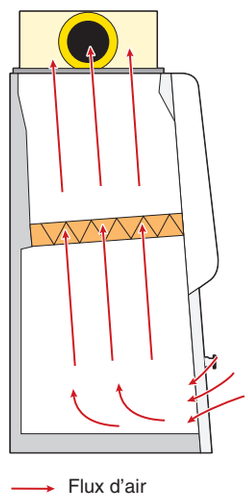



**Fig. 9.5.** – *PSM I.*
Ce flux assure la protection de l'opérateur par écoulement d'air vers l'enceinte placée en dépression.

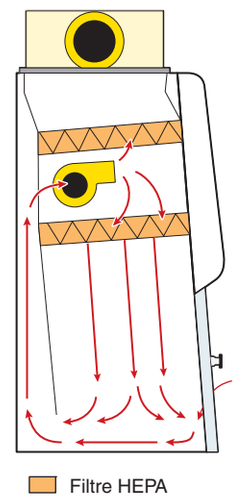



**Fig. 9.6.** – *PSM II.*
Le flux d'air filtré est orienté vers le produit manipulé. L'air, puisé dans l'ambiance de travail (veine de garde), est acheminé vers le plenum soit directement (PSM II A), soit après passage au travers d'un filtre HEPA (PSM II B).

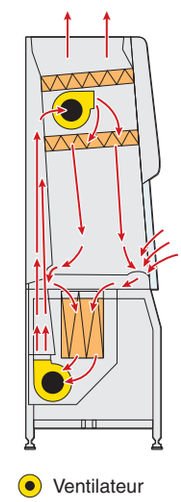



**Fig. 9.7.** – *PSM III.*
L'air entrant dans le PSM III est filtré de même que l'air extrait. Ce type de PSM est obligatoire pour les manipulations des agents biologiques du groupe 4.

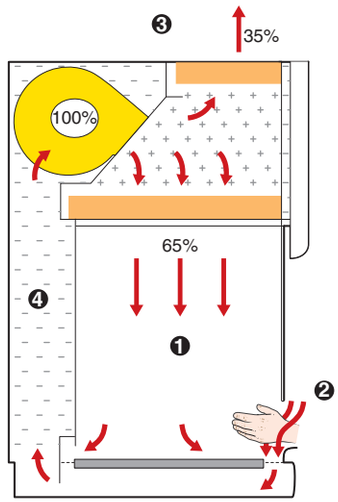



Fig. 9.8. – *Schéma de fonctionnement d'un PSM II.* Le flux d'air qui arrive sur le plan de travail est « laminaire ». La filtration sur filtre HEPA assure la **protection de la manipulation**. ❶ L'apport d'air neuf par la façade participe à la création d'une barrière aéraulique (veine de garde) qui assure la **protection du manipulateur**; ❷ cette barrière peut être compromise par les turbulences générées par le manipulateur ou l'encombrement excessif du plan de travail. Une quantité d'air égale à celle qui forme la veine de garde est évacuée hors de l'enceinte après filtration sur filtre HEPA : **protection de l'environnement** ❸. Le flux est repris dans les bandeaux d'aspiration ❹ du plan de travail puis soufflé dans le plenum de répartition et dirigé en partie vers le filtre de rejet et en partie vers la chambre de manipulation (recyclage).

bruit, et entraîner un colmatage de filtre par augmentation de la perte de charge à laquelle le ventilateur est soumis.

### *Consignes de travail*

Il est utile de rappeler un certain nombre de précautions à respecter pour travailler dans un PSM.

#### Vérification du PSM

Mettre le PSM en vitesse normale 5 à 15 minutes avant de manipuler (se référer au guide fourni par le constructeur) et vérifier le bon fonctionnement du PSM (manomètre ou indicateur visuel).

#### Préparation de la manipulation

- Préparer soigneusement la manipulation en réunissant au préalable le matériel nécessaire, récipient pour déchets, etc.
- Répartir les zones propres et les zones contaminées au sein du PSM et respecter un circuit du propre vers le sale sans croisement.
- Limiter au strict minimum le matériel introduit sous le PSM (perturbation du flux et réduction voire annulation de la sécurité du manipulateur).
- Éviter d'introduire sous le PSM des produits « polluants » (sources de poussières) tels que papier, gomme, crayon, carton, etc.
- Nettoyer et dépoussiérer tout objet devant être introduit dans la chambre de manipulation (risque de colmatage du filtre).
- Écrire les procédures.
- Vérifier que les grilles de reprise sont parfaitement dégagées (en particulier celles situées à l'arrière du plan de travail).

#### Manipulation

- Porter une tenue adaptée à la zone de confinement et, a minima, des gants, un masque et une surblouse.
- Définir et respecter la position du manipulateur. En application de la norme EN 2469, les fabricants de PSM auront pour obligation de définir la zone du plan de travail où l'on peut manipuler « en sécurité ».
- Proscrire l'emploi d'une source de chaleur dans le PSM (perturbation du flux et altération des filtres).
- Ne pas effectuer de mouvements rapides à l'intérieur du PSM pendant le fonctionnement (risque de rupture de la veine de garde).
- Ne pas projeter de liquide ou de solide sur la face du filtre. De même, ne pas accrocher ou suspendre d'objet sur les grilles de soufflage.
- Ne jamais manipuler de produits toxiques mutagènes ou des solvants sous une hotte à flux laminaire vertical (PSM).

#### Fin de manipulation

- Retirer **tout** le matériel du PSM.
- Laisser le PSM fonctionner en régime de travail au moins 10 minutes avant la mise en régime de veille ou d'arrêt.

#### Écrire les procédures, les respecter, les évaluer

## Protections individuelles

Aucun équipement de laboratoire, aussi performant soit-il, n'est à lui seul un gage de protection absolue. Les comportements individuels peuvent être des facteurs de risque pour lesquels la prévention passe par la formation et l'information du personnel.

## Hygiène de base

Il est interdit de boire, manger ou fumer dans le laboratoire. Ces règles sont clairement rappelées dans l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA).

Une tenue remplace les vêtements de ville ; elle est spécifique au laboratoire.

Les mains et les poignets sont nus (pas de bagues, faux ongles, montres, bracelets, etc.) pour faciliter l'hygiène des mains simple lavage au savon doux et désinfection des mains avec une solution hydroalcoolique (SHA).

## Gants

Moyen de protection efficace, en particulier contre la transmission cutanéomuqueuse, les gants ne doivent pas devenir une seconde peau.

Les gants répondent à des normes de fabrication et doivent être adaptés au geste effectué. La protection qu'ils offrent est soit inscrite sur la boîte, soit disponible auprès du fabricant. Les pictogrammes, quant à la protection offerte par les gants, sont rapportés dans la figure 9.9.

Les gants sont à **usage unique** (sauf cas particuliers : gants de ménage, gant de protection contre le froid – azote liquide, etc.).

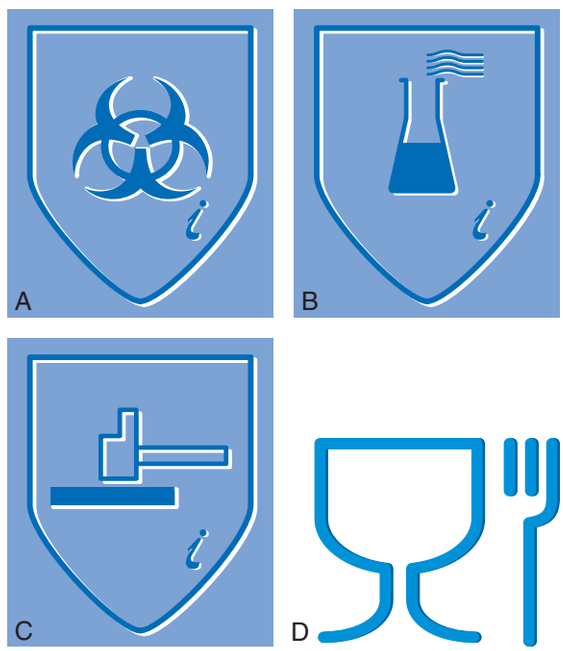



Fig. 9.9. – *Exemples de pictogrammes utilisés pour les gants.*
A) Protection contre le risque biologique. B) Protection contre le risque chimique. C) Protection contre le risque mécanique. D) Contact alimentaire possible.

Ils doivent être portés sur des **mains propres** :
- lors de manipulations septiques, mais aussi à la réception des prélèvements ;
- impérativement en cas de lésions des mains.

Ils doivent être ôtés :
- pour tout acte « propre » : téléphone, clavier ordinateur, etc. ;
- pour tout contact cutané : visage, lèvres, yeux (lunettes), etc.

Il ne faut pas oublier que les gants deviennent poreux par interaction avec les agents chimiques (par exemple les désinfectants) contenus dans les produits manipulés. La transpiration augmente aussi la porosité des gants en latex par absorption de la sueur par le latex.

Le choix des gants se fera en fonction du risque évalué et en conformité avec les normes (fig. 9.9).

De même, un certain nombre de précautions contribue à faire du port de gants une barrière efficace contre le risque infectieux :
- éviter un étirement excessif des gants lors de l'enfilage ;
- ne pas utiliser de crèmes émollientes à base de vaseline ou paraffine avant le port des gants ;
- choisir la bonne taille : les gants ne doivent pas être ni trop larges ni trop étroits à la base des doigts ou aux poignets ;
- inspecter les gants à l'enfilage pour s'assurer qu'ils ne présentent ni trous ni déchirures ;
- ajuster les gants à la base des doigts ;
- changer les gants régulièrement entre les différents actes et dès qu'ils sont endommagés ;
- réduire le risque de déchirure ou de perforation en gardant les ongles courts et propres, en enlevant tous les bijoux ;
- se laver les mains avant et après le port de gants ;
- tenir compte de la durée du port des gants (le gant s'altère) ;
- respecter les indications (protocoles).

## Masques ou équipements de protection individuels (EPI)

Les masques constituent un moyen de protection efficace contre la transmission aérienne due aux aérosols, à condition qu'ils soient adaptés et correctement portés. Les masques de soins, qui sont conçus pour éviter la transmission de gouttelettes de salive ou de sécrétions respiratoires du soignant vers le patient, ne sont pas adaptés (fig. 9.10). Il faut choisir des masques conçus pour protéger la personne lors de l'inspiration (fig. 9.11 et 9.12). Ce sont des demi-masques de protection respiratoire désignés par la norme EN 149 par le terme de FFP (*filtering facepiece particles*) dont l'efficacité dépend du matériau filtrant, mais aussi de l'étanchéité entre le masque et le visage (tableau 9.4). Le choix du masque se fait en fonction du risque lié aux agents manipulés et/ou aux manipulations (en particulier risque d'aérosolisation).

**Fig. 9.10.** – *Masque médical pour la protection des autres.*

**Fig. 9.11.** – *Masque de protection respiratoire pour la protection de celui qui le porte.*

**Fig. 9.12.** – *Masque de protection respiratoire « à valve » (protection de celui qui le porte).*

**TABLEAU 9-4**

**Performances des masques de protection respiratoire.**

| *Désignation du masque* | *Pénétration du filtre* | *Fuite totale du masque* |
|---|---|---|
| FFP1 | <20 % | <22 % |
| FFP2 | <6 % | <8 % |
| FFP3 | <0,05 % | <2 % |

Le choix du masque se fera en fonction du risque des micro-organismes manipulés. Ainsi, pour le choix d'un masque de protection contre la tuberculose en milieu de soins, le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) préconise un masque de protection respiratoire de type FFP1 au minimum pour les soignants et les visiteurs au contact du patient contagieux, et d'un masque FFP2 dans des situations particulièrement à risque (tuberculose multirésistante, expectoration induite, etc.) (avis du CSHPF du 14 mars 2003).

Il n'existe pas de recommandations pour les laboratoires, mais pour la manipulation des mycobactéries, un masque équivalent à celui préconisé pour les soins prodigués aux patients tuberculeux paraît constituer un minimum requis, notamment pour la manipulation des tubes de culture lors de leur transport entre les étuves et les postes de sécurité microbiologiques.

Le choix d'un masque à valve limite la gêne respiratoire entraînée par le haut pouvoir filtrant, mais il ne faut pas oublier que la valve s'ouvre à l'expiration et que, de ce fait, l'environnement peut être contaminé par les micro-organismes rejetés avec l'expiration.

Quel que soit le type de masque, pour offrir une réelle protection et éviter que l'air inspiré ne passe par les fuites entre le visage et le masque, celui-ci doit être bien ajusté au visage (fig. 9.13), ce qui peut être difficile chez les hommes barbus.

**ENCADRÉ**

Un masque est personnel. Une fois utilisé conformément aux préconisations du fabricant, il doit être éliminé avec les déchets à risque infectieux.

## Gestes de routine

Quels que soient le niveau de risque et les postes de travail, le respect des règles générales de bonnes pratiques constitue la base de la sécurité au laboratoire. Ces règles commencent par une bonne organisation des locaux qui doivent permettre la distinction formelle des secteurs non exposés (bureaux, zones de repos, etc.) et des secteurs exposés où sont manipulés les produits biologiques et le matériel souillés (pièces techniques, pièce de prélèvements, zone de réception des échantillons, laverie, etc.). La circulation au sein du laboratoire doit être aisée.

Le tableau 9.5 liste quelques règles de base de manipulation des produits pathologiques.

## Risques particuliers : biologie moléculaire, organismes génétiquement modifiés (OGM)

La biologie moléculaire constitue une science récente et en plein essor. Elle connaît de multiples applications

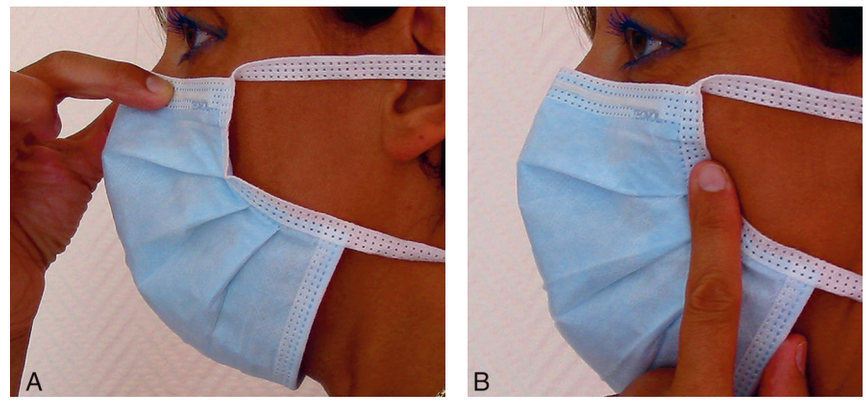



**Fig. 9.13.** – *Points importants pour la mise en place du masque de protection respiratoire.*
A) Le masque doit bien adhérer sur le nez et bien envelopper le menton. B) Le masque doit bien adhérer sur les joues pour éviter « la fuite au visage ».

tant dans le domaine médical (micro-organismes génétiquement modifiés entre autres) que non médical (agriculture, justice, étude des populations, etc.).

Les manipulations de génie génétique doivent s'accompagner des mesures de confinement correspondantes.

Compte tenu des risques particuliers causés par les OGM, la définition de la Commission de génie génétique (CGG) des niveaux de confinement LI, L2, L3 et L4 (tableau 9.5) est plus contraignante que celle de l'arrêté de 1996. En particulier, pour minimiser la dissémination d'OGM, l'inactivation des déchets avant élimination est nécessaire dès le niveau L1 de confinement.

Les contraintes correspondant à une classe de confinement donnée comprennent dans tous les cas la totalité des contraintes des classes inférieures.

Toute expérience réalisée dans un laboratoire ayant un type de confinement donné doit se conformer aux pratiques de travail propres à ce laboratoire (même si certaines de ces expériences comportent des risques plus limités).

Un exemplaire des règles à suivre à l'intérieur des locaux L2, L3, L4 doit être affiché à l'entrée de chaque laboratoire.

Lorsque les expérimentations comportent la manipulation d'organismes biologiques pathogènes, les personnes directement impliquées dans la réalisation des expériences doivent être soumises à un traitement prophylactique approprié (vaccination, absorption de substances chimiques, etc.) en accord avec le médecin du travail.

Des dispositifs permettant une inactivation immédiate des organismes biologiques manipulés doivent être disponibles dans chaque laboratoire.

Les locaux doivent être maintenus propres et en ordre pour faciliter le respect des bonnes pratiques de travail.

**TABLEAU 9-5**

**Présentation schématique de quelques risques associés à des gestes de routine et aux mesures préventives à mettre en œuvre.**

| *Geste* | *Exposition au risque, si* | *Prévention* |
|---|---|---|
| Réception des prélèvements | Mauvaises conditions de conditionnement et de transport : fuites, bris, etc. | Prévoir des conditionnements adaptés<br>Zone de réception spécifique<br>Tenue adaptée (au minimum des gants)<br>Lavage des mains régulier : prévoir un poste de lavage des mains dans cette zone |
| Pipetage<br>Rappel : il est proscrit de pipeter à la bouche | Aérosol du fait de présence d'air dans la pipette | Ne pas expulser violemment le liquide hors de la pipette<br>Ne jamais flamber une pipette avec du liquide à l'intérieur (N.B. : l'utilisation d'une flamme est proscrite dans un PSM) |

| *Geste* | *Exposition au risque, si* | *Prévention* |
|---|---|---|
| Ouverture de tubes, boîtes de Petri, etc. | L'humidité générée par la culture peut entraîner un aérosol au moment de l'ouverture | Ouvrir impérativement dans la zone sécurisée (poste de travail) ou, mieux, dans l'enceinte de sécurité (PSM II) |
| Centrifugation | Risque d'aérosol : la vitesse augmente la dispersion d'un aérosol et le rend d'autant plus dangereux<br>Risque de tube cassé | Centrifuger dans des plots parfaitement clos, facilement nettoyables, voire autoclavables<br>S'assurer de l'équilibrage de la centrifugeuse pour éviter le risque de tubes cassés |
| Homogénéisation, Vortex | Risque d'aérosol | Utiliser des tubes hermétiquement clos (à vis)<br>Laisser reposer avant d'ouvrir<br>Ouvrir avec précautions, si possible dans une enceinte de sécurité (PSM II) |
| Manipulation des prélèvements solides (biopsie, fragments de pièces chirurgicales, etc.) | Risque de coupures (scalpel, ciseaux, etc.) | Porter des gants<br>Connaître les procédures applicables aux blessures et accidents d'exposition au sang (AES) |
| Ensemencements, manipulation des cultures | Aérosol<br>Bris de pipette (coupure) | Travailler dans un poste de sécurité (type PSM)<br>Utiliser du petit matériel plastique à usage unique (anses, râteaux, etc.) |
| Envoi de souches ou de produits biologiques | Détérioration de l'emballage<br>Contamination des « civils » | Emballage conforme aux normes de la classe 6.2 de l'ONU* (fig. 9.14) |

* Réglementation relative au transport par route des matières dangereuses : arrêté du 5 décembre 1996 modifié dit « ADR ».

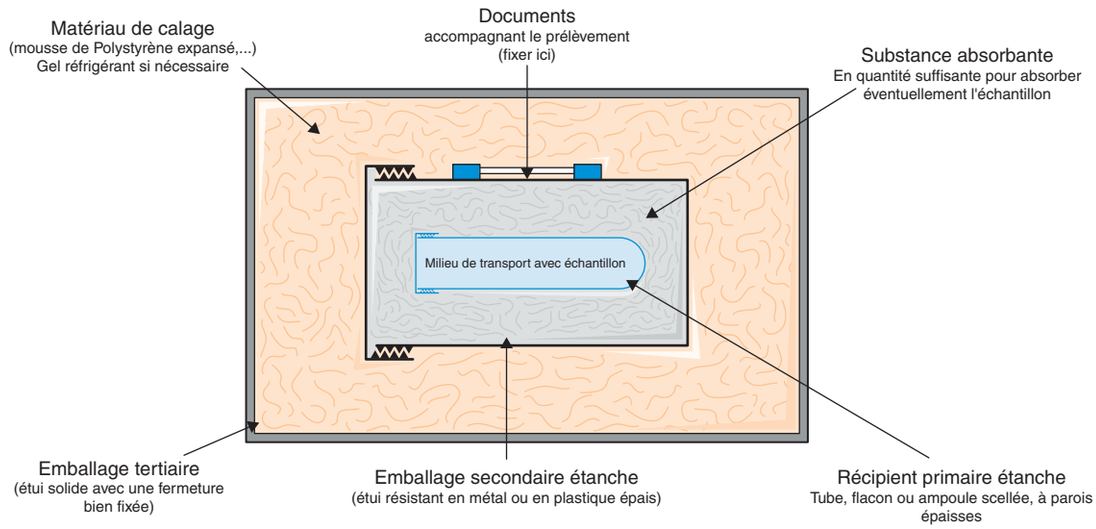



**Fig. 9.14.** – *Schéma d'un triple emballage suivant les normes de la classe 6.2 de l'ONU.*

Seule une application intégrale et simultanée de toutes les normes de sécurité appropriées peut permettre une protection réelle des expérimentateurs, de l'environnement et du matériel biologique expérimental.

## Gestion des déchets

« L'élimination des déchets doit être conforme à la législation et à la réglementation en vigueur. Elle doit

être conduite de manière à respecter la réglementation et à ne pas compromettre la santé du personnel du laboratoire ni celui chargé de la collecte des déchets et à ne pas polluer l'environnement » (GBEA annexe II-6-1).

La loi 75-633 du 15 juillet 1975 modifiée, relative à l'élimination des déchets, rend responsable le producteur de ses déchets tout au long de la filière d'élimination, c'est-à-dire du tri jusqu'au traitement terminal en passant par l'entreposage, la collecte et le transport. Le décret 97-1048 du 6 novembre 1997 confirme ces obligations en les précisant.

Les déchets de laboratoire sont assimilés aux déchets d'activité de soins à risque infectieux (DASRI) et répondent à l'obligation de désinfection ou d'incinération de tous les déchets contaminés. Ils sont soumis à des conditions de transport strictes (arrêté dit ADR) communes à toutes les réglementations pour les transports des marchandises dangereuses (TMD) par chemin de fer, par route ou par voie de navigation intérieure où les matières infectieuses sont classées dans la classe 6-2, suivant la classification à 13 classes de danger. La grande majorité des DASRI y est classée sous le chiffre 4°b (code ONU 3291, déchets d'hôpital non spécifié). Les déchets qui relèvent des groupes de risques 3 et 4 (les mycobactéries tuberculeuses relèvent, rappelons-le, du groupe 3) sont à classer respectivement sous les chiffres 2° et 1° de la classe 6-2, ce qui implique des conditions d'emballage et de transport bien plus contraignantes que pour les déchets classés sous 4°b. Le ministère chargé de la Santé préconise un autoclavage de ces déchets pour diminuer le risque infectieux (sans toutefois le supprimer) et pour classer ces déchets sous 4°b. Lorsque l'emballage est autoclavé avec son contenu, il devra être suremballé dans un emballage conforme aux exigences réglementaires en vigueur pour les matières du 4°b de la classe 6.2, avec en particulier le symbole graphique de « risque biologique » de dimensions extérieures minimales de 20 mm × 20 mm (fig. 9.15).

Les emballages pour DASRI sont de couleur jaune, étanches, à usage unique et sont soit conformes à la réglementation des transports, soit suremballés dans des récipients conformes à cette réglementation.

Les déchets perforants sont à éliminer dans des conteneurs rigides (norme Afnor NF X30–500, version corrigée avril 2009) même s'ils n'ont pas été mis en contact avec un produit biologique (aiguille, pipette, matériel en verre, flacons, lames, etc.).

Les déchets mous sont à éliminer dans des emballages spécifiques répondant à la norme Afnor X30–501 (décembre 2006). Le compactage est interdit.

L'évacuation des déchets solides se fait par des circuits spécifiques.

Il n'y a pas encore de réglementation pour les effluents liquides de laboratoire.

Les rejets de solvants et de produits toxiques doivent se faire dans des bidons identifiés et évacués par une filière spécifique. De même, les produits mutagènes (diméthylformamide, NBT [nitro blue de tétrazolium], etc.) ou ceux contenant des substances mutagènes (gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium) doivent aussi se faire suivant une procédure spécifique (tableau 9.6).

**Fig. 9.15.** – *Symbole graphique du risque biologique (dimensions minimales : 20 mm × 20 mm).*

**ENCADRÉ**

La manipulation des produits radioactifs est soumise à une réglementation spécifique (autorisation de détention et d'utilisation de telles substances) et la filière l'élimination de ces déchets est rigoureusement contrôlée.

## Conclusion

La sécurité des laboratoires de microbiologie ne peut jamais être totale. De plus, compte tenu du fait qu'au laboratoire les prélèvements à visée diagnostique sont susceptibles de contenir n'importe quel agent infectieux, il est nécessaire d'identifier les risques et les niveaux d'exposition à ces risques à chaque poste de travail pour en déduire une stratégie adaptée au juste besoin de chacun. Cette maîtrise des risques repose sur la réduction voire la suppression de ceux-ci chaque fois que cela est possible et intègre, pour les risques résiduels, les aspects organisationnels et techniques, la prévention médicale et la formation des personnels concernés.

Il est indispensable d'examiner avec un œil critique toutes les étapes de la chaîne allant du prélèvement à l'étude et à la conservation des souches jusqu'à l'évacuation et au traitement des déchets.

Enfin, il ne suffit pas de redoubler d'attention lors de l'installation ou de la mise en place des techniques et d'écrire les procédures ; encore faut-il éviter les dérives spontanées insidieuses, parfois dangereuses, en les recherchant lors d'audits réguliers internes ou externes.

**TABLEAU 9-6**

**Récapitulatif des exigences de confinement et des pratiques de laboratoires (Commission de génie génétique [CGG], janvier 2000).**

| *Mesures de confinement* | *Niveaux de confinement* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *1* | *2* | *3* | *4* |
| *Conception du laboratoire* | | | | |
| 1. Signalisation du laboratoire (pictogramme « danger biologique ») | Non | Oui | Oui | Oui |
| 2. Laboratoire séparé des autres locaux au moins par porte | Oui | Oui | Oui | Oui |
| 3. Accès au laboratoire via un sas | Non | Non | Oui | Oui |
| 4. Accès réglementé et verrouillable. Accès possible pour les seuls travailleurs autorisés | Non | Non | Oui, par un sas | Oui, par un sas |
| 5. Possibilité de fermer hermétiquement le lieu de travail pour permettre la désinfection (fumigation) | Non | Optionnel | Oui | Oui |
| 6. Filtration de l'air extrait du lieu de travail | Non | Non | Oui, filtre HEPA | Oui, double filtre HEPA |
| 7. Filtration de l'air entrant dans le lieu de travail | Non | Non | Optionnel | Oui |
| 8. Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un système équivalent permettant de voir les occupants | Non | Non | Oui | Oui |
| 9. Moyen de communication avec l'extérieur | Non | Non | Optionnel | Oui |
| 10. Maintien d'une pression négative dans le laboratoire par rapport aux zones voisines | Non | Non | Oui[2] | Oui |
| 11. Alarme pour détecter tout changement inacceptable de la pression de l'air | Non | Non | Oui | Oui |
| 12. Approvisionnement en énergie électrique de secours | Non | Non | Optionnel | Oui |
| 13. Système de ventilation de secours | Non | Non | Non | Oui |
| *Aménagements internes* | | | | |
| 1. Poste de sécurité microbiologique | Non | Oui, type II | Oui, type II | Oui, type II ou type III |
| 2. Vêtement de protection | Oui | Oui | Vêtements adaptés et surbottes | Change complet avant entrée et sortie du laboratoire |
| 3. Aménagements pour ranger les vêtements de protection dans le laboratoire | Non | Oui | Oui | Oui |
| 4. Douche pour décontaminer les travailleurs | Non | Non | Optionnel | Oui |
| 5. Lavage des mains : lavabos avec robinets pouvant être manœuvrés sans les mains | Non | Oui[1] | Oui | Oui |
| 6. Résistance des surfaces à l'eau, nettoyage aisé sans endroits inaccessibles au nettoyage | Oui (sols) | Oui (sols) | Oui (sols, murs et plafonds) | Oui (murs, plafonds, sols, résistants aux nettoyants chimiques) |
| 7. Surface des paillasses imperméable à l'eau, résistante aux acides, alcalis, solvants et désinfectants | Oui | Oui | Oui | Oui |
| 8. Lutte efficace contre les vecteurs, par exemple rongeurs et insectes | Oui | Oui | Oui | Oui |
| 9. Présence d'un autoclave | Oui, sur le site | Oui, dans le bâtiment | Oui, dans le laboratoire, double entrée[2] | Oui, dans le laboratoire, double entrée |
| 10. Équipement de base spécifique dans le laboratoire (matériel marqué) | Non | Non | Oui | Oui |

(*Suite*)

TABLEAU 9-6

**Suite.**

| *Pratiques opératoires* | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1. Stockage des agents biologiques en lieu sûr | Oui | Oui | Oui | Oui, accès protégé |
| 2. Manipulation des matières infectées et de tout animal contaminé dans un système approprié de confinement[3] | | Optionnel | Oui | Oui |
| 3. Utilisation de conteneurs spécifiques pour aiguilles contaminées, objets piquants ou tranchants souillés | Oui | Oui | Oui | Oui |
| 4. Contrôle de la dissémination des aérosols formés | minimiser | minimiser | empêcher | empêcher |
| 5. Gants | Optionnel | Optionnel | Oui | Oui |
| 6. Inactivation : matériel contaminé et déchets | Oui | Oui | Oui | Oui |
| 7. Décontamination des équipements avant sortie du laboratoire (centrifugeuses, PSM, etc.) | Oui | Oui | Oui | Oui |
| 8. Inactivation des effluents : éviers et douches | Non | Non | Oui | Oui |

Oui : exigence.
Non : pas d'exigence.
Optionnel : doit être décidé, au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront – ou non – être appliquées.
1 Pour les nouvelles installations.
2 Des dérogations exceptionnelles à cette prescription peuvent être accordées. Consulter le paragraphe III de l'annexe III.1 du guide de la CGG.
3 Lorsque des animaux de laboratoire sont délibérément contaminés par un ou plusieurs agents pathogènes, ils doivent être manipulés ou hébergés dans des locaux répondant aux conditions et niveaux de confinement requis du fait de la classification du ou des agents pathogènes utilisés.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Balty I, Belhanini B, Clermont H, et al. Postes de sécurité microbiologique, postes de sécurité cytotoxique. Choix et utilisation. Cahiers de notes documentaires ND 2201, 2003 ; 193 : 37–52.

Brendel A. Postes de sécurité microbiologique Certification et caractéristiques. Prévention Infos CNRS 2004 ; 14 : 1–3.

INRS. Conception des laboratoires d'analyses biologiques. INRS ed ; 2007 Ed 999 avril. Disponible sur http://www.inrs.fr.

Laboratory Biosafety Manual. Genève : WHO ed ; 2003.

OMS. Manuel de sécurité biologique au laboratoire. 3e éd. Organisation Mondiale de la Santé ; 2005.

REMIC. In : Mesures d'hygiène, de sécurité et de sûreté biologique au laboratoire. 2010. p. 299–308.

Sewell DL. Laboratory-associated infections and biosafety. Clin Microbiol Rev 1995 ; 8 : 389–405.

SFHH. Prévention du risque infectieux dans les laboratoires d'analyses médicales. Hygiènes 2007 ; 15 : 405–524.

Texte JC. Précautions d'emploi des postes à flux unidirectionnels. Salles Propres 2003 ; 28 : 43–4.

Touche S, Fleury L, Berlie C, et al. Risques infectieux dans les laboratoires d'analyses médicales. DMT 2000 ; 83 : 233–9.

Touche S, Leprince A, Abiteboul D. Maîtrise du risque infectieux en laboratoire de microbiologie. Hygiènes 2002 ; 10 : 118–31.

**TEXTES RÉGLEMENTAIRES**


Directive 2000/54/CE du Parlement et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant les travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. Journal Officiel CE, L.262 du 17 octobr 2000 ; 21–45 ce.

Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.

Arrêté du 30 juillet 2004 relatif à la mise en œuvre, l'importation, l'exportation, la détention, la cession à titre gratuit ou onéreux, l'acquisition et le transport de certains agents responsables de maladies infectieuses, micro-organismes pathogènes et toxine.

Arrêté du 24 avril 2002 portant homologation du règlement relatif aux bonnes pratiques de transport des prélèvements, produits et échantillons issus du sang humain.

Arrêté du 25 avril 2000 modifiant l'arrêté du 5 décembre 1996 modifié (dit «arrêté ADR») relatif au transport des marchandises dangereuses par route. JO du 27 juin. 2000 ; 9661–973.

Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. JO 1999 ; du 11 décembre.

Arrêté du 7 septembre 1999 relatif au contrôle des filières d'élimination des déchets d'activité de soins à risque infectieux et assimilés et des pièces anatomiques. JO ; du 3 octobre 1999, 14686–91.

Arrêté du 6 janvier 2006 modifiant l'arrêté du 24 novembre 2003 relatif aux emballages des déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés et des pièces anatomiques d'origine humaine.

Guide technique : élimination des déchets d'activités de soins à risques. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité ; 1999.

Décret 97-1048 du 6 novembre 1997 relatif à l'élimination des déchets d'activité des soins à risque infectieux et assimilés et des pièces anatomiques et modifiant le Code de la santé publique. JO du 18 novembre. 1997 ; 16675–6.

Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes (JO du 30 juillet 1994) modifié par les arrêtés du 17 avril 1997 (*JO* du 26 avril 1997) et du 30 juin 1998. JO 22 juillet ; 1998 ; 11207–8.

Circulaire DH/S 12 DGS/VS3 n° 554 du 1er septembre 1998 concernant la collecte des objets piquants, tranchants souillés.

Décret n° 2010-736 du 30 juin 2010 relatif aux micro-organismes et toxines. JO 1er juillet 2010.

Arrêté du 30 juin 2010 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique. JO 1er juillet 2010.

Arrêté du 30 juin 2010 fixant les renseignements qui figurent dans le registre ou les enregistrements mentionnés à l'article R. 5139-17 du Code de la santé publique, notamment les modalités de leur tenue et les informations qu'ils contiennent. JO 1er juillet 2010.

Arrêté du 30 juin 2010 fixant les renseignements qui figurent sur l'autorisation mentionnée à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. JO 1er juillet 2010.

Arrêté du 30 juin 2010 fixant les mentions qui figurent sur les états annuels des stocks prévus à l'article R. 5139-14 du Code de la santé publique. JO 1er juillet 2010.

Décision du 20 octobre 2010 fixant le contenu du dossier technique mentionné à l'article R. 5139-3 et accompagnant la demande d'autorisation prévue à l'article R. 5139-1 du Code de la santé publique. JO 4 novembre 2010.

CHAPITRE

10

# L'accréditation au laboratoire de bactériologie

N. Hidri, V. Marzuck

## Généralités

### Introduction

Le concept de qualité fait partie intégrante du monde industriel et commercial. La qualité est définie comme « l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'une entité (produit, service, activité, organisme, système, personne, etc.) conférant l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites » [2].

La qualité est un concept qui a émergé avant la Deuxième Guerre mondiale avec Taylor, Shewhart, Deming et Juran. En 1926 est créée l'Agence française de normalisation (Afnor), en 1987, les normes ISO (*International Organization for Standardization*).

En biologie médicale, un contrôle de qualité national est instauré en 1978 « pour assurer la fiabilité et le perfectionnement des analyses de biologie médicale dans l'intérêt général de la santé publique et permettre à chaque laboratoire de vérifier la valeur de ses techniques et son bon fonctionnement ».

Un arrêté rendit obligatoire en 1994 le Guide de bonne exécution des analyses (GBEA), qui fut révisé en 1999.

Une réforme de la biologie médicale est engagée en 2007 et a pour objectif de « permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée, payée à son juste prix, dans un contexte européen ».

L'accréditation permet une reconnaissance de la compétence du laboratoire de biologie médicale (LBM), fondée sur une évaluation des pratiques par les pairs avec le soutien de qualiticiens. Elle a pour objectif de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale et la qualité de la prestation médicale offerte par le LBM [4].

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale par le Comité français d'accréditation (Cofrac) selon la norme EN NF ISO 15 189 est devenue une obligation réglementaire depuis la parution de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Elle a été abrogée en février 2011, mais une révision est en attente.

Elle sera effective le 1er novembre 2016 pour l'ensemble des LBM implantés en France. Au 1er novembre 2013, les LBM devront prouver leur entrée dans cette démarche d'accréditation selon les modalités décrites dans l'arrêté du 14 décembre 2010 (fig. 10.1).

Une seule accréditation est délivrée pour l'ensemble des sites du LBM, ainsi que les structures ou personnes externes au LBM qui concourent à la réalisation des examens de biologie médicale [4]. Elle porte sur la totalité des activités du LBM : de la phase préanalytique à la phase postanalytique.

### Définitions

**Accréditation** : procédure selon laquelle un organisme faisant autorité (Cofrac) fournit une reconnaissance formelle selon laquelle une personne ou un organisme est compétent pour réaliser des tâches spécifiques.

Ou : reconnaissance de la conformité de l'organisation d'un laboratoire et de sa compétence par un organisme accréditeur (la certification ne reconnaît que l'organisation).

**Action corrective** (ISO 9000) : action visant à éliminer la cause d'une non-conformité ou d'une autre situation indésirable détectée.

**Action préventive** (ISO 9000) : action visant à éliminer la cause d'une non-conformité potentielle ou d'une autre situation potentielle indésirable détectée.

**Audit** (ISO 9000) : processus méthodique, indépendant et documenté, permettant d'obtenir des preuves (enregistrements, etc.) et de les évaluer de manière objective pour déterminer dans quelle mesure l'ensemble des politiques, procédures ou exigences est satisfait. Ce terme doit être abandonné pour « évaluation ».

**Contrôle de qualité** : l'action de mesurer, d'examiner, d'essayer une ou plusieurs caractéristiques et de les comparer aux exigences spécifiées en vue d'établir leur conformité et, sinon, de mettre en évidence des défauts et de déclencher des actions correctives (Afnor, 1992).

**Guide technique d'accréditation :** document formulant des recommandations du Cofrac à destination des différentes parties intéressées pour l'évaluation et l'accréditation. Ce document ne comporte pas d'élément opposable.

**Manuel d'assurance qualité (MAQ)** : document interne qui définit la politique qualité du laboratoire de biologie médicale ou de la structure et qui décrit le système de management de la qualité.

**Non-conformité** (ISO 9000) : non-satisfaction d'une exigence. Un événement est classé comme une non-conformité quand il s'écarte d'une politique, d'un processus ou d'une procédure du laboratoire et ne satisfait donc pas une des exigences du manuel qualité ou des contrats avec des clients (patients, prescripteurs, autres laboratoires).

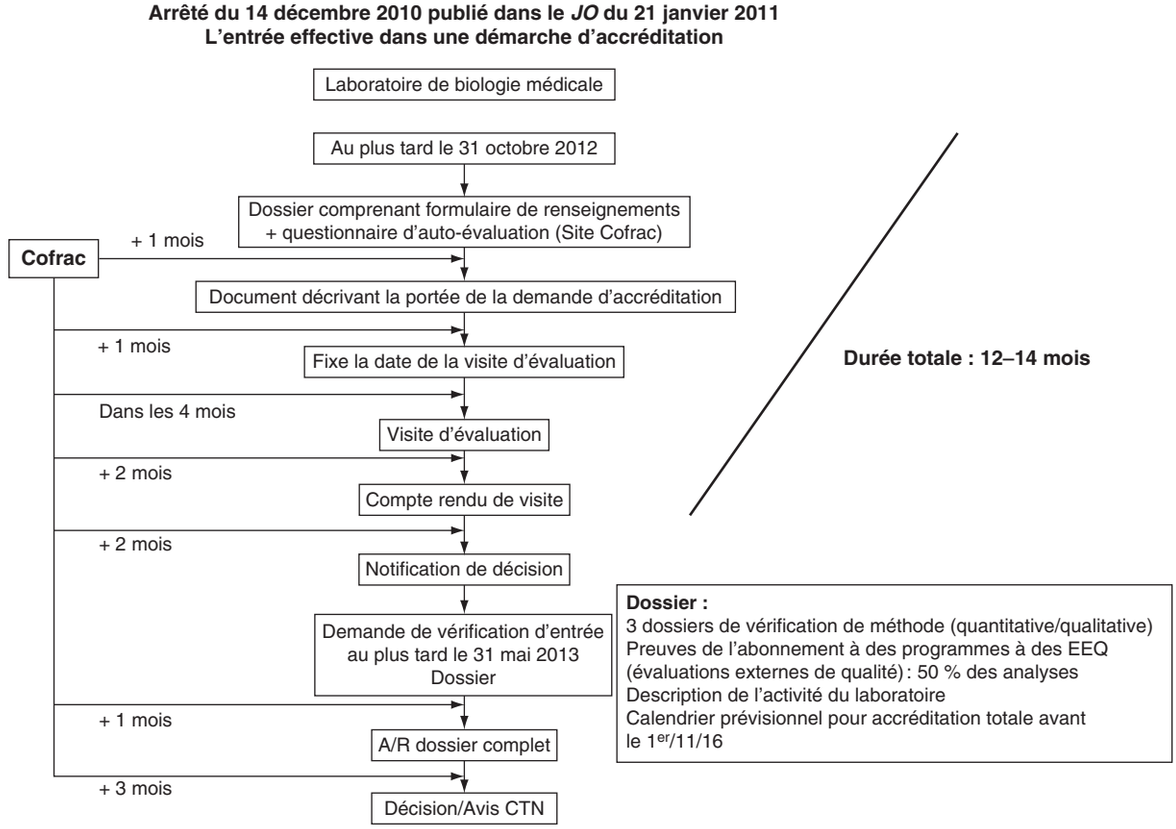



Fig. 10.1. – *Description des étapes pour l'entrée effective d'un LBM dans une démarche d'accréditation, selon l'option A.*

**Portée d'accréditation** : énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le LBM demande une accréditation ou est accrédité.
**Qualité** : aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences (ISO 9000, 2000).
**Validation d'une technique** : confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation déterminée sont remplies (extrait de la norme NF EN ISO/CEI 17025).

## Assurance qualité

L'assurance qualité repose sur la mise en place d'un système de management de la qualité (SMQ). La définition d'un SMQ selon l'ISO 9000, 2005 est : « un système de management permettant d'orienter et de contrôler un organisme, c'est-à-dire permettant d'établir une politique et des objectifs en matière de qualité et de les atteindre ».

La dynamique du système de management de la qualité tend à l'amélioration continue via les résultats d'audit, l'analyse des données (enregistrements, contrôles de qualité, indicateurs), les actions correctives et préventives ainsi que la revue de direction (ISO 9001, 2008).

Cette amélioration continue peut être illustrée par la roue dite de Deming (fig. 10.2). Quatre étapes structurent toute action de qualité : une planification est l'étape première avant la réalisation. Ensuite, l'étape d'évaluation permet les ajustements nécessaires. Ces étapes sont coordonnées par le SMQ.

## *Mise en place d'un système de management de la qualité (SMQ)*

### Premières étapes (planification-réalisation) : maîtriser la qualité

#### *Les acteurs*

La direction du LBM doit s'engager dans une politique qualité définie (avec des objectifs prioritaires et des actions à mettre en œuvre). Dans un établissement de soins, la direction du LBM et la direction de l'établissement cosignent cette politique qualité.

La direction doit fournir des :

- moyens en personnel : nomination d'un responsable assurance qualité (RAQ), de référents qualité. Le RAQ peut être un biologiste ou non. Une cellule qualité doit être instituée. Elle comptera des membres représentatifs de toutes les catégories socioprofessionnelles du LBM. Elle sera l'interface entre la direction et le personnel ;

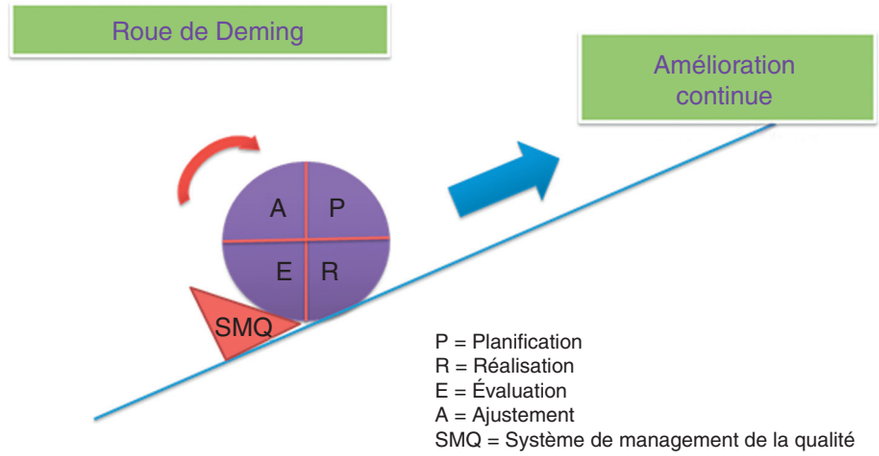



**Fig. 10.2.** – *Schématisation d'une action qualité selon le concept de la roue de Deming.*

- moyens en temps : du temps officiellement dédié à la qualité ;
- moyens matériels, financiers : absorption des surcoûts économiques éventuels, achat d'un support documentaire informatique accessible à tous et facile à gérer.

Tout le personnel du LBM est informé des enjeux et doit être acteur de cette politique qualité. Il doit être formé à l'assurance qualité et à l'évaluation.

La direction du LBM doit s'assurer que des processus de communication appropriés sont établis au sein du laboratoire et que la communication relative à l'efficacité du système de management de la qualité est mise en place (NF 15 189). Cette communication peut être facilitée par des outils de type intranet.

### *Définition des objectifs et de la politique qualité*

Plusieurs étapes peuvent être distinguées.

1. Dessiner la cartographie des processus du LBM permet d'avoir une image globale et synthétique des activités du laboratoire. Elle matérialise les relations entre les processus. Elle peut servir de base d'organisation au SMQ.

   L'approche processus peut être définie comme suit : toute activité ou ensemble d'activités utilisant des ressources (matérielles, humaines) permettant la transformation d'éléments d'entrée en éléments de sortie avec une valeur ajoutée peut être considéré comme un processus. L'élément de sortie d'un processus constitue souvent l'élément d'entrée du processus suivant. La représentation graphique de ces différents processus s'appelle une cartographie des processus [3] (fig. 10.3).
2. Rassembler la documentation existante permet un inventaire exhaustif. Ensuite, la rédaction des documents qualité nécessaires est fixée par priorités ; par exemple, les documents inexistants avant la correction de documents déjà rédigés.

La gestion des documents (MAQ, procédures, modes opératoires, etc.) peut être schématisée sous forme pyramidale : documents scientifiques, formulaires d'enregistrement, documents opérationnels, procédures, MAQ, etc. (fig. 10.4).

La gestion documentaire est sous la responsabilité du RAQ.

Une procédure de gestion documentaire doit préciser les modalités pour la maîtrise de la documentation qualité, sa communication, ses révisions et modifications, son archivage, etc.

Le MAQ doit présenter le laboratoire, l'engagement de la direction, l'organisation du SMQ, les politiques, les exigences et objectifs qualité pour la prise en charge des échantillons, les performances analytiques, le retour des résultats, la gestion des non-conformités, la revue de contrat, le traitement des réclamations, la structure documentaire (plan type, chapitre 4.2.4, norme 15189) [3].

Un système de recueil des dysfonctionnements et des non-conformités doit être mis en place. Il faut distinguer les dysfonctionnements ou non-conformités majeurs nécessitant une action correctrice immédiate et ceux nécessitant un travail de réflexion pour des actions correctives et préventives.

## Deuxième étape (évaluation) – garantir la qualité

### *Indicateurs*

En principe, à tout processus correspond un indicateur. Il permet de connaître à tout moment la valeur ajoutée du laboratoire.

Il existe plusieurs types d'indicateurs : de structure, de processus, de résultat, de satisfaction du personnel, sentinelle, etc.

L'indicateur de qualité doit être SMART :

- simple, car facile à établir et à collecter ;

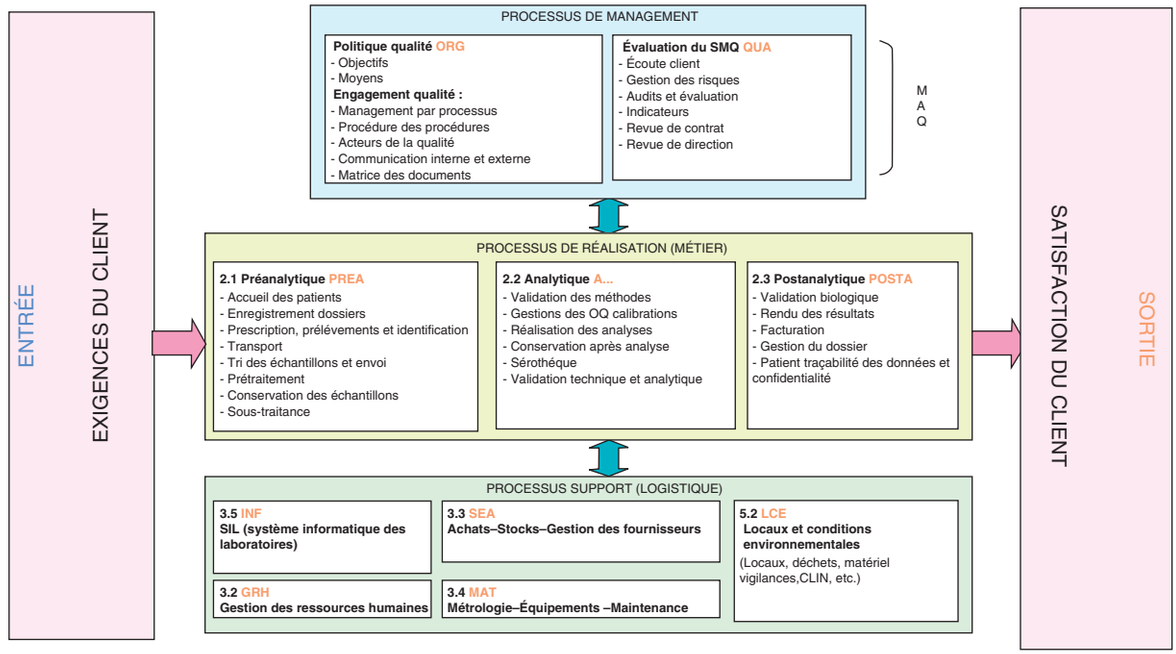



**Fig. 10.3.** – *Exemple de cartographie de processus pour un LBM.*

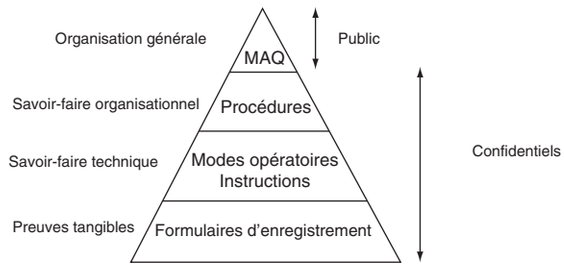



**Fig. 10.4.** – *Schématisation d'une architecture documentaire.*

- mesurable ;
- accepté : la provenance des données doit être transparente pour que l'indicateur soit accepté par tous. Il doit permettre de sensibiliser le personnel et de l'impliquer dans la démarche qualité ;
- réaliste, car pertinent, précis et fiable ;
- temporel : l'intérêt d'un indicateur réside dans sa capacité de durer dans le temps. La donnée analytique doit donc revêtir un caractère stable.

Ces indicateurs doivent être revus et analysés périodiquement.

### *Autres actions d'évaluation*

1. Gestion des non-conformités, des dysfonctionnements, des réclamations. Ils doivent être analysés par la cellule qualité avec proposition de mesures correctives et/ou préventives.
2. Suivi des contrôles internes de qualité (CIQ), des évaluations externes de qualité (EEQ) et/ou des comparaisons interlaboratoires (CIL).
3. Révision documentaire. La révision des documents du système qualité doit être entreprise à l'occasion de chaque modification et de façon régulière, tous les 2 ans sauf pour les procédures analytiques, tous les 12 mois. Dans cette revue de documents, une attention particulière doit être portée sur les processus identifiés comme cruciaux.
4. Revue de contrat complétée d'enquêtes de satisfaction. La revue de contrat doit évaluer les conditions préanalytiques, les renseignements cliniques, l'acheminement avec délais et fréquence, les méthodes utilisées, les analyses réalisées ou sous-traitées, les modalités et rendus des résultats, les interprétations particulières, les modalités de conservation ou de restitution des échantillons analysés. Le LBM s'assure ainsi qu'il peut répondre aux besoins implicites du prescripteur et du patient. L'acceptation de la demande d'examen peut valoir revue de contrat, pourvu que le LBM ait défini dans ses dispositions les items et modalités de cette acceptation [4]. Des enquêtes de satisfaction doivent compléter ces revues de contrat. Elles permettent de recueillir le ressenti du client (clinicien/patient).
5. Audit interne annuel. Les audits internes ont pour but de vérifier que toutes les opérations sont toujours conformes aux exigences du SMQ. Ils doivent porter sur tous les éléments internes du système, à la fois éléments de direction et éléments techniques. Ils doivent être planifiés, organisés et réalisés de façon formelle

par le RAQ ou le personnel qualifié désigné. Les résultats de ces audits doivent être formalisés et rétrocédés à l'ensemble du personnel. Si des actions correctives ou préventives sont jugées nécessaires, elles doivent être documentées et réalisées dans un délai convenu (NF 15189). Un intervalle de 12 mois est recommandé entre chaque audit pour les éléments principaux du SMQ (NF 15189).

6. Revue de direction annuelle. Elle doit comporter le suivi des revues de direction précédentes, l'avancement des actions correctives menées et des actions préventives requises, les résultats d'audits internes récents, les résultats des EEQ et autres résultats de comparaisons interlaboratoires, les indicateurs qualité, les non-conformités, l'évaluation des fournisseurs. Les conclusions et les mesures qui en résultent doivent être enregistrées et communiquées au personnel (NF 15189).

### Troisième étape (ajustement) – améliorer la qualité

Cette étape s'attache à l'analyse des dysfonctionnements, et à l'évaluation des risques a priori et a posteriori.

- Méthodes inductives, a priori – exemples : méthode AMDEC, méthode HACCP, méthode MCM, QQOQCP.
- Méthodes déductives, a posteriori – exemples : arbre des causes, diagramme cause–effet d'Ishikawa, loi de Paréto (règle des 20-80), analyse des défaillances selon le modèle de Reason, méthode ALARM.

#### *Exemples de méthode de résolution de l'erreur*

Cette démarche doit être menée en groupe.

1. Dans un premier temps, rechercher les causes possibles par la méthode du QQOQCCP : Qui fait quoi ? Où ? Quand ? Comment ? Combien ? Pourquoi ?
2. Dans un deuxième temps, visualiser et hiérarchiser des données qualitatives, si le problème soulevé relève d'un grand nombre de dysfonctionnements : diagramme de Paréto, avec règle des 20–80, c'est-à-dire qu'en traitant 20 % des causes, on peut résoudre 80 % du problème.
3. Identifier les causes possibles en construisant un diagramme cause–effet d'Ishikawa. Classer les causes en 5 grandes familles, les 5 M : matières, main-d'œuvre, matériel, méthodes, milieu. Une fois ce travail réalisé, ne garder que les causes probables et prouvées ; identifier les causes premières.
4. Les causes prioritaires identifiées, il faut choisir les solutions à mettre en place en construisant un diagramme multicritère.
5. Il faut mettre en œuvre les solutions retenues, et mesurer leur efficacité.

### Le Cofrac

Le Cofrac est un organisme qui a été créé en 1994, avec un statut d'association loi 1901.

Quatre mots clé définissent ses missions : compétence, indépendance (association loi 1901), impartialité (instances comportant trois collèges, organismes accrédités, leurs clients et les représentants sont d'intérêts publics), confidentialité.

Une section Santé humaine a été créée en 2010, suite à l'ordonnance du 13 janvier 2010.

Un organisme est accrédité pour une activité ; il doit donc définir la portée de son accréditation au sein des programmes « Cofrac. Bactériologie : 155 ».

Toute demande d'accréditation au Cofrac doit comporter la référence de la norme choisie (EN ISO NF 15189), la portée d'accréditation, les dossiers de validation des méthodes, le MAQ, le questionnaire de renseignements (LAB LABM FORM 05), le questionnaire d'autoévaluation (LAB LABM FORM 03).

Une convention d'accréditation est élaborée entre le LBM demandeur et le Cofrac.

Lors de l'évaluation d'accréditation, l'évaluateur a pour mission l'examen :

- des dispositions organisationnelles et techniques et de leur application (enregistrements, traçabilité, etc.) ;
- des compétences du personnel réalisant les activités du LBM (observation de tout ou partie d'un examen, entretien, etc.) ;
- des résultats des contrôles de qualité : CIQ, EEQ, CIL.

L'évaluation sur site n'est pas une inspection. Le biologiste responsable du LBM a la possibilité de faire part de ses commentaires en fin d'évaluation et de contester les constats proposés par l'évaluateur Cofrac.

Suite à l'accréditation initiale, des évaluations régulières sont programmées : évaluation de renouvellement tous les 5 ans, et évaluation de surveillance tous les 12 mois (fig. 10.5).

Pour l'accréditation, des documents sont opposables : la norme EN NF ISO 15189, le document SH REF 02 qui est un recueil des exigences spécifiques d'accréditation. Il a été approuvé par le Comité de section Santé humaine du Cofrac le 23 septembre 2010.

Des guides techniques d'accréditation (GTA) proposent aux LBM et autres structures des précisions suffisantes pour répondre aux exigences des normes sur des sujets techniques particuliers. Les recommandations des GTA ne sont pas opposables.

Il est à noter qu'un organisme accrédité ne sera pas audité par la Haute autorité de santé (HAS) dans le cadre de la certification, l'accréditation étant la reconnaissance de sa compétence.

## Particularités de la bactériologie

Deux référentiels existent dans cette discipline : le REMIC, dont la dernière version date de 2010 [3], et le communiqué annuel du Guide de l'autobiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) [1] révisé tous les ans, pour la réalisation des antibiogrammes.

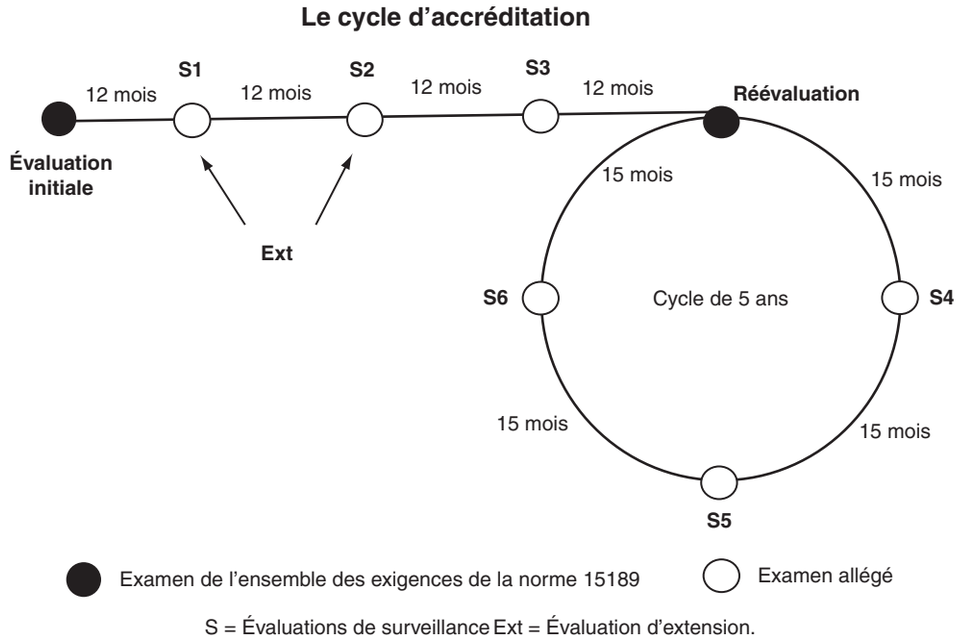



**Fig. 10.5.** – *Schéma synthétisant la périodicité des évaluations avec les évaluations de renouvellement et les évaluations de surveillance.*

## Préanalytique

Deux difficultés majeures existent en bactériologie :

- l'*analyse d'organismes vivants*: les bactéries sont sujettes à leur environnement. Pendant le transport, si le délai d'acheminement est trop long, ou si le conditionnement n'est pas adapté, les résultats peuvent être faussés par excès (les résultats nécessitant une quantification comme les ECBU peuvent être surestimés suite à une multiplication bactérienne), ou par défaut (les bactéries ne sont plus viables, comme dans le cas des anaérobies par défaut d'atmosphère adéquate, ou des germes fragiles du type gonocoque) ;
- la *variété du type d'échantillons* (sang, liquides de ponction, urines, abcès, pièces anatomiques, etc.) *et du site de prélèvement*. Cette variété conduit à une certaine difficulté de la standardisation des méthodes de prélèvement. Ces difficultés de la phase préanalytique imposent un conditionnement du milieu de transport adapté, un délai d'acheminement au laboratoire raisonnable (moins de 2 heures est l'idéal) et un dialogue avec les cliniciens.

L'analyse bactériologique (avec son interprétation) nécessite des renseignements cliniques : le type de site anatomique prélevé, la méthode de prélèvement (écouvillon au lit du malade versus prélèvement au bloc opératoire, ou via un cathéter, etc.), l'histoire clinique du patient (antécédents d'antibiothérapie, d'immunodépression, etc.).

Le dialogue biologiste–clinicien est d'autant plus important que la norme oblige à une prestation de conseils à la phase préanalytique comme à la phase postanalytique. Le biologiste peut modifier la prescription après accord du prescripteur, sauf urgence ou indisponibilité, pour l'adapter aux recommandations de bonnes pratiques [4].

La prescription connectée est une aide précieuse, car elle élimine certaines étapes intermédiaires de saisie et elle peut contraindre le clinicien à renseigner des champs obligatoires, à mentionner des renseignements cliniques.

De plus, dans le cadre du contrat avec le client (clinicien/patient), il est difficile de prévoir avec justesse le délai de rendu définitif des résultats. En effet, certains germes sont de culture fastidieuse et peuvent demander un certain délai, relativement imprévisible, pour une culture optimale.

## Analytique

La bactériologie est une discipline manuelle qui s'automatise de plus en plus.

Les fournisseurs ne répondent pas toujours à la demande des bactériologistes : certains milieux ne sont pas commercialisés, ou ne sont pas disponibles de manière ponctuelle (germes rarement isolés, possiblement sources d'épidémie tels que le *Vibrio cholerae*), ou paraissent de moindre qualité que le « fait maison ».

Cette discipline oblige à travailler sur des organismes vivants potentiellement infectieux, imposant des normes supplémentaires de sécurité comme les postes de sécurité microbiologiques de types PSM II ou PSM III.

### *À propos des Contrôles Internes de Qualité (CIQ) (LAB GTA 06)*

Pour toutes les étapes techniques, aussi bien manuelles qu'automatisées (de la coloration de Gram à la réalisation de l'antibiogramme), des CIQ doivent être mis en place,

au moins une fois par mois et à chaque changement de lot de galeries.

L'échantillon de contrôle pour le CIQ doit avoir une « composition similaire ou identique à la matrice de l'échantillon patient : les matériaux de contrôle d'origine humaine sont recommandés. Mais si l'échantillon commercial n'existe pas, le laboratoire peut préparer ses propres échantillons de contrôle ».

- *Exemple* : automate urinaire

Pas de solution de référence commercialement disponible.

« La spécificité et l'étroitesse du marché font qu'à ce jour il n'existe que peu d'échantillons de CIQ autres que ceux proposés par les fournisseurs d'automate. Le laboratoire doit s'assurer de la fiabilité des résultats qu'il rend. Dans ces conditions, il peut sembler utile de vérifier au quotidien le fonctionnement de l'automate par des comparaisons avec des comptages au microscope selon un plan d'échantillonnage bien précis. »

- *Exemple* : identification bactérienne

« Le passage régulier de souches de référence pour chaque technique sera fait selon une fréquence définie par le biologiste. Pour les galeries commerciales, le passage de souches de référence sera planifié pour un même lot de galeries à chaque changement de lot et/ou après chaque intervention de maintenance sur un automate. Quand il y a plusieurs systèmes d'identification utilisés simultanément pour un ou plusieurs groupes de bactéries, il est souhaitable que ces techniques soient validées entre elles. Pour ces contrôles, il est conseillé, avec les souches de référence, d'utiliser des souches cliniques, différentes de souches de référence et correspondant à des souches isolées en pathologie infectieuse, bien identifiées et correspondant à la pathologie courante observée chez des patients mais pas obligatoirement publiées. »

- *Exemple* : antibiogrammes

« Les résultats d'antibiogramme constituent une tâche quotidienne délicate pour le biologiste. Les nombreux pièges possibles dans son interprétation nécessitent une formation solide des opérateurs tant dans la réalisation que dans la lecture des antibiogrammes. Le contrôle de qualité doit donc être organisé et respecté scrupuleusement. Le biologiste devra s'attacher à choisir les souches de référence permettant de tester les points critiques rencontrés dans les différents phénotypes de résistance, et à choisir les techniques à utiliser selon le type de bactéries à tester. »

« Le biologiste doit définir les fréquences de passage des souches de référence. Une fréquence bimensuelle semble un objectif raisonnable, de même après une grosse intervention de maintenance de l'automate, ou à chaque changement de lot en cas de galeries commerciales. »

« Si plusieurs techniques d'antibiogramme sont en vigueur au laboratoire, il est hautement souhaitable que le biologiste vérifie régulièrement la cohérence des résultats entre les différents systèmes utilisés (une fois par mois par exemple). »

Ces contrôles peuvent être gérés selon une planification qui ne tiendrait pas compte des changements de lot, ou bien au coup par coup, selon les changements de lots des réactifs. Cette dernière solution oblige à une certaine réactivité, incitant à acquérir un logiciel convivial de commande et à demander aux fournisseurs un suivi des lots dans le temps.

### Postanalytique

Tout résultat qui est communiqué hors du LBM, au prescripteur et au patient, engage la responsabilité du biologiste médical, quelles que soient les modalités de communication, y compris la transmission sur un serveur de résultats. La notion de « résultats provisoires » a été supprimée par la législation française [4]. En bactériologie, presque tous les examens obligent à un rendu partiel du fait du délai des cultures bactériennes.

La difficulté des rendus d'examens bactériologiques est la standardisation, notamment pour les antibiogrammes. Le système informatique devrait être suffisamment souple pour permettre d'adapter le rendu selon le type de germes identifiés, le type d'infection, la diffusion des antibiotiques au site de l'infection. Il doit permettre d'ajouter secondairement des examens complémentaires comme la détermination des CMI. Exemple : pas de diffusion des macrolides dans l'appareil urinaire. Renseigner sur les équivalences entre les antibiotiques si une seule molécule de la famille est testée (équivalence entre les céphalosporines de troisième génération pour une souche d'*E. coli* sauvage mais pas pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa* sauvage). Réaliser secondairement des CMI dans un contexte d'infection sévère comme une méningite, une endocardite.

En bactériologie, la prestation de conseils englobe le conseil en antibiothérapie, qui demande une formation et une expérience certaines. À une époque où l'industrie pharmaceutique ne prévoit pas de nouvelles molécules, le biologiste doit être un membre actif de la politique d'épargne des antibiotiques.

## Conclusion

L'accréditation oblige les LBM à respecter l'affirmation suivante : « J'écris ce que je fais, je fais ce qui est écrit et je le prouve ».

Dans une discipline encore globalement manuelle, travaillant sur des organismes vivants, la démarche d'accréditation demande un ajustement conséquent par rapport à des spécialités très automatisées comme la biochimie. La phase préanalytique est plus difficile à standardiser. Les contrôles de qualité sont composés d'organismes vivants qui peuvent évoluer. La périodicité de ces contrôles et leur criticité doivent tenir compte de la population bactérienne rencontrée dans chaque LBM et de la lourdeur des techniques encore manuelles.

Enfin, la qualité a un coût tant en réactifs qu'en temps personnel difficile à quantifier, mais dont tout gestionnaire d'un laboratoire de bactériologie doit tenir compte.

Actuellement, un groupe de travail regroupant des microbiologistes hospitaliers se réunit pour établir un référentiel pour l'accréditation en bactériologie et virologie. Ce référentiel sera soumis au Cofrac pour être le document opposable aux biologistes dans ces disciplines.

## BIBLIOGRAPHIE


[1] Comité de l'Antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). Recommandations 2010. www.sfm.asso.fr.

[2] Ghnassia JC, Antoniotti G, Davin-Régli A. L'assurance qualité au laboratoire de bactériologie. ESKA; juin 2006. section I, chapitre 12 : « Le diagnostic bactériologique ». p. 1–16.

[3] REMIC. Référentiel en microbiologie médicale. 4e éd. 2010.

[4] SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale. Cofrac; Révision 00 - Septembre 2000.


## POUR EN SAVOIR PLUS

**Références réglementaires**

Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA). JO 11 décembre 1999; n° 287 : 18441.

Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA). JO 4 mai 2002; n° 104 : 8375.

Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. JO 15 janvier 2010, texte 43 sur 195.

Arrêté du 14 décembre 2010. JO 21 janvier 2011, définissant les conditions justificatives de l'entrée effective d'un laboratoire de biologie médicale dans une démarche d'accréditation .

**Références normatives générales**

Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 15189, octobre 2007.

Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA), arrêté du 2 novembre 1994 et arrêté du 26 novembre 1999. Journal Officiel de la République Française. www.legifrance.gouv.

**Documentations Cofrac**

Document Cofrac LAB GTA 04. « Guide de validation de méthodes en biologie médicale ». révision 00, juin 2004.

Document Cofrac LAB GTA 06. « Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale ». révision 00, juillet 2005.

Document Cofrac LAB LABM FORM 05. « Demande d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 – Questionnaire de renseignements ». révision 00, avril 2010.

Document Cofrac LAB LABM FORM 03. « Questionnaire d'auto-évaluation. Préparation de l'évaluation sur site selon la norme NF EN ISO 15189 ». révision 00, avril 2010.

**Autre**

Systèmes de management de la qualité – Principes essentiels et vocabulaires. NF EN ISO 9000 : AFNOR ; décembre 2000.

CHAPITRE

11

# Rôle du laboratoire dans le dépistage des porteurs de germes à potentiel infectieux ou multirésistants (staphylocoques, salmonelles, *Clostridium difficile*, BMR, ERV, etc.)

O. Barraud, N. Pestourie

## Introduction

Certaines bactéries, pathogènes ou non, possèdent un pouvoir « épidémiogène » particulièrement important qui peut avoir des conséquences redoutables, tant à titre individuel qu'à titre collectif, avec des retombées financières et politicomédiatiques majeures. La formidable plasticité bactérienne conjuguée à la pression de sélection antibiotique, à un respect insuffisant des précautions standard d'hygiène ou encore à la prise en charge de patients très fragilisés ou hospitalisés au long cours ont contribué ces dernières années à l'émergence de souches bactériennes à fort pouvoir de diffusion, non seulement des souches classées comme bactéries multirésistantes dites BMR (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline [SARM], entérocoque résistant à la vancomycine [ERV], entérobactéries BLSE, etc.), mais aussi des souches plus sensibles aux antibiotiques avec des conséquences cliniques importantes liées à leur virulence (épidémies de diarrhées à *Clostridium difficile*, etc.). Il est impossible d'éradiquer toutes ces bactéries, mais il faut néanmoins essayer de contrôler au mieux leur diffusion. À ce titre, le laboratoire de microbiologie doit être en première ligne pour identifier les patients concernés par ces germes à potentiel infectieux ou multirésistants et alerter ainsi le clinicien, l'équipe soignante et l'équipe opérationnelle d'hygiène (EOH) qui mettront alors en œuvre les mesures *ad hoc* de contrôle d'une épidémie potentielle : rappel des précautions standard, mise en œuvre de précautions complémentaires de type contact, isolement géographique des patients, *cohorting*, surveillance et décontamination environnementales éventuelles, etc.

Afin de mener à bien cette mission, les microbiologistes disposent d'outils diagnostiques (milieux de culture spécifiques, kits de biologie moléculaire, etc.), qu'ils peuvent utiliser soit de façon systématique dans certaines situations à risque (services de soins intensifs, sujets neutropéniques, etc.), soit de façon ciblée (épidémie avérée dans un service, sujet de retour d'hospitalisation dans un pays à fort risque d'acquisition de BMR, etc.).

Par ailleurs, les bactériologistes doivent être à même de dépister en routine des bactéries dites à potentiel épidémique (ERV, salmonelles, *C. difficile*, etc.) ainsi que des bactéries à potentiel infectieux chez certains patients, telles que les streptocoques du groupe B chez les femmes enceintes en fin de grossesse, *Staphylococcus aureus* chez les sujets hémodialysés, ou chez le personnel, comme les *S. aureus* et/ou salmonelles chez les agents travaillant dans la restauration collective. Là aussi, les industriels proposent des outils diagnostiques dédiés comparables à ceux employés pour le dépistage des BMR.

## Germes à potentiel infectieux ou multirésistants

### Bactéries multirésistantes (BMR)

Il est admis que les BMR sont des bactéries qui ne restent sensibles qu'à un faible nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. En raison de leur fréquence élevée, de leur potentiel pathogène, de leur caractère commensal qui expose au risque de diffusion, de leur caractère clonal ou du caractère aisément transférable des gènes de résistance impliqués, les deux bactéries considérées par les autorités de santé nationales et internationales comme des BMR [1] sont :

- les SARM ;
- les entérobactéries productrices de β-lactamase à spectre étendu (ou élargi) (EBLSE).

D'autres BMR sont prises en compte dans les politiques de maîtrise de la transmission croisée : *S. aureus* de sensibilité diminuée à la vancomycine ou aux glycopeptides (GISA/VISA), voire résistants (GRSA/VRSA), entérobactéries productrices de carbapénémases, entérocoques résistants à la vancomycine ou aux glycopeptides (ERV/ERG).

Enfin, certaines bactéries appartenant à d'autres espèces peuvent être considérées comme des BMR : entérobactéries productrices de céphalosporinase à haut niveau, *Pseudomonas aeruginosa* résistants à la ceftazidime, *Pseudomonas aeruginosa* résistants à l'imipénème avec d'autres corésistances, *Acinetobacter baumannii* résistants à l'imipénème, *A. baumannii* ne restant sensibles qu'à l'imipénème, etc.

### Bactéries à potentiel épidémique

Excepté dans un contexte épidémique où tout type de bactérie peut diffuser d'un patient à un autre et peut nécessiter alors un dépistage des porteurs et/ou des malades, deux types de bactéries nécessitent une surveillance « rapprochée » et un dépistage dédié :

- les ERV ;
- les souches de *Clostridium difficile* toxinogènes.

Dans le cadre particulier des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), le laboratoire de microbiologie peut être amené à rechercher les bactéries incriminées avec en premier lieu les salmonelles.

### Bactéries à potentiel infectieux relevant de dépistages systématiques

En raison du potentiel infectieux de certaines bactéries, les autorités de santé ont émis des recommandations de dépistage systématique de différentes espèces. Ces recommandations concernent des sujets présentant des états pathologiques ou physiologiques particuliers (sujets hémodialysés, femmes enceintes, etc.), l'intérêt de ce dépistage étant de pouvoir prévenir une infection.

## Politique de dépistage

### Politique de dépistage des BMR

En avril 2009, la Société française d'hygiène hospitalière (SFHH) a émis, dans le cadre de la prévention de la transmission croisée, des recommandations nationales [2], dont voici les principaux messages.

- Il est fortement recommandé que *le CLIN définisse la politique de dépistage des micro-organismes* et actualise régulièrement cette politique.
- Il est fortement recommandé d'avoir une *stratégie de dépistage adaptée à chaque secteur de soins*, la situation épidémiologique d'un service pouvant justifier une stratégie spécifique.
- Il est fortement recommandé, en situation épidémique, que le micro-organisme en cause puisse faire l'objet d'une stratégie de dépistage, quel que soit son phénotype de résistance.
- Il est fortement recommandé de *privilégier le dépistage des agents infectieux à « haut potentiel de transmission croisée »*, dont les BMR pour lesquels la transmission croisée joue un rôle essentiel, le meilleur exemple étant le SARM. A contrario, il est fortement recommandé de ne pas privilégier le dépistage des BMR sous la dépendance principale de la pression de sélection, notamment les entérobactéries hyperproductrices de céphalosporinases.
- Il est fortement recommandé de mettre en place une surveillance épidémiologique des agents infectieux « à haut potentiel de transmission croisée » dont les BMR.

Ces recommandations laissent donc libre choix à chaque établissement, via le CLIN, de mettre en œuvre sa politique de dépistage, adaptée au mieux à chaque secteur de soins.

Les deux seules recommandations fortes de la SFHH [2] concernent le dépistage des SARM :

- il est fortement recommandé de dépister les SARM *à l'admission en réanimation de patients à haut risque d'infection* (notamment pour les dialysés chroniques, les porteurs de cathéters centraux de longue durée, les greffés hépatiques) ;
- il est fortement recommandé de *ne dépister systématiquement le SARM qu'en situation d'épidémie récente*.

Le dépistage des EBLSE est recommandé uniquement chez les contacts d'un cas ou en cas d'endémie [2].

Un avis du Haut conseil de la santé publique recommande depuis 2010 la recherche de bactéries digestives commensales résistantes (entérobactéries productrices de carbapénémase, ERV, *P. aeruginosa* toto-R) chez les personnes rapatriées de l'étranger ou ayant fréquenté le système de santé de pays ayant des fréquences élevées de ces [3] bactéries. Une nouvelle version de ce rapport [4] a étendu les recommandations aux patients ayant des antécédents d'hospitalisation à l'étranger dans les 12 mois précédents. Ces recommandations ont été confirmées par une circulaire de la Direction générale de la santé (DGS) pour les entérobactéries productrices de carbapénémase [5].

### Dépistage des bactéries à potentiel épidémique

Le dépistage des ERV est principalement réalisé dans un contexte épidémique ; il peut néanmoins être mis en œuvre chez des patients très immunodéprimés tels que les sujets neutropéniques ou aplasiques. Concernant *C. difficile*, le dépistage hors contexte épidémique est réalisé chez des patients diarrhéiques ayant bénéficié d'une antibiothérapie récente.

Un texte officiel impose pour des raisons d'hygiène collective un dépistage annuel chez des agents travaillant dans les établissements assurant un service de restauration (tels que les restaurants des hôpitaux) avec une recherche de portage digestif de salmonelles et/ou shigelles, et de le portage rhinopharyngé de *S. aureus* et de streptocoques du groupe A.

### Dépistage des bactéries à potentiel infectieux

L'une des premières recommandations émise dès 2001 est celle du dépistage systématique du portage de *Streptococcus*

*agalactiae* (streptocoque du groupe B) chez les femmes enceintes en fin de grossesse, entre la 34e et 38e semaine d'aménorrhée, en raison des risques de chorioamniotites et d'infections chez le nouveau-né (voir chapitre 26).

La recherche de portage nasal de *S. aureus* est recommandée chez les sujets hémodialysés en raison d'un risque accru d'infections invasives à partir de cathéters colonisés [8]. Une décontamination peut alors être mise en œuvre. De même, il est recommandé de dépister *S. aureus* chez les patients devant bénéficier d'une chirurgie cardiaque ou orthopédique programmée lorsque le taux d'infection du site opératoire reste >2 % [9].

## Outils de dépistage

Les industriels mettent à disposition des laboratoires de biologie de nombreux outils diagnostiques (milieux de culture spécifiques, tests de diagnostic immunologiques, outils de biologie moléculaire avec la PCR en temps réel, etc.) pour détecter ces différentes bactéries, notamment les BMR.

Les milieux chromogènes (ou chromogéniques) sont des outils diagnostiques clés. Leur principe est fondé sur la mise en évidence d'une activité enzymatique spécifique de la bactérie ciblée ; un substrat chromogène est dégradé par l'enzyme bactérienne en un composé coloré ; les colonies sont ainsi facilement reconnaissables sur la gélose. La composition de ces milieux n'est pas toujours connue en raison de brevets déposés par les industriels. D'une façon générale, ces milieux *ne doivent pas être exposés à la lumière* et sont incubés à 37 °C sans apport de $CO_2$. Les durées d'incubation varient de 24 heures à plus de 50 heures.

### Bactéries multirésistantes (BMR)

Ce paragraphe concerne essentiellement les SARM et entérobactéries BLSE. Le dépistage des ERV est traité dans le paragraphe « Bactéries à potentiel épidémique ».

#### *SARM*

Les SARM sont résistants à l'ensemble des β-lactamines suite à l'acquisition d'une PLP2a. Ils possèdent souvent des résistances associées (fluoroquinolones, macrolides, aminosides, etc.).

#### Sites de dépistage

Il est recommandé de réaliser le dépistage de SARM par écouvillon nasal et des plaies cutanées chroniques lorsqu'elles existent [2]. Les prélèvements de gorge et/ou d'anus peuvent se révéler contributifs, ceux du périnée et des aisselles sont peu sensibles. Une étape d'enrichissement préalable en milieu liquide peut être réalisée.

#### Milieux de culture chromogènes (ou colorés)

Les milieux proposés par les différents fournisseurs (tableau 11.1) ne sont pas tous fondés sur les mêmes activités enzymatiques et substrats chromogènes, d'où des colonies d'aspect différent (fig. 11.1). Ils renferment tous des antibiotiques visant à inhiber les bactéries à Gram négatif, les levures et les cocci à Gram positif autres que les staphylocoques. La céfoxitine est généralement l'antibiotique choisi pour permettre la sélectivité des SARM.

La plupart des fournisseurs recommandent, lors de l'isolement d'une colonie suspecte, de confirmer

**TABLEAU 11-1**

**Caractéristiques des principaux milieux sélectifs permettant le dépistage des SARM.**

| *Fournisseur* | *AES Chemunex* | *Becton-Dickinson* | *bioMérieux* | *Biorad* | *Oxoid* |
|---|---|---|---|---|---|
| Nom commercial | Métistaph 2 | BBL™ CHROMagar™ MRSA II | ChromID™ MRSA | MRSA*Select*™ | Brilliance™ MRSA |
| Composition du milieu Antibiotiques | Boîte à 2 compartiments : – MH + ofloxacine – MH + céfoxitine (4 mg/l) | Céfoxitine (5,2 mg/l) | Céfoxitine | NC | NC |
| Réaction enzymatique | Fermentation du mannitol | NC | α-glucosidase | Phosphatase | Phosphatase |
| Aspect des colonies | Bleu sur MH + céfoxitine Jaune sur MH + ofloxacine | Mauve | Bleu-vert | Rose | Bleu jean |
| Remarques | Incubation 24–48 h Milieu non chromogène | Incubation 18–28 h (jusqu'à 36–52 h) | Incubation 24–48 h (jusqu'à 24 h) | Incubation 18–28 h Colonies de petite taille | Incubation 18–24 h |

NC : non communiqué. MH : Mueller - Hinton

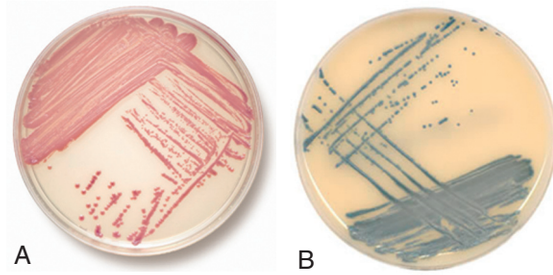



**Fig. 11.1.** – *Aspect de colonies de SARM obtenues avec des milieux chromogènes sélectifs. Exemple des géloses (A) BBL™ CHROMagar™ MRSA II (Becton Dickinson) et (B) Brillianc™ MRSA (Oxoid).*

l'identification du *S. aureus* par la recherche de la coagulase liée (agglutination).

## Outils moléculaires

Plusieurs industriels proposent des tests rapides de diagnostic moléculaire. La plupart de ces tests reposent sur la PCR en temps réel. Ces kits sont validés pour l'identification de SARM directement à partir d'écouvillons réalisés au niveau nasal. Ils reposent sur la détection de marqueurs de la méticillinorésistance (*mecA*, *SCCmec* ou sa jonction avec *orfX*) et de protéines spécifiques de *S. aureus* (*spa* ou *nuc*). Il est ainsi possible d'obtenir un résultat en moins de 2 heures, voire en moins de 1 heure pour certains kits. En outre, ils nécessitent un temps technicien limité à quelques minutes.

Il s'agit de :

- NucliSENS EasyQ® MRSA (bioMérieux) ;
- BD GeneOhm™ MRSA (Becton Dickinson) ;
- Xpert® MRSA – test réalisé sur GeneXpert® (Cepheid).

La société Hain Lifescience propose une autre méthode de diagnostic moléculaire dont le principe est fondé sur l'association d'une PCR suivie d'une hybridation sur bandelette ; le système GenoQuick® MRSA permet ainsi un diagnostic en 2,5 heures.

## *Entérobactéries BLSE*

Une entérobactérie BLSE (EBLSE) ne reste sensible au sein de la famille des β-lactamines qu'aux carbapénèmes (et parfois céphamycines). La résistance est plasmidique, codée par des enzymes (TEM, SHV, CTX-M, etc.) dont il existe des centaines de variants. Les EBLSE présentent souvent des résistances associées (fluoroquinolones, aminosides, cotrimoxazole, etc.).

## Sites de dépistage

Le dépistage par *écouvillonnage rectal* est habituellement réalisé malgré le peu d'études menées concernant l'évaluation de la sensibilité du dépistage des EBLSE [2]. Un prélèvement de selles peut aussi être utilisé. Il n'est pas recommandé de réaliser un dépistage à partir de plaies cutanées chroniques.

## Milieux de culture chromogènes (ou colorés)

Les milieux proposés par les différents fournisseurs (tableau 11.2, fig. 11.2) utilisent des réactions enzymatiques assez comparables à celles utilisées dans les milieux chromogènes non sélectifs dits d'orientation. Les milieux dédiés à l'isolement des EBLSE contiennent en plus des antibiotiques qui inhibent la croissance des bactéries à Gram positif et des levures, ainsi qu'une céphalosporine de 3e génération qui assure la sélectivité du phénotype de résistance recherché.

En cas de positivité de la culture, il est nécessaire de *confirmer le phénotype de résistance* présomptif BLSE (réalisation par exemple d'un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé mettant en évidence des images de synergie en « bouchon de champagne »). En effet, des entérobactéries présentant un autre phénotype de résistance, tel qu'une céphalosporinase hyperproduite, peuvent parfois se développer.

À noter que certaines souches telles que les *Acinetobacter* ou *Pseudomonas* peuvent se développer sur certains de ces milieux ; les colonies ne sont généralement pas colorées.

La détermination du gène impliqué (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTXM) revêt un intérêt tout particulier dans un contexte épidémique. La société CHROMagar propose un milieu dédié à l'isolement des EBLSE de type CTX-M, CHROMagar™ CTX, qui doit être préparé extemporanément ; il permet de différencier les *Escherichia coli* CTX-M (bleu) des autres entérobactéries CTX-M (mauve).

Sur le plan génotypique, la société Check-points propose différents kits de biologie moléculaire (Check-ESBL, Check-MDR CT101, etc.) qui permettent de déterminer le gène impliqué. Cette technologie fondée sur le principe de sondes d'hybridation ne peut être mise en œuvre qu'à partir de colonies isolées. Elle peut ainsi permettre de gagner un temps précieux non seulement dans la confirmation d'un phénotype BLSE, mais aussi dans la gestion d'une épidémie.

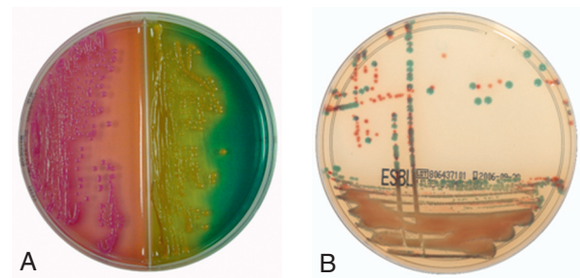



**Fig. 11.2.** – *Aspect de colonies d'entérobactéries BLSE obtenues avec des milieux sélectifs. Exemples (A) de la gélose BLSE agar (AES Chemunex) et (B) du milieu chromogène ChromID™ ESBL (bioMérieux).*

**Tableau 11-2**

**Caractéristiques des principaux milieux sélectifs permettant le dépistage des entérobactéries BLSE.**

| *Fournisseur* | *AES Chemunex* | *bioMérieux* | | | *CHROMagar* | | | *Oxoid* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Nom commercial* | *BLSE agar* | *ChromID™ ESBL* | | | *CHROMagar™ ESBL* | | | *Brilliance™ ESBL* | | |
| Composition du milieu Antibiotiques | Boîte à 2 compartiments : – Drigalski + CTX – MacConkey + CAZ | Cefpodoxime | | | NC | | | Cefpodoxime | | |
| Réaction enzymatique | – | β-glucuronidase | β-glucosidase | Désaminase | NC | | | Galactosidase + glucuronidase | Galactosidase | Désaminase |
| Aspect des colonies | Drigalski : jaune si lactose + MacConkey : rouge si lactose + | Rose-bordeaux | Bleu-vert à vert-brun | Brun-marron | Rose foncé à rougeâtre | Bleu métallique | Halo brun | Bleu (rose si galactosidase –) | Vert | Beige avec halo brun |
| Espèces bactériennes | Identification nécessaire | *E. coli* | *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* | *Proteus, Morganella, Providencia* | *E. coli* | *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter* | *Proteus* | *E. coli* | *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* | *Proteus, Morganella, Providencia* |
| Remarques | Incubation 18–24 h Milieu non chromogène | Incubation 18–24 h, jusqu'à 48 h | | | Incubation 18–24 h Nécessité de préparer extemporanément le milieu | | | Incubation 18–24 h, jusqu'à 48 h | | |

CAZ : ceftazidime (2 mg/l) ; CTX : céfotaxime (1,5 m g/l) ; NC : non communiqué.

### Autres BMR

Des milieux spécifiques ont été développés par certains fournisseurs pour l'isolement d'autres BMR telles que les GISA ou encore les carbapénémases de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase).

- Le milieu GISA (AES Chemunex) est une boîte à deux compartiments avec une gélose MH (Mueller-Hinton) et une gélose BHI (*brain heart infusion*) contenant chacune de la teicoplanine (5 mg/l). La croissance d'au moins quatre colonies sur la gélose MH et/ou BHI, à partir d'une suspension à 2 unités McFarland de *S. aureus* ensemencée en spot sur la gélose, est suspecte d'une souche GISA. Cette suspicion doit être confirmée par une détermination des CMI de la souche, voire par une étude de population.
- Le milieu chromogène CHROMagar™ KPC (Chromagar) permet de détecter la plupart des bactéries à Gram négatif présentant une sensibilité diminuée aux carbapénèmes. Les colonies apparaissent de la même couleur que pour la boîte CHROMagar™ ESBL.

## Bactéries à potentiel épidémique

### *Souches de* Clostridium difficile *toxinogènes*

*Clostridium difficile* est un bacille à Gram positif anaérobie sporulé responsable de 15 à 25 % des diarrhées post-antibiotiques et de plus de 95 % des cas de colites pseudomembraneuses. Il est la première cause de diarrhées infectieuses nosocomiales chez les adultes. *La pathogénicité du germe est due à la production des toxines A et/ou B ; seules les souches toxinogènes sont pathogènes.*

Depuis quelques années, *C. difficile* est un germe émergent, en particulier aux États-Unis et au Canada où des épidémies nosocomiales d'infections à *C. difficile* sévères ont été rapportées. Dans ces deux pays, l'incidence mais également la sévérité des formes cliniques ont augmenté, avec une létalité qui peut atteindre près de 14 %. Cette évolution est liée à l'émergence d'une souche particulièrement virulente de ribotype 027. Ce clone a également été isolé dans certains établissements français et a déjà été à l'origine d'épidémies, notamment dans la Région Nord-Pas-de-Calais en 2006 [10].

#### Prélèvements

La recherche de *C. difficile* ou de ses toxines se fait sur un échantillon de selles non moulées, généralement liquides.

#### Recherche de toxine(s)

La culture de ce germe anaérobie étant longue et difficile, le diagnostic rapide d'une infection à *C. difficile* est réalisé le plus souvent en routine par la recherche des toxines A et/ou B.

La recherche de la toxine B par le test de cytotoxicité est la méthode de référence, mais il s'agit d'une technique longue et fastidieuse réservée à des laboratoires spécialisés.

De nombreuses techniques immunologiques de recherche rapide de toxine(s) directement à partir des selles sont apparues sur le marché.

Il existe des techniques de recherche de toxine(s) par ELISA : Vidas® *Clostridium difficile* A et B (bioMérieux) ; test cytoclone A + B® (Biotech).

Les autres kits de diagnostic rapide proposent de rechercher par immunochromatographie soit la toxine A, soit la toxine B, soit les deux. Il existe également des kits fondés sur la recherche de la glutamate déshydrogénase (GDH) produite par *C. difficile* pour un screening suivi d'une recherche de toxines. Certains kits permettent la recherche de la GDH couplée à la recherche de toxine(s) (tableau 11.3).

Ces techniques de recherche de toxines peuvent se faire sur les selles ou sur la souche après culture pour confirmer l'isolement d'une souche toxinogène. Le résultat est obtenu en moins de 30 minutes.

Il existe aussi de nombreux kits commerciaux de biologie moléculaire permettant, directement à partir des selles, la recherche des gènes codant les toxines A et B (gènes *tcdA* et *tcdB*). Les résultats sont obtenus en quelques heures. Certains de ces tests peuvent détecter le clone 027 par recherche de délétions dans le gène *tcdC*.

Les kits commerciaux proposés sont :

- BD GeneOhm™ C. diff assay (GeneOhm, BD diagnostic) : gène *tcdB* ;

**TABLEAU 11-3**

**Principaux kits de diagnostic rapide des infections à *C. difficile* par recherche de *C. difficile* et/ou de ses toxines.**

| *Cible* | *Nom commercial* | *Fabricant* |
|---|---|---|
| Toxine A | *C. difficile* toxine A test | Oxoid |
| | ImmunoCard® toxine A | Meridian |
| | Color PAC® toxine A | BD |
| | Tox A sign | Servibio |
| | Clearview C. diff A® | Unipath |
| GDH | Culturette Brandt CDT™ | BD |
| | ImmunoCard® *C. difficile* | Meridian |
| Toxine A + GDH | Triage® CD panel | Biosite |
| Toxines A et B | ImmunoCard® toxine A et B | Meridian |
| | Tox A/B Quik Chek® | BMD-Techlab |
| | Xpect® *Clostridium difficile* toxine A/B | Remel – Oxoid |
| Toxines A et B + GDH | *C. difficile* Quik Chek Complete® | BMD-Techlab |

GDH : glutamate déshydrogénase.

- Illumigene™ *C. difficile* (Illumigen, Meridian) : gènes *tcdA* et *tcdB* ;
- Xpert® *C. difficile* (Genexpert, Cepheid) : gène *tcdB* et détection du clone 027 ;
- Genotype® C. diff (Hain, Lifescience) PCR puis DNA strip : gènes *tcdA* et *tcdB*, détection du clone 027 et résistance à moxifloxacine.

### Recherche par culture

Le société bioMérieux à développé un milieu chromogène spécifique pour la recherche de *C. difficile* (Chrom ID *C. difficile*). La recherche se fait par ensemencement de la selle sur un milieu sélectif généralement additionné de D-cyclosérine et de céfoxitine. La gélose est incubée en anaérobiose.

Il existe différents milieux :

- Brazier's *Clostridium difficile* selective agar (Oxoid) ;
- Gélose *Clostridium difficile* (bioMérieux) ;
- C. dif selective agar (Becton Dickinson).

## *Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)*

Les deux principales espèces d'entérocoques isolées en médecine humaine sont *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* ; ces bactéries peuvent acquérir une résistance vis-à-vis des glycopeptides, et notamment de la vancomycine via des gènes *van* (le plus fréquemment *vanA* et *vanB*). Le contrôle de leur diffusion est d'autant plus fondamental qu'il existe un risque de transfert du support génétique de résistance vers des souches de staphylocoques. Cette situation, bien que non épidémique, est déjà effective aux États-Unis ; elle doit absolument être évitée en France.

### Prélèvement

Un écouvillonnage rectal correctement réalisé (ne pas se limiter à la marge anale) est recommandé. Un enrichissement préalable peut être réalisé par ensemencement de l'écouvillon ou de la selle dans un milieu liquide contenant de la vancomycine.

### Milieux de culture chromogènes

Il existe différents milieux chromogènes contenant de la vancomycine qui facilitent la mise en évidence des ERV (tableau 11.4, fig. 11.3). Selon les concentrations de vancomycine dans la gélose, certains milieux permettent ou non la croissance des entérocoques naturellement résistants (*E. casseliflavus, E. flavescens, E. gallinarum*).

Quel que soit le milieu chromogène, en présence de colonies suspectes, il est nécessaire de confirmer par un examen microscopique la présence de cocci à Gram positif. Il est parfois aussi nécessaire, selon les milieux, d'identifier l'espèce d'entérocoque isolée, et de tester sa sensibilité aux antibiotiques selon les recommandations du CA-SFM.

Il est aussi recommandé de déterminer la CMI de la souche d'entérocoque isolée, tant à la vancomycine qu'à la teicoplanine.

### Recherche par biologie moléculaire

Il est possible de réaliser une recherche d'ERV directement à partir du prélèvement à l'aide d'une technique de PCR ciblant les gènes *vanA* et/ou *vanB :*

- BD GeneOhm™ Van R (GeneOhm – BD diagnostics) : gènes *vanA* + *vanB* ;
- Xpert® Van A Van B (Genexpert – Cepheid) : gènes *VanA et/ou VanB.*

Ces technologies permettent de gagner en sensibilité et en rapidité de diagnostic par rapport aux méthodes de culture. Dans le cas d'une PCR positive avec le gène *vanB*

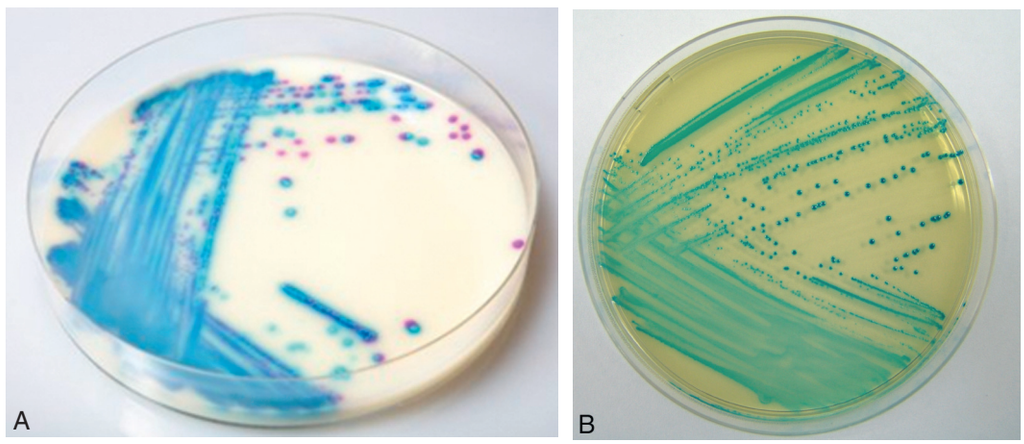



**Fig. 11.3.** – *Aspect de colonies d'entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) obtenues avec les milieux chromogènes (A) CHROMagar™ VRE (CHROMagar) et (B) milieu VRE (AES Chemunex).*

**TABLEAU 11-4**

**Caractéristiques des principaux milieux sélectifs permettant le dépistage des ERV.**

| *Fournisseur* | *AES Chemunex* | *CHROMagar* | | *bioMérieux* | | *Oxoid* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Nom commercial* | *Milieu VRE* | *CHROMagar™ VRE* | | *ChromID™ VRE* | | *Brilliance™ VRE* | |
| Composition du milieu Antibiotiques | Vancomycine (6 mg/l) | Vancomycine (6 mg/l) | | Vancomycine (8 mg/l) | | Vancomycine (5 mg/l) | |
| Réaction enzymatique | β-glucosidase | NC | | α-glucosidase + β-galactosidase | | Phosphatase | Phosphatase + α-galactosidase |
| Aspect des colonies | Bleu-vert | Rose à mauve | Bleu ± inhibé | Bleu-vert | Violet | Bleu pâle | Bleu indigo/ pourpre |
| Espèces bactériennes | Entérocoques résistants à la vancomycine | *E. faecalis*, *E. faecium* | *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* | *E. faecalis* | *E. faecium* | *E. faecalis* | *E. faecium* |
| Remarques | Incubation 24–48 h<br>Nécessité d'identification de l'espèce | Incubation 18–24 h<br>Nécessité de préparer extemporanément le milieu<br>Certains *Lactobacillus* et *Pediococcus* peuvent apparaître mauves | | Incubation 24–48 h<br>Inhibition des entérocoques naturellement résistants (*E. gallinarum*, *E. flavescens*) | | Incubation 18–24 h, jusqu'à 48 h<br>Inhibition des entérocoques naturellement résistants (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*) | |

NC : non communiqué.

et négative avec le gène *vanA*, il faut rester prudent quant à l'interprétation ; il peut en effet s'agir de la présence du gène *vanB* chez des bactéries autres que les ERV, telles que des anaérobies. Même si la probabilité est infime, notamment en Europe, une PCR positive avec le gène *vanA* peut correspondre à la détection de staphylocoques VRSA.

## Salmonelles

Outre leur impact majeur dans les pays en voie de développement, les salmonelles constituent la première cause de TIAC en Europe. Leur détection classiquement réalisée à partir d'un milieu Hektoen après une étape d'enrichissement en milieu liquide est désormais facilitée par des milieux chromogènes plus sensibles et spécifiques.

### Sites de dépistage

Le prélèvement de selles est bien entendu utilisé. Les milieux de culture sont ensemencés directement ou après enrichissement préalable en milieu liquide. Dans le cas éventuel de salmonelloses majeures, le repiquage de flacons d'hémocultures positifs à bacilles à Gram négatif peut être réalisé sur les milieux dédiés.

### Milieux de culture chromogènes

Les milieux chromogènes destinés à la recherche des salmonelles contiennent des antibiotiques qui inhibent les bactéries à Gram positif et les levures. Certaines géloses contiennent en outre de la cefsulodine en tant qu'antibiotique inhibiteur de *Pseudomonas aeruginosa*. Les réactions enzymatiques et les substrats chromogéniques employés ne sont le plus souvent pas connus ; les colonies présentent généralement une coloration rose à mauve (fig. 11.4).

Quel que soit le milieu utilisé, l'identification présomptive doit être confirmée éventuellement par une galerie d'identification ou une recherche de la lyse des colonies par le phage O1. Il est indispensable de réaliser les tests d'agglutination recherchant les antigènes somatiques O et flagellaires H afin de déterminer l'identification exacte du sérotype.

À noter chez différents fournisseurs l'existence de boîtes à deux compartiments permettant de codétecter, à partir d'un même prélèvement, la présence de salmonelles

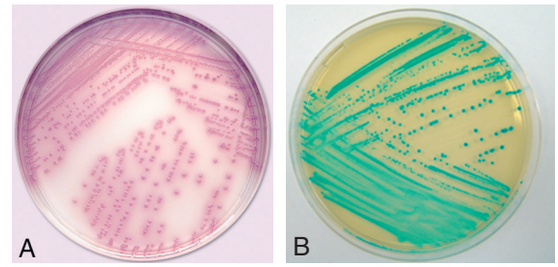



**Fig. 11.4.** – *Aspect de colonies de salmonelles obtenues avec les milieux chromogènes (A) BBL™ CHROMagar™ Salmonella (Becton Dickinson) et (B) Brilliance™ Salmonella (Oxoid).*

et de shigelles, tels les milieux BBL™ CHROMagar™ Salmonella/Gélose XLD (Becton Dickinson), et SALSA (AES Chemunex).

Il existe également des milieux dédiés aux prélèvements d'origine alimentaire tels que le milieu RAPID'Salmonella (Biorad).

## Autres bactéries à potentiel épidémique

Dans des contextes très particuliers, peuvent être recherchées certaines bactéries à potentiel épidémique telles qu'*Escherichia coli* O157 : H7, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, etc.

Les industriels proposent là aussi des milieux spécifiques, chromogéniques le plus souvent, qui sont plus sensibles que les milieux de routine et qui permettent d'identifier plus rapidement les bactéries sus-citées. Ces milieux qui ont une utilisation importante en microbiologie alimentaire ne sont pas tous validés pour un usage en bactériologie clinique :

- milieu CHROMagar™ O157 (CHROMagar™) ou BBL™ CHROMagar™ 0157 pour *E. coli* O157 : H7 ;
- milieu ChromID™ Vibrio (bioMérieux) pour l'isolement de *V. cholerae* et/ou *V. parahaemolyticus*. Le résultat doit être confirmé par agglutination à partir des colonies ;
- milieu CASA® (*Campylobacter* selective agar – AES Chemunex). Il existe également, à l'image des toxines de *C. difficile*, des tests de diagnostic immunologique pour la recherche des *Campylobacter* : ProSpecT™ *Campylobacter* (Remel) ;
- etc.

**TABLEAU 11-5**

**Caractéristiques des principaux milieux sélectifs permettant le dépistage des salmonelles.**

| *Fournisseur* | *AES* | *Becton-Dickinson* | *bioMérieux* | *Oxoid* |
|---|---|---|---|---|
| ***Nom commercial*** | ***Milieu ASAP*** | ***BBL™ CHROMagar™ Salmonella*** | ***ChromID™ Salmonella*** | ***Brilliance™ Salmonella*** |
| Réaction enzymatique | C8 estérase | NC | Estérase | Caprylate estérase + β-glucosidase |
| Aspect des colonies | Rose à pourpre | Mauve | Rose à mauve | Rose/pourpre |

NC : non communiqué.

À noter l'existence depuis peu de kits de biologie moléculaire qui permettent de rechercher tout un panel d'agents infectieux impliqués dans les diarrhées. Ces kits sont plus à visée de diagnostic que de dépistage mais peuvent présenter un intérêt en cas d'épidémie (par exemple Diarrhea ACE Detection, Seegene).

## Bactéries à potentiel infectieux relevant de dépistages systématiques

### *Dépistage de* S. aureus

#### Sites de dépistage

Les sites de prélèvement sont les mêmes que pour le dépistage des SARM. Les sujets concernés sont essentiellement les patients hémodialysés dans un but de prévention des infections sur cathéters et le personnel travaillant en restauration collective dans un but de prévention des TIAC.

#### Milieux de culture chromogènes

Les milieux disponibles sont comparables à ceux employés pour le dépistage des SARM (tableau 11.6, fig. 11.5).

À noter la commercialisation prochaine d'une boîte à deux compartiments qui permet la codétection des *S. aureus* et des SARM à partir d'un même prélèvement : chromID™ MRSA/chromID™ *S. aureus* (bioMérieux). De plus, certaines sociétés ont développé des géloses dédiées à l'identification des *S. aureus* à partir de prélèvements alimentaires, mais qui ne sont pas validées pour des prélèvements cliniques (Brilliance™ Staph 24 – Oxoid).

À l'image du dépistage du SARM, des outils de diagnostic moléculaire rapide à partir d'un écouvillonnage nasal sont également disponibles, tels que le kit Xpert® SA Nasal complete (Cepheid).

### *Autres bactéries*

Les autres bactéries relevant de dépistage systématique, telles que le streptocoque du groupe A chez le personnel de restauration, le streptocoque du groupe B chez la femme enceinte, ou encore *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* chez le sujet mucoviscidosique, sont traitées dans différents chapitres de l'ouvrage. Il existe pour certaines de ces bactéries des milieux de culture chromogènes, voire parfois des outils de diagnostic moléculaire, qui permettent de faciliter leur dépistage.

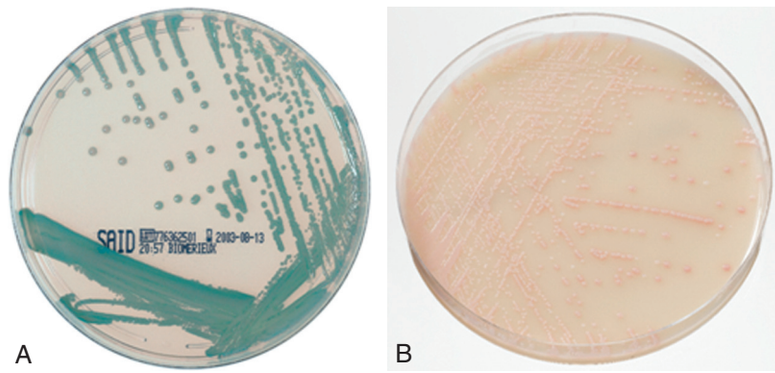



**Fig. 11.5.** – *Aspect de colonies de* S. aureus *obtenues avec les milieux chromogènes (A) ChromID™* S. aureus *(bioMérieux) et (B) SaSelect (Biorad).*

**TABLEAU 11-6**

**Caractéristiques des principaux milieux sélectifs permettant le dépistage des *S. aureus*.**

| *Fournisseur* | *Becton-Dickinson* | *bioMérieux* | *Biorad* | *CHROMagar* |
|---|---|---|---|---|
| ***Nom commercial*** | ***BBL™ CHROMagar™ Staph aureus*** | ***ChromID™ S. aureus*** | ***SaSelect*** | ***CHROMagar™ Staph aureus*** |
| Réaction enzymatique | NC | α-glucosidase | Phosphatase | NC |
| Aspect des colonies | Mauve à orange/mauve | Vert | Rose à orange | Rose à mauve |
| Remarques | Incubation 18–24 h<br>Autres *Staphylococcus* : couleur crème à blanche | Incubation 18–24 h | Incubation 18–24 h<br>Certains *S. epidermidis* et *S. schleiferi* peuvent donner une légère coloration rosée | Incubation 18–24 h<br>Nécessité de préparer extemporanément le milieu |

NC : non communiqué.

## Conduite à tenir du biologiste devant la détection d'une BMR

Outre la problématique du traitement à instaurer à titre individuel, où le microbiologiste peut d'ailleurs apporter son conseil en antibiothérapie, la problématique à titre collectif est de maîtriser la diffusion de la BMR. En conséquence, l'isolement d'une BMR, que ce soit à partir d'un prélèvement à visée diagnostique ou à visée de dépistage, doit être systématiquement signalé au clinicien et à l'équipe soignante, ainsi bien sûr qu'à l'équipe opérationnelle d'hygiène (EOH). Le laboratoire de microbiologie doit donc mettre en évidence sur son compte-rendu de résultats la présence d'une BMR (tampon dédié, iconographie, feuille séparée, etc.), de façon à permettre la mise en œuvre rapide des mesures nécessaires.

Le strict respect des précautions standard [2], associé à une information de l'ensemble de l'équipe soignante (pictogramme) doivent permettre de limiter la diffusion des BMR [11]. En outre, la SFHH, dans le cadre de la prévention de la transmission croisée [2], émet des recommandations fortes dans la mise en œuvre de précautions complémentaires de type contact vis-à-vis des SARM, EBLSE, *Acinetobacter baumannii* résistants à l'imipénème, *Acinetobacter baumannii* ne restant sensibles qu'à l'imipénème. Ces précautions complémentaires peuvent être associées à des précautions dites « gouttelettes » en cas de localisation respiratoire.

Les précautions complémentaires de type contact sont aussi applicables pour les germes à haut potentiel de transmission croisée tels que *C. difficile* et/ou les ERV. Des mesures supplémentaires concernant l'isolement des patients mais aussi le personnel peuvent être mises en œuvre. Il a été démontré que plus une épidémie est maîtrisée précocement, plus il est aisé de l'endiguer. Grâce à une information rapide de l'EOH, celle-ci pourra alors mettre en œuvre au plus vite, en accord avec les services concernés et avec l'appui du CLIN, toutes les mesures supplémentaires *ad hoc* afin d'endiguer au plus vite la propagation de l'agent infectieux : investigation de la source, traçabilité des patients et des germes, désinfection des locaux, sectorisation des porteurs et des contacts, équipes dédiées, *cohorting*, etc.

**BIBLIOGRAPHIE**


[1] Institut national de veille sanitaire (INVS). Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin – Résultats 2006.

[2] Société française d'hygiène hospitalière. Recommandations nationales. Prévention de la transmission croisée : précautions complémentaires contact. Consensus formalisé d'experts; 2009.

[3] Haut conseil de santé publique. Recommandations relatives au dépistage du portage digestif des bactéries commensales multirésistantes aux antibiotiques importées en France à l'occasion du rapatriement de patients en provenance de l'étranger et à la maîtrise de leur diffusion. 2010.

[4] Haut conseil de santé publique. Recommandations relatives à la maîtrise de la diffusion des bactéries commensales multirésistantes aux antibiotiques importées en France lors de la prise en charge de patients rapatriés ou ayant des antécédents d'hospitalisation à l'étranger, 2e version 2010.

[5] Direction générale de la santé. Circulaire DGS/RI/DGOS/PF n° 2010-413 du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesure de contrôles des cas importés d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC). 2010.

[6] Arrêté du 10 mars 1977 relatif à l'état de santé et l'hygiène du personnel appelé à manipuler les denrées animales ou d'origine animale. JO 31 mars 1977.

[7] Agence nationale de l'évaluation des soins. Recommandations pour la pratique clinique. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. Recommandations, 2001.

[8] Ministère de la Santé. Synthèses des principales recommandations internationales pour la lutte contre le staphylocoque doré résistant à la méticilline. 2009.

[9] Société française d'hygiène hospitalière. Gestion pré-opératoire du risque infectieux : conférence de consensus. 2004.

[10] Tachon M, Cattoen C, Blanckaert K, Poujol I, Barbut F, et al. First cluster of *C.difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France : preliminary report. Eurosurveillance Weekly 2006; 11 (5) : 060504.

[11] Joly-Guillou ML, Régnier B. L'infection liée aux soins. Stratégies de maîtrise des infections nosocomiales. bioMérieux ed. 2005.

[12] Haut conseil de santé publique. Rapport relatif à la maîtrise de l'émergence et de la diffusion des entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) dans les établissements de santé français. 2010.

[13] Haut conseil de santé publique. Avis relatif à la maîtrise de la diffusion des infections à *Clostridium difficile* dans les établissements de santé français. 2008.

CHAPITRE

# 12 Microbiologie en post mortem

F. Denis, C. Piva, M. Mounier

La recherche microbienne post mortem peut être réalisée dans différents contextes :

- établissement d'un diagnostic lorsque le décès survient avant ou très rapidement après la prise en charge médicale lorsque l'on soupçonne une infection et que les recherches in vivo n'ont pu être pratiquées ou sont négatives ;
- vérification de l'efficacité (ou de l'inefficacité) d'un traitement pour une infection avérée qui n'a pas permis la guérison ;
- évaluation d'un risque infectieux pour un pathologiste devant pratiquer une autopsie ;
- prise de décision d'autorisation ou non d'un embaumement et/ou de précautions particulières à prendre lors du dépôt en cercueil.

Nous nous limiterons au cas des bactéries, même si cette microbiologie post mortem concerne également virus, champignons et parasites.

## Flore bactérienne ante mortem et post mortem

La flore bactérienne est de deux types, selon qu'elle :

- fait partie de la flore microbienne normale de tout individu, éventuellement modifiée quantitativement post mortem ;
- relève d'infections ou de portages d'agents pathogènes ne relevant pas de la flore normale.

### Flore bactérienne « résidente » ou endogène

La flore de l'individu sain vivant est importante quantitativement et qualitativement (tableau 12.1).

#### *Flore intestinale*

La flore intestinale est la plus importante sur le plan quantitatif. En effet, on estime que le tube digestif abrite près de $10^{14}$ micro-organismes, c'est-à-dire 10 fois plus que le nombre de cellules qui composent le corps humain.

La densité et la composition de la flore digestive varient tout au long du tube digestif. L'estomac, le duodénum et l'intestin grêle proximal contiennent peu de bactéries ($10^3$–$10^4$ micro-organismes/ml). La diversité et l'abondance de la flore s'accroissent dans l'iléon qui contient $10^8$ micro-organismes/ml. Le côlon abrite la densité la plus forte avec $10^9$ à $10^{11}$ germes par gramme de contenu. On retrouve entre 400 et 500 espèces différentes. Les bactéries anaérobies strictes dominent nettement, représentant 99,9 % de la flore colique. Le nombre de bactéries dans les fèces varie entre $10^{10}$ et $10^{11}$/g. Les populations présentes à des taux supérieurs à $10^7$ bactéries/g sont dites dominantes.

Parmi les anaérobies strictes, on retrouve des bactéries à Gram positif (*Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*) et à Gram négatif (*Bacteroides*, *Fusobacterium*) ; parmi les anaérobies facultatives, les *Escherichia coli*, les autres entérobactéries, et les entérocoques sont à des concentrations 100 à 10 000 fois plus faibles que les anaérobies strictes.

Les germes, potentiellement les plus redoutables, trouvés dans le tube digestif sont les *Clostridium* et les entérobactéries qui auraient une densité respective de l'ordre de $10^9$/g et de $10^7$/g de selles. Rappelons que 95 % des cas de myonécrose sont dus à *Clostridium perfringens* ; sont plus rarement impliqués dans ce contexte de gangrène *C. novyi* et *C. septicum*.

#### *Flore de la peau*

Sur l'épiderme, les espèces les plus représentées sont d'une part les staphylocoques et apparentés (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, etc.) et d'autre part les corynébactéries, *Propionibacterium*, etc. Ces deux groupes représentent près de 90 % de la flore commensale.

L'humidité favorise la pullulation microbienne ; ainsi, le nombre de bactéries cutanées serait de l'ordre de $10^2$/cm$^2$ en zone sèche et de $10^5$/cm$^2$ en région humide (creux axillaire, aine, plis cutanés).

#### *Flore des voies respiratoires*

La flore du nasopharynx est dans l'ensemble celle de la salive, avec des streptocoques, des *Haemophilus*, des *Neisseria* et des anaérobies.

À noter que près de 50 % des sujets normaux sont porteurs de *Staphylococcus aureus*, notamment sur la peau elle-même, mais beaucoup plus souvent au niveau des orifices naturels (périnée, narines) ou sur le système pileux voire dans les selles.

La durée du portage de *S. aureus* peut aller de quelques jours à quelques années, même chez des sujets sains.

TABLEAU 12-1

**Flore commensale de l'homme [2].**

| *Flore* | *Densité* | *Principales espèces* |
|---|---|---|
| Flore de la peau | $10^2$–$10^5$/cm$^2$ | Staphylocoques, corynébactéries, etc. |
| Flore des voies digestives | | |
| – Salive | $10^5$–$10^6$/ml | Streptocoques |
| – Plaque dentaire | $10^9$–$10^{11}$/ml | Streptocoques, *Actinomyces* |
| – Estomac | 0 | |
| – Duodéno-jéjunum | $10^2$–$10^4$/ml | Anaérobies (*Bacteroides*, *Clostridium*) |
| – Intestin grêle | $10^7$–$10^8$/ml | Entérobactéries, entérocoques |
| – Côlon | $10^{11}$/ml | |
| Flore des voies respiratoires | | |
| – Nasopharynx | Abondante | Streptocoques, staphylocoques |
| – Trachée – bronches | 0 | |
| Flore des voies génitales | | |
| – Urètre | $10^3$/ml | Staphylocoques, corynébactéries |
| – Vagin | $10^9$/ml | Lactobacilles, anaérobies |

Il faut souligner le fait que l'individu sain n'est pas porteur de virus ou de parasites.

## États septiques ante mortem

Sur une série de 150 malades décédés consécutivement dans un service de soins de longue durée, on a retrouvé un état septique ante mortem respectivement chez 40 et 63 % des patients selon que l'on examine le certificat de décès ou que l'on procède à une relecture du dossier.

Par ailleurs, la proportion d'hémocultures positives croît de 20 à 40 % dans un délai de 0 à 18 heures post mortem.

## Modification de la flore « endogène » chez le cadavre

Au sein du tube digestif, premier site en densité microbienne de l'organisme, la flore se modifie en fonction du temps et des conditions (température notamment) de conservation du cadavre, avec destruction des microbes les plus fragiles.

Puis les germes diffusent à partir de ce site principal dans les autres compartiments et tissus de l'organisme du fait de la rupture de la barrière intestinale. Chez certains patients en phase préagonique, on peut à la faveur d'hémocultures révéler une bactériémie ante mortem avec notamment isolement de *Clostridium*.

Certains facteurs accélèrent la thanatomorphose et vont provoquer rapidement des écoulements. Parmi les facteurs cliniques ante mortem favorisant celle-ci, on note l'aérocolie (pouvant être liée à une neuropathie, à une occlusion mécanique ou métabolique, à un traitement atropinique), les chimiothérapies anticancéreuses, l'obésité, les œdèmes, l'encombrement des voies aériennes, les traumatismes térébrants. Les facteurs externes sont représentés par des conditions atmosphériques estivales et des équipements incorrects.

## Bactéries « pathogènes » susceptibles de survivre dans les cadavres

Un certain nombre de germes sont très fragiles et classiquement rapidement détruits. Il s'agit des *Neisseria* dont *meningitidis* et *gonorrhoeae*, *Branhamella*, *Haemophilus*, *Treponema*. D'autres sont plus résistants : *Staphylococcus aureus* est classiquement la plus résistante des bactéries non sporulées.

Les *Enterococcus* peuvent résister plusieurs jours alors que les *Streptococcus pyogenes* et *pneumoniae* sont détruits en quelques heures. Pour les bacilles à Gram négatif, si les *Salmonella* ou les *Vibrio cholerae* survivent dans le milieu extérieur plusieurs semaines et même peut-être des années pour *V. cholerae*, leur survie dans le tube digestif est moindre, mais dépasse plusieurs jours dans le cadavre. *Legionella pneumophila* a une température optimale de multiplication de 37 °C, mais survit bien à des températures plus basses ; elle est retrouvée viable plusieurs heures après le décès au niveau du tissu pulmonaire.

*Yersinia pestis* résiste plusieurs mois dans le milieu extérieur et plusieurs jours dans les cadavres au niveau des poumons ou dans les ganglions.

*Mycobacterium tuberculosis* résiste bien au froid et peut demeurer vivant plusieurs jours dans du matériel contaminé. *M. tuberculosis* reste au nombre des bactéries très contagieuses.

Les leptospires sont très résistantes dans le milieu extérieur et peuvent survivre également dans les cadavres qui peuvent être une source de contamination.

Enfin, les *Coxiella*, telle *C. burnetii*, peuvent résister au niveau du foie ou du sang. Elles résistent dans les sécrétions lysosomiales et un pH acide favorise leur métabolisme. Elles sont susceptibles d'être transmises par voie muqueuse. Leur résistance est comparable à celle des bactéries sporulées, rejoignant ainsi, voire dépassant *S. aureus*.

Mais les bactéries les plus résistantes restent indiscutablement les espèces sporulées qui peuvent survivre durant des mois, des années, voire des siècles.

Parmi les infections bactériennes faisant courir des risques aux médecins légistes et thanatopracteurs, on retrouve les *Clostridium* responsables de gangrènes et le charbon, dont l'agent *Bacillus anthracis* est un germe sporulé très contagieux et très résistant, ce qui vaut aux patients décédés de cette maladie de ne pas bénéficier de soins de conservation et d'avoir leur corps déposé en cercueil hermétique.

## Diagnostic microbiologique sur cadavre

La recherche peut être effectuée sur sang obtenu par ponction cardiaque, liquide de sérosités, organes (foie, cerveau, lésions cutanées visibles, collections purulentes) (tableau 12.2).

Des précautions « chirurgicales » doivent être prises pour réaliser des prélèvements aseptiquement comme pour les prélèvements ante mortem en vue de mise en culture ou de recherche génomique. Le transport doit être rapide, de même que la mise en culture ou le stockage en vue de la biologie moléculaire.

L'isolement de *Mycobacterium tuberculosis* ne pose pas de problème. En effet, les procédés de décontamination utilisés en routine, avant mise en culture, permettent de détruire la flore du cadavre et de préserver *M. tuberculosis*.

Pour les autres germes « pathogènes » ne faisant pas partie de la flore normale, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, etc. l'isolement peut être obtenu avec ou sans enrichissement préalable en utilisant les milieux sélectifs tant que la flore cadavérique ou une antibiothérapie préalable n'ont pas détruit le germe.

Les recherches de *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* doivent être réalisées dans des laboratoires de haute sécurité par du personnel entraîné.

L'identification de tous ces germes ne pose pas de problème technique.

L'interprétation des résultats peut être simple si les bactéries isolées ne peuvent pas être des contaminants ou si des bactéries endogènes du cadavre se sont multipliées dans les compartiments initialement stériles (*L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Vibrio*, *N. meningitidis*, *M. tuberculosis*, etc.). Elle est beaucoup plus délicate si on retrouve dans du sang du cœur ou des organes des espèces telles que *Staphylococcus* sp., des streptocoques non hémolytiques, des entérobactéries fréquemment retrouvées dans les cadavres (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, etc.), mais absentes d'hémocultures réalisées en ante mortem.

Mais l'intérêt de la culture ou de la *polymerase chain reaction* (PCR) post mortem est indiscutable, notamment dans la mort subite du nourrisson [3], dans des méningites à *N. meningitidis*, *H. influenzae* b, *S. pneumoniae*, tout particulièrement dans un contexte de purpura fulminans.

Nous-même [4] avons montré que 10 heures après le décès, des espèces dites fragiles comme *N. meningitidis* sont encore cultivables (nez, surrénales, etc.). Par conséquent, la culture doit être tentée même après le décès.

Pour presque toutes les espèces, il existe des techniques d'amplification génique ou PCR permettant un diagnostic rétrospectif. Ces approches diagnostiques commencent à entrer dans la pratique courante pour les agents de méningites, pour *M. tuberculosis*, etc.

**TABLEAU 12-2**

**Critères recommandés pour la réalisation d'une recherche bactérienne post mortem (adapté de [1]).**

| *Diagnostic suspecté* | *Prélèvements recommandés* | *Technique* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Histopathologie* | *Ex. direct* | *Culture* | *PCR* |
| Septicémie | Sang du cœur, poumon, foie, rate | + | + | + | + |
| Méningite, encéphalite | LCR, tissu cérébral | + | + | + | + |
| Infection localisée (abcès, pneumonie, etc.) | Tissu ou organe cible | + | + | + | + |
| Légionellose | Poumon, sang du cœur, urines | + | – | + | + |
| Tuberculose | Poumon | + | + | + | |
| Infection disséminée à mycobactéries | Poumon, foie, rate, moelle osseuse | + | + | + | |

PCR : *polymerase chain reaction*.

Dans ce contexte, la PCR permet de réaliser sur tous les prélèvements le diagnostic d'espèce. Dans notre étude, l'espèce, *N. meningitidis*, et le sérogroupe – groupe C en l'occurrence – ont pu être identifiés, rendant ainsi possible pour les sujets contacts de cas de méningites cérébrospinales la mise en œuvre d'une antibioprophylaxie et d'une vaccination spécifique.

## Cas particulier de la mort « subite » du nourrisson et de l'enfant

Les prélèvements doivent être effectués le plus tôt possible après la mort, si c'est possible. Les prélèvements sont assez semblables à ceux réalisés chez l'enfant vivant (hémocultures intracardiaques, stockage de sérum, ponction lombaire, prélèvements trachéopharyngés, bronchoalvéolaires, urines, etc.). Des prélèvements tissulaires sont réalisés lors de l'autopsie.

Mais d'autres prélèvements peuvent être réalisés à distance après analyse des circonstances de la mort et/ou sur la base de nouvelles données cliniques ou d'examens complémentaires. Parmi ces prélèvements additionnels, on distingue souvent les prélèvements de base (foie, poumon, cœur, rein, rate, méninges, plexus choroïdes, selles) et les prélèvements additionnels : épanchement de séreuses, prélèvements oto-rhino-laryngologiques ou de tout autre liquide, tissus ou organes en fonction des observations faites lors de l'autopsie.

En cas de mort subite du nourrisson, une recherche de toxine botulique doit être envisagée sur sérum.

Les aspects particuliers maternofœtaux sont développés dans un autre chapitre.

## Précautions à respecter lors de la conservation des corps des autopsies et de la mise en bière

Dans la mesure où, bien souvent, on ne connaît pas les antécédents (médicaux, origine géographique, facteurs de risque, etc.) du patient à autopsier, il est logique de prendre des précautions optimales pour protéger le personnel lors des autopsies ou pour les personnes pratiquant des soins de conservation des corps.

Aussi, on doit respecter à la fois des précautions standard et des précautions complémentaires.

La tenue doit comporter : lunettes, masque, charlotte, casaque, bottes et gants, etc.

Comme pour des accidents d'exposition au sang (AES), même s'il y a blessure, les gants transpercés retiennent du matériel biologique et diminuent l'inoculum.

Il faut tenter de minimiser pendant l'autopsie les aérosols susceptibles de véhiculer les agents infectieux, notamment lors des opérations de sciage.

**TABLEAU 12-3**

**Interdiction des soins de conservation (cas où le corps doit être déposé en cercueil hermétique) et évolution de la législation.**

| *Arrêté du 17 novembre 1986* | *Arrêté du 20 juillet 1998* |
|---|---|
| *Cas où le corps doit être déposé en cercueil hermétique* | |
| Variole et autres orthopoxviroses | Orthopoxviroses |
| Choléra | Choléra |
| Charbon | Charbon |
| Fièvres hémorragiques virales | Fièvres hémorragiques virales |
| | Peste |
| Autres cas<br>*Mise en cercueil simple immédiate* | *Pas de précision sur le cercueil* |
| Peste | Hépatite virale |
| Hépatite virale sauf A confirmée | Rage |
| Rage | Infection à VIH |
| Sida | Maladie de Creutzfeldt-Jakob |
| | Tout état septique grave sur prescription du médecin traitant |

Après l'autopsie, table, instruments doivent être désinfectés suivant une procédure validée.

Les prélèvements de tissus doivent être fixés dans du Bouin et les autres spécimens à visée bactériologique doivent être ensemencés sur place, transportés rapidement, ou stockés au froid. Lors du transport, ils doivent être placés dans des containers étanches destinés à prévenir les risques biologiques.

La liste des germes et des maladies potentiellement transmissibles par les cadavres est longue. Les pathologies les plus redoutables sont celles qui font l'objet de textes interdisant les soins de conservation des corps (tableau 12.3).

## Conclusion

Le diagnostic d'une infection bactérienne post mortem peut être important pour identifier la cause d'un décès, dans une perspective scientifique et/ou médicolégale, mais aussi dans certains cas pour pouvoir prendre des mesures prophylactiques spécifiques pour l'entourage de la personne décédée (méningocoque, bacille tuberculeux, par exemple).

Les techniques de biologie moléculaire ouvrent des perspectives de diagnostic, même lorsque la bactérie n'est plus viable dans le cadavre.

On peut, avec Stratton et Decker [5], conclure que le risque d'exposition aux agents infectieux lors de prélèvements, de

soins de corps et d'autopsies commence à être mieux connu et qu'il est souhaitable que soient réalisés des *Guidelines for performing autopsies* pour minimiser ce risque.

Cet aspect particulier de la bactériologie post mortem mérite l'attention car, dans certains cas, les prélèvements réalisés dans ce contexte permettent seuls de porter un diagnostic rétrospectif.

Il faut toutefois souligner la difficulté d'interprétation des résultats pour faire la part des bactéries authentiquement responsables d'une infection ante mortem, voire du décès, et celle des bactéries ayant diffusé soit ante mortem soit post mortem à partir des compartiments riches en germes (essentiellement le tube digestif) dans le sang et dans différents organes.

## BIBLIOGRAPHIE


[1] Caplan MJ, Koontz FP. Post mortem microbiology. Cumitech 2001 ; n° 35 : ASM Press Washington.

[2] Hygie V. Hygiène de la morgue. In : Hygiène hospitalière. Manuel de la lutte contre les infections nosocomiales. C et R. La Madeleine ; 1988. p. 354–6.

[3] Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Post mortem bacteriology : a re-evaluation. J Clin Pathol 2006 ; 59 : 1–9.

[4] Ploy MC, Garnier F, Languepin J, Fermeaux V, Martin C, Denis F. Interest of post mortem-collected specimens in the diagnostic of fulminant meningococcal sepsis. Diagn Microbiol Inf Dis 2005 ; 52 : 65–6.

[5] Stratton CW, Decker MD. Prevention of occupationally acquired infections in posthospital health care workers. In : Mayhall CG, editor. Hospital epidemiology and infection control. Baltimore : William & Wilkins ; 1996. p. 896–912.


## POUR EN SAVOIR PLUS


Berche P. Les flores commensales de l'homme. In : Berche P, Gaillard JL, Simonet M, editors. Bactériologie. Paris : Flammarion ; Médecine – Sciences 1988. p. 1–8 .

Burtonboye G, Delloye C. Polymerase reaction in cadaveric blood and tissues ? Transplant Proc 1996 ; 28 : 2927–8.

Denis F, Piva C, Mounier M. Risques infectieux en thanatologie. J Med Leg et Droit Med 2003 ; 46 : 41–7.

Orenstein JM. Guidelines for high risk or potentially higt risk autopsy cases. Pathologist 1984 ; 38 : 33–4.

Rivollier E, Berthelot P. États septiques ante mortem et soins de conservation : quelles précautions pour quelles risques ? Hygiene'S 2000 ; 8 : 264–74.

CHAPITRE 13

# Généralités

F. Denis

Le biologiste est responsable de l'analyse bactériologique des prélèvements provenant des patients (prélèvements qu'il a pratiqué lui-même ou qui lui ont été transmis) ; sa responsabilité va de la phase préanalytique jusqu'au résultat.

Afin de pouvoir optimiser la prise en charge des prélèvements, il doit disposer d'informations claires : données cliniques et biologiques concernant notamment la nature précise du prélèvement, le terrain (femme enceinte, diabétique, mucoviscidose, splénectomisé, immunodéprimé), le traitement antibiotique préalable, ou les bactéries potentiellement causales.

Certaines situations vont en effet requérir des recherches particulières.

Le biologiste procédera à un examen macroscopique de l'échantillon et réalisera sur celui-ci, souvent au préalable, une analyse qualitative voire quantitative de la cytologie avant de réaliser les examens relevant de la démarche bactériologique classique : diagnostic direct (avec examen direct et recherche qualitative ou quantitative des bactéries et/ou de leurs constituants, étude de la sensibilité aux antibiotiques) et diagnostic indirect ou sérodiagnostic.

Il devra aussi interpréter les résultats, même s'il ne maîtrise pas toutes les étapes préanalytiques ou tous les éléments cliniques.

Dans un certain nombre de situations, lorsqu'on examine des liquides normalement stériles, l'interprétation est simple (méningites purulentes avec examen direct évocateur et culture monomicrobienne ou plusieurs hémocultures positives avec le même germe, etc.). Dans d'autres cas, l'interprétation est plus délicate ; c'est le cas notamment si la flore est polymicrobienne et si la ou les bactéries potentiellement pathogènes doivent être isolées ou révélées sélectivement, voire quand le terrain fait que des espèces peu virulentes profitent d'un terrain favorable (patients fragilisés, immunodéprimés, patients polyinstrumentés) pouvant entraîner une infection. L'analyse critique des résultats doit se faire dans le cadre de confrontations clinicobiologiques. C'est également valable tant pour l'établissement du diagnostic que pour l'instauration du traitement, et fait partie de ce que l'on peut appeler un « code de bonne conduite entre biologiste et clinicien ».

La coordination entre biologistes et cliniciens doit être parfaite et le dialogue doit être permanent. Au quotidien, le biologiste doit souvent, devant une suspicion de méningite purulente, demander la réalisation d'hémocultures ou de prélèvements sériques pour recherche génomique, voire un prélèvement au niveau des lésions purpuriques ; ou devant un tableau de pneumopathie, il doit rappeler l'intérêt d'hémocultures, ou bien réclamer des urines pour pratiquer une recherche d'antigènes urinaires.

Afin de faciliter ces échanges clinicobiologiques, il est intéressant au niveau du laboratoire de sectoriser des paillasses consacrées à des services particuliers avec des techniciens et des biologistes dédiés, bien identifier interlocuteurs privilégiés avec un numéro d'appel unique. Cela permet de faciliter les échanges et d'optimiser les pratiques.

Les principaux examens microbiologiques seront passés en revue, sous un angle pratique, en recourant à une démarche type, en analysant spécifiquement certains d'entre eux du fait de leur fréquence au sein du laboratoire (urines, hémocultures, coprocultures) ou de la gravité des infections diagnostiquées (méningites, septicémies, endocardites, etc.), mais aussi sous l'angle de tableaux particuliers (mère–enfant), voire dans un contexte plus spécifique tel que procréation médicalement assistée (PMA), contrôle de dons de sang ou tissus, etc.

Cette revue des principaux examens pratiques n'a pas pour ambition d'être exhaustive, mais d'examiner sous un angle pratique et critique la plupart des prélèvements que reçoivent les laboratoires de bactériologie, en excluant les prélèvements de l'environnement que le même laboratoire peut être amené à traiter, mais qui relèvent cette fois de l'hygiène. Des éléments complémentaires seront, bien sûr, trouvés pour certains prélèvements dans la partie consacrée à la systématique bactérienne. Nous sommes en accord avec Robert Vargues qui avait écrit dans la première édition de cet ouvrage : « Un des meilleurs contrôles de qualité du travail du bactériologiste, c'est de savoir que l'identification bactérienne qu'il a faite correspond au tableau clinique ; c'est aussi de savoir que l'antibiogramme qu'il a fourni a été utile. »

CHAPITRE

14

# Hémocultures

F. Garnier, F. Denis

L'hémoculture consiste à mettre en culture du sang circulant qui est normalement stérile, afin de pouvoir rapidement détecter et identifier l'agent infectieux responsable d'une bactériémie. Actuellement, trois types de bactériémies peuvent être distingués :

- transitoires : qui correspondent à des décharges brèves de bactéries dans le sang, sans manifestations cliniques et spontanément résolutives ;
- continues : qui correspondent à des décharges continuelles qui se rencontrent notamment lors d'endocardites ou en cas de brucellose ou de fièvre typhoïde ;
- intermittentes : qui correspondent à des décharges bactériennes répétées à la suite d'infections diverses.

Qu'elles soient continues ou intermittentes, les bactériémies constituent toujours un état grave et redouté.

Les bactériémies associées à de nombreux états infectieux résultent de décharges de bactéries à partir d'un foyer initial qui peut être d'accès difficile ou de localisation inconnue. Une fois entrée dans la circulation sanguine, la bactérie est susceptible de se propager et de s'installer dans d'autres sites.

L'hémoculture constitue un moyen simple de diagnostiquer une bactériémie. Ainsi, des hémocultures sont systématiquement effectuées devant tout signe faisant supposer un syndrome infectieux (agression microbienne caractérisée par une réponse inflammatoire due à la présence de micro-organismes ou à leur passage à l'intérieur de tissus habituellement stériles) accompagné d'un état septicémique. La septicémie associe deux entités cliniques différentes, une bactériémie prolongée et un état infectieux qui peut aller du sepsis simple à l'état de choc septique. Un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) est la réponse à une agression grave (pas forcément infectieuse) de la part de l'organisme et est défini par la présence d'au moins deux des signes suivants :

- température > 38 °C ou < 36 °C ;
- fréquence cardiaque > 90/min ;
- fréquence respiratoire > 20/min ou $PaCO_2$ > 32 mmHg ;
- leucocytose > 12 000 ou < 4000/mm$^3$ ou présence de plus de 10 % de polynucléaires immatures.

Le sepsis correspond à un SRIS dû à une infection. En revanche, le sepsis sévère est un sepsis associé à une ou des hypoperfusion(s) d'organe(s) se traduisant par une acidose métabolique et/ou une hypoxémie ($PaO_2$ < 75 mmHg ou $PaO_2$ < 250 mmHg) et/ou une oligurie (< 0,5 ml/kg/h ou < 100 ml/3 h) et/ou une thrombopénie (< 100 000/mm$^3$ ou TP < 50 %) et/ou une encéphalopathie.

Enfin, le choc septique est un sepsis sévère associé à une hypotension artérielle malgré une expansion volémique adéquate et/ou la prise d'agents inotropes et/ou vasopresseurs.

## Vitalité des corps bactériens dans les flacons d'hémocultures

Dans les flacons d'hémocultures, les bactéries peuvent se retrouver sous plusieurs formes :

- intactes : soit sous forme libre dans le plasma, en phase de multiplication active et les bactéries vont alors continuer à se multiplier ; soit sous forme libre mais en phase de repos. Elles ne commenceront alors à se développer qu'à la fin de cette phase de latence correspondant à leur adaptation au milieu nutritif du flacon ;
- lésées ou masquées : dans la circulation sanguine, divers systèmes permettent l'élimination des bactéries tels que le système anticorps–complément ou les polynucléaires et les monocytes qui vont phagocyter les bactéries, ou la présence d'antibiotiques qui vont léser les bactéries. Dans ces deux dernières situations, la culture peut être obtenue après une lyse des cellules ou bien une neutralisation du ou des antibiotiques ;
- cadavres : elles ne sont plus cultivables, mais certains de leurs constituants restent détectables (ADN, antigènes, toxines, etc.).

## Milieux d'hémocultures

Que l'on ait recours à des hémocultures surveillées de manière manuelle ou automatisée, on ensemence généralement deux flacons pour chaque prélèvement, un flacon aérobie et un flacon anaérobie. Puisque l'isolement de bactéries anaérobies dans les hémocultures est en constante diminution, l'opportunité du flacon anaérobie pourrait être discutée, sauf lors de suspicion d'infections à point de départ gynécologique, oto-rhino-laryngologique ou colorectal. Cependant, certaines souches de streptocoques et d'entérocoques ont une croissance facilitée par une atmosphère anaérobie et de nombreuses bactéries aéro-anaérobies, voire aérobies strictes (*Pseudomonas aeruginosa* en présence de nitrates) peuvent cultiver en anaérobiose. Enfin, le principal gain tient au fait que l'ensemencement du flacon anaérobie double le volume de sang mis en culture.

### Nature du milieu

Actuellement, trois milieux sont utilisés comme base :

- cœur-cervelle pour les flacons SA® (aérobies) et SN® (anaérobies) dépourvus de charbon de l'automate BacT/ALERT® (bioMérieux) ;
- trypticase soja pour les flacons FA® (aérobies) et FN® (anaérobies) comportant du charbon de l'automate BacT/ALERT® (bioMérieux), les flacons BD Bactec® des automates Bactec® (Becton Dickinson) ainsi que pour les flacons manuels Signal® (Oxoid) ;
- bouillon à base de peptones pour les flacons manuels Hémoline® de bioMérieux ainsi que pour les flacons VersaTREK REDOX® de l'automate VersaTREK® (Trek Diagnostic System) commercialisé par la société i2A.

Tous ces milieux sont supplémentés avec des nutriments et des facteurs de croissances (vitamines, hémine, hydrates de carbone, cystéine, etc.) permettant la culture des micro-organismes retrouvés en pathologie humaine.

### Conditions physicochimiques et additifs présents dans les milieux

Quels que soient les systèmes et les flacons utilisés, on joue sur plusieurs facteurs.

#### *Pression*

Les flacons utilisés pour les hémocultures sont fabriqués sous pression réduite (sous vide) permettant un ensemencement direct du flacon au travers d'un opercule.

#### *Atmosphère*

La plupart des flacons commercialisés comportent une atmosphère enrichie en $CO_2$ afin de favoriser la culture des germes exigeant une atmosphère enrichie en $CO_2$ tels que *Brucella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus* et *Campylobacter*, ce $CO_2$ constituant un facteur de croissance ou un facteur de départ pour de nombreuses espèces. En général, l'atmosphère des différents flacons est constituée de gaz tels que $CO_2$ et $O_2$ pour les flacons aérobies et $CO_2$ et $H_2$ ou $N_2$ pour les flacons anaérobies.

#### *Anticoagulant*

Le polyanéthol sulfonate de sodium (SPS) est l'anticoagulant le plus couramment utilisé dans les bouillons d'hémocultures. Selon les fabricants, sa concentration peut varier de 0,0125 à 0,05 %. Le SPS possède des activités inhibitrices vis-à-vis de l'activité bactéricide du sérum, de la phagocytose cellulaire, du complément, du lysozyme, ainsi que sur certains antibiotiques tels que les aminosides. Toutefois, une concentration trop importante de SPS peut inhiber la culture de certaines souches de *Neisseria* spp., de *Peptostreptococcus anaerobius* ou de *Streptobacillus moniliformis*.

#### *Neutralisation des antibiotiques*

Pour certains flacons d'hémocultures, les fabricants ajoutent soit des résines adsorbantes de cations (Bactec®), soit du charbon activé (BacT/ALERT®), substances qui auraient un effet neutralisant sur les antibiotiques. Même si l'activité neutralisante de ces substances est revendiquée par les fabricants, les rares publications sur le sujet sont contradictoires. Il est à noter que bioMérieux annonce la sortie de nouveaux flacons avec de la résine fin 2011, début 2012. De toute manière, si le patient reçoit des antibiotiques, il est toujours conseillé de pratiquer le prélèvement à la « vallée », c'est-à-dire juste avant réadministration des antibiotiques, moment où leurs concentrations sanguines sont les plus faibles, ou après avoir pratiqué une « fenêtre thérapeutique ».

Les résines interviendraient aussi dans la lyse cellulaire, permettant la libération des bactéries intracellulaires. Il faut savoir que l'examen direct des flacons positifs comportant du charbon ou des résines est rendu plus difficile que celui des flacons classiques.

## Systèmes

### Systèmes manuels

Les systèmes manuels ne sont plus commercialisés actuellement que par trois laboratoires, bioMérieux et ses flacons Hémoline® performance, Oxoid et son flacon Signal® ou son système Isolator®, et i2a qui commercialise les flacons VersaTREK REDOX® de l'automate VersaTREK® (Trek Diagnostic System). Ces différents flacons contiennent un milieu liquide nutritif et sont incubés à 35 à 37 °C à l'étuve pendant 7 jours en général.

Le système Signal® peut être équipé d'un indicateur permettant la mise en évidence d'une surpression due à la croissance bactérienne dans le flacon (fig. 14.1D). Le désavantage de ce système tient à l'absence de flacon anaérobie.

Le système Hémoline® DUO-F comprend un flacon aérobie diphasique liquide-solide et un flacon anaérobie liquide (fig. 14.1E). La gélose, incorporée au flacon diphasique, est ensemencée quotidiennement par simple retournement du flacon sans ouverture de celui-ci. Ce système permet de gagner du temps en évitant le repiquage des flacons pour culture et prévient des contaminations éventuelles lors de leur ouverture. L'observateur recherchera alors la présence d'un trouble dans le bouillon ou de colonies sur la phase gélosée.

Sur tous les flacons considérés comme négatifs, certains bactériologistes pratiquent des repiquages systématiques des flacons au 7e jour d'incubation. Le gain n'est pas flagrant, si ce n'est l'obtention de souillures ou de bactéries dont le pouvoir pathogène est discutable.

Pour les bactéries intracellulaires et les mycobactéries, un système particulier peut être utilisé, le système Isolator® (Oxoid). Le sang est directement prélevé dans le tube (fig. 14.1F) sous vide contenant un anticoagulant

**Fig. 14.1.** – *Flacons d'hémocultures présents sur le marché.*
A) Gamme de flacons pour les Bactecs® (Becton Dickinson). B) Gamme de flacons pour le BacT/ALERT® (bioMérieux). C) Flacon manuel Signal® (Oxoid) équipé de son indicateur de croissance. D) Gamme de flacons pour le VersaTREK® (Trek Diagnostic System). E) Flacon manuel Hémoline® (bioMérieux). F) Système Isolator® (Oxoid).

et un agent lytique qui lyse rapidement les cellules. La phagocytose et l'activité bactéricide du sérum sont rapidement inactivées, permettant une concentration rapide des micro-organismes dans le lysat. Après centrifugation et élimination du surnageant, le lysat est mis en culture. Ce système très performant est néanmoins coûteux en réactif et en temps-technicien, et possède un risque élevé de contamination au cours des différentes manipulations qu'il nécessite.

### Systèmes automatisés

Actuellement, seulement trois systèmes automatisés sont disponibles sur le marché en France, le Bactec® (Becton Dickinson), le BacT/ALERT® (bioMérieux) et le VersaTREK® (Trek Diagnostic System) (fig. 14.2). Ces systèmes sont des appareils qui assurent en continu et simultanément la surveillance, l'agitation – excepté pour le flacon anaérobie du VersaTREK® – et l'incubation de tous les flacons d'hémocultures introduits. Les systèmes automatisés permettent de détecter plus facilement la croissance bactérienne tout en diminuant le temps d'incubation. Lors de sa croissance, la bactérie produit du $CO_2$ induisant soit une baisse du pH, qui sera détectée par l'automate à l'aide d'un sensor, par fluorescence (Bactec®), ou par réflectométrie (BacT/ALERT®), soit une modification de la pression à l'intérieur du flacon qui sera détectée par un capteur de pression (VersaTREK®). Pour chaque automate, les lectures s'effectuent toutes les 10 minutes, ce qui permet une détection précoce de la positivité d'un flacon. L'appareil avertit de tout résultat positif grâce à une alarme visuelle et/ou sonore.

Ainsi, une incubation de 5 jours est suffisante pour des flacons incubés à 35 °C sous agitation douce dans les automates.

## Prélèvements

En milieu hospitalier, les hémocultures sont les prélèvements les plus fréquemment prescrits. Ainsi, à titre indicatif, au CHU de Limoges, le nombre annuel de paires de flacons d'hémoculture ensemencées est d'environ 30 000 pour 2 100 lits. Toute fièvre inexpliquée, survenant particulièrement chez une femme enceinte ou chez un sujet immunodéprimé, accompagnée ou non de signes cliniques évocateurs d'infection, de SRIS ou de sepsis, donne lieu à la prescription d'hémocultures. Il est à noter que chaque patient peut développer un sepsis, mais que les patients dont les défenses locales sont altérées – rupture de la barrière cutanée par exemple – deviennent à risque ; de même, ceux dont le système immunitaire est déficient sont à haut risque.

### Mode de prélèvement (fig. 14.3)

Le prélèvement doit être réalisé après une asepsie rigoureuse. Toute contamination par des germes cutanés ou ambiants peut compromettre la culture de la bactérie

**Fig. 14.2.** – *Appareils à hémocultures.*
A) et B) Gamme Becton Dickinson. C) bioMérieux. D) Trek Diagnostic System.

recherchée et/ou gêner l'interprétation du résultat. De plus, tout prélèvement sanguin est associé à un risque non négligeable d'accident d'exposition au sang (AES) pour le préleveur (au CHU de Limoges, 1,3 % des AES se sont produits lors de prélèvements pour hémocultures en 2004). De ce fait, pour tout établissement de santé, le protocole de prélèvement doit être strict et validé par le Comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) local.

Le port de gants est indispensable mais, au préalable, le préleveur doit impérativement se laver les mains avec une solution hydroalcoolique. L'asepsie de la peau du patient au point de ponction doit se faire de manière centrifuge successivement avec de l'alcool à 70 °C puis avec un produit iodé comme la polyvidone iodée. Après la ponction, le produit iodé, potentiellement irritant, est enlevé avec de l'alcool à 70 °C. Le bouchon du flacon d'hémoculture est désinfecté soigneusement avec de la polyvidone iodée ou de l'alcool à 70 °C. Le système de prélèvement est généralement constitué d'une tubulure munie à chaque extrémité d'une aiguille, l'une servant à pratiquer la ponction veineuse, et l'autre l'inoculation du flacon grâce à un adaptateur. Le matériel de ponction est de plus en plus sécurisé pour limiter le risque d'accident d'exposition au sang. Le flacon aérobie est préférentiellement ensemencé en premier, permettant ainsi d'évacuer l'air présent dans la tubulure avant d'inoculer le flacon anaérobie. La ponction veineuse constitue la méthode de prélèvement habituelle des hémocultures, les autres sites de ponction, cathéters veineux ou artériels par exemple, augmentant la fréquence des contaminants. Cependant, il faut bien garder à l'esprit que la peau possède une flore bactérienne où l'on retrouve principalement des staphylocoques et apparentés (*Staphylococcus*

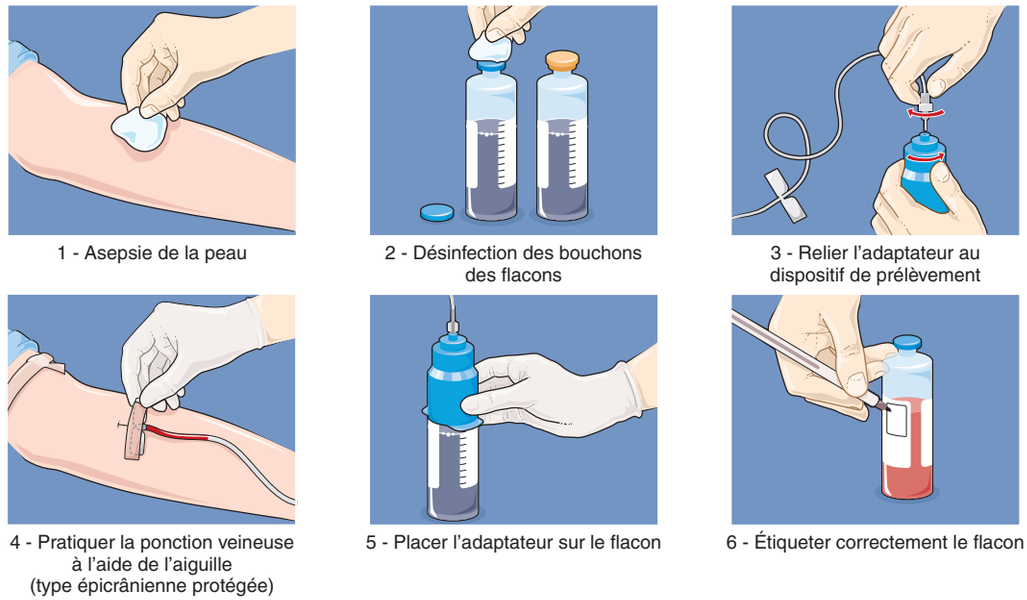



**Fig. 14.3.** – *Procédure de prélèvement direct des flacons d'hémocultures (d'après bioMérieux).*

*epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Micrococcus*, etc.) et des corynébactéries aérobies et anaérobies. Le nombre de bactéries cutanées est estimé entre $10^2$ et $10^5$ par $cm^2$, d'où l'importance d'une asepsie rigoureuse avant le prélèvement pour éviter tout risque de contamination des flacons par ces germes.

Afin de minimiser encore plus ce risque de contamination, certaines équipes préconisent maintenant d'éliminer le premier millilitre prélevé.

## Quand prélever ?

Pour éviter tout faux négatif, il est impératif de pratiquer le prélèvement le plus tôt possible au cours de la maladie et surtout avant toute mise en route d'antibiothérapie. Dans le cas contraire, une fenêtre thérapeutique de 48 à 72 heures est recommandée. À l'exception des infections du système vasculaire où la bactériémie est continue, le moment du prélèvement est important car la bactériémie est discontinue, ce qui peut modifier la qualité du prélèvement. Les signes évocateurs sont très variés, notamment en fonction du foyer initial ; toutefois, on peut retrouver :

- des fièvres prolongées et inexpliquées ou évoluant par pics, signant la présence de bactéries dans le sang ;
- une hypothermie, notamment pour des septicémies à cocci ou bacilles à Gram négatif témoignant d'un état infectieux sévère ;
- la survenue de frissons, de marbrures ou de sueurs ;
- une splénomégalie ;
- une suspicion d'endocardite ;
- tout signe traduisant un trouble de la coagulation sanguine, tel un purpura.

**ENCADRÉ**

Actuellement, certaines hémocultures sont tout de même réalisées sur cathéters ou sur sites implantables chez des patients recevant des chimiothérapies lourdes par ces dispositifs, afin de permettre de déceler toute septicémie avec comme point de départ le dispositif. Des hémocultures par ponction veineuse sont effectuées en parallèle. Les délais de positivité des deux hémocultures réalisées en parallèle et au même moment sont alors comparés. En effet, une précocité d'au moins 120 minutes en faveur de l'hémoculture sur dispositif par rapport à l'hémoculture périphérique signe un dispositif infecté qui pourrait être à l'origine de la septicémie. Le retrait du dispositif est alors fortement recommandé lorsque l'état général du patient le permet.

**ENCADRÉ**

Il est à noter que dans certaines circonstances (sujet âgé, immunodépression, traitement par des corticoïdes), nous pouvons être en présence d'une septicémie en l'absence de toute fièvre.

## Nombre et volume

Deux à trois hémocultures par 24 heures, espacées de 30 à 60 minutes, sont généralement suffisantes pour isoler le germe responsable de la bactériémie. Un grand nombre de prélèvements exposant à une augmentation du risque

de contamination, il est recommandé de ne pas dépasser 3 hémocultures par 24 heures.

La densité bactérienne au cours des bactériémies est généralement faible chez l'adulte, de 1 à 10 UFC/ml. Le recueil d'un volume suffisant de sang est donc nécessaire pour augmenter les chances d'isolement, mais un ratio sang/bouillon doit être respecté car une dilution au 1/10e, voire au 1/5e, permet d'inactiver l'effet bactéricide du sérum et de diluer les antibiotiques éventuels. Chez l'adulte, un volume de 10 ml constitue donc un minimum et un doublement du volume (20 ml) augmente de 30 % la positivité des prélèvements. Chez le nourrisson et l'enfant, la densité bactérienne étant plus élevée (souvent supérieure à 1000 UFC/ml), un volume de 1 à 2 ml est suffisant.

### Acheminement

Les hémocultures doivent être acheminées le plus rapidement possible au laboratoire afin d'être introduites dans l'automate le plus tôt possible. Chaque hémoculture doit être étiquetée correctement et accompagnée d'une demande sur laquelle figureront : nom, prénom et date de naissance du patient ; le service d'origine ; la date, l'heure et le mode de prélèvement (veineux direct ou sur cathéter ou autre dispositif) ainsi que la température du patient au moment où il est effectué, sans oublier de mentionner une éventuelle antibiothérapie et la nature de celle-ci.

### Incubation des flacons

Une incubation à 35 °C pendant 7 jours est recommandée pour les systèmes manuels. La lecture est visuelle et doit être réalisée deux fois par jour au cours des 48 premières heures puis seulement une fois par jour pour les 5 jours suivants. L'observateur va rechercher la présence d'un trouble du milieu provoqué par la croissance bactérienne (bacilles à Gram négatif aérobies, *Staphylococcus* spp. et *Bacteroides* spp.), d'une hémolyse (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp. et *Bacillus* spp.), d'un coagulum (*Staphylococcus aureus*), de colonies au fond du flacon (*Streptococcus* spp. et *Nocardia* spp.), de production de gaz (bactéries aéro-anérobies facultatives et anaérobies strictes) ou la présence de colonies sur les géloses. Certains genres bactériens comme *Brucella*, *Haemophilus*, *Neisseria* et *Campylobacter* troublent peu ou pas le bouillon de culture, l'usage d'un flacon biphasique s'avérant alors utile.

Pour les systèmes automatisés, une incubation de 5 jours suffit. Au-delà de ce délai, les bactéries détectées sont généralement des contaminants qui étaient en très faible quantité.

La prolongation de l'incubation autrefois recommandée pour des micro-organismes particuliers comme les bactéries du groupe HACEK (*Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et le genre *Kingella*) et *Brucella* spp., ou lorsqu'une endocardite est soupçonnée, n'est plus d'actualité du fait de la sensibilité actuelle des systèmes automatisés.

La lecture par réflectométrie, par fluorescence ou par détecteur de variation de pression toutes les 10 minutes à la recherche du $CO_2$ produit dans les flacons permet d'obtenir une représentation graphique au cours du temps. Un flacon sera alors détecté positif si sa production de $CO_2$ augmente au cours du temps de façon exponentielle (fig. 14.4).

En ce qui concerne les mycobactéries, leur recherche par hémocultures est traitée dans le chapitre particulier à ces germes.

## Traitement des flacons ensemencés

Devant toute suspicion de positivité (système manuel ou automatique), un examen microscopique et une mise en culture sont réalisés sur les flacons. Tout flacon considéré comme positif doit impérativement être manipulé sous un poste de sécurité microbiologique, avec enceinte à flux laminaire (au minimum classe 100) et du matériel à usage unique.

### Examen microscopique

Sous un poste de sécurité microbiologique, du bouillon est prélevé de façon aseptique après avoir désinfecté l'opercule du flacon à l'aide d'une seringue et du dispositif fourni par le fabricant. L'examen du bouillon est effectué en deux étapes :

- état frais afin d'observer la morphologie et la mobilité des bactéries ;
- coloration de Gram pour déterminer plus précisément la morphologie des bactéries, cocci ou bacille, et leur affinité tinctoriale, caractère à Gram positif ou négatif. Pour certains germes, on peut avoir recours à d'autres colorations (bleu de méthylène, acridine orange, etc.). Tout résultat positif de l'examen direct doit être communiqué rapidement au clinicien, notamment si plusieurs flacons sont positifs, si l'examen direct est évocateur de *Clostridium* ou de *Neisseria*, ou si les patients sont à risque (immunodéprimés, aplasiques, tableaux de choc, etc.).

L'examen direct, morphologie et Gram, peut être trompeur et l'orientation initiale pourra être corrigée lors de l'examen direct des repiquages.

### Ensemencement

Les repiquages des flacons suspects sont effectués en fonction de l'examen direct. Les cultures étant généralement monomicrobiennes, des milieux gélosés non sélectifs seront utilisés : géloses Colombia avec 5 % de sang incubées en aérobiose pendant 48 heures et en anaérobiose pendant 5 jours, géloses au sang cuit enrichies

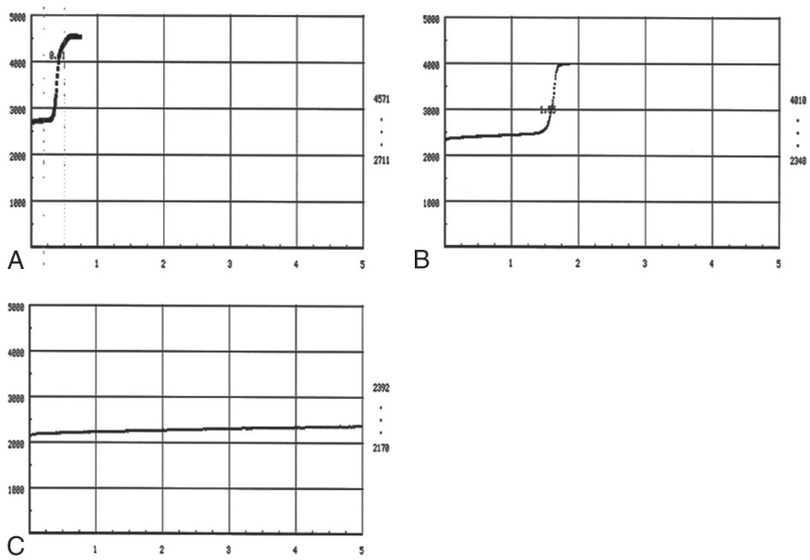



**Fig. 14.4.** – *Trois prototypes de courbes de croissance générées par le système automatisé BacT/ALERT® (bioMérieux).* A) Positif en 24 heures. B) Positif en 48 heures. C) Négatif en 5 jours. En abscisse, nombre de jours ; en ordonnée, unité de réflectance.

(Polyvitex®) placées sous $CO_2$ pendant 48 heures lorsqu'un *Haemophilus* spp. ou une *Neisseria* spp. sont évoqués.

Si à l'examen direct un mélange de bactéries est suspecté, des milieux sélectifs pourront alors être utilisés, la gélose ANC (acide nalidixique-colistine) pour isoler sélectivement les bactéries à Gram positif et la gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient) pour les bacilles à Gram négatif. Le choix de l'atmosphère (aérobiose, $CO_2$ ou anaérobiose) pour l'incubation de ces milieux à 37 °C dépend du diagnostic présomptif.

Les flacons sont conservés à température ambiante pour un éventuel nouveau repiquage ultérieur si les cultures sont restées négatives.

De plus, sur des hémocultures monomicrobiennes, il est possible, à partir d'un culot lavé, de réaliser directement un antibiogramme, soit manuellement, soit à l'aide d'une galerie ou d'un automate en fonction de l'équipement du laboratoire. Suivant le type bactérien observé à la coloration de Gram, une identification sera parallèlement lancée. Les résultats n'auront alors de valeur que si l'isolement observé le lendemain est bien monomicrobien. Dans le cas contraire, à partir des colonies des repiquages, seront pratiqués un examen direct et quelques tests biochimiques rapides, permettant d'orienter vers une identification complète (galerie, biotypages/sérogroupages, etc.) et d'étudier la sensibilité aux antibiotiques de la ou des souche(s) isolée(s).

Afin de gagner du temps lorsque l'on suspecte *S. pneumoniae*, une recherche d'antigène soluble peut être réalisée directement sur le surnageant du flacon d'hémoculture à l'aide du kit Now® *Streptococcus pneumoniae* de chez Binax.

Dernièrement, l'identification par la technique de spectrométrie de masse a connu un essor et plusieurs études montrent de bonnes sensibilité et spécificité de cette technique pour l'identification du germe directement à partir d'un flacon positif.

Enfin, certains fabricants proposent différentes solutions de biologie moléculaire pour l'identification directement à partir d'un flacon positif :

- extraction et identification de *S. aureus* avec recherche en parallèle de la méticillinorésistance à l'aide du kit Xpert® MRSA/SA BC (Cepheid) utilisé sur l'appareil GeneXpert® (Cepheid) lorsqu'à la coloration de Gram on retrouve des cocci à Gram positif en amas ;
- extraction suivie d'une *polymerase chain reaction* (PCR) et d'une hybridation sur bande de nitrocellulose avec les kits Genotype BC® Gram négatif ou Gram positif suivant l'examen direct du flacon positif, ces kits permettant ainsi l'identification de différents germes ainsi que la recherche de gènes de résistance *mecA* et *van*.

## Interprétation

### Hémocultures positives

Alors que, dans les années 1990, le rapport bactéries à Gram négatif/bactéries à Gram positif isolées des hémocultures tendait à s'équilibrer, nous avons assisté à une modification de ce rapport ces dernières années en

**TABLEAU 14-1**

**Répartition des principales espèces bactériennes isolées d'hémocultures d'après diverses études.**

| *Micro-organisme* | *1990[1] (%)* | *1997[2] (%)* | *1997–1998[3] (%)* | *2002[4] (%)* | *2005[5] (%)* | *2010[6] (%)* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gram positifs** | **44,8** | **40,4** | **52,9** | **54,3** | **61** | **67** |
| SCN | 9,2 | 5,1 | 17,8 | | 16,2 | 42 |
| *Staphylococcus aureus* | 18,9 | 14,7 | 15,1 | | 8,6 | 9,7 |
| *Streptococcus pneumoniae* | 3,6 | 5,1 | 5,9 | | 2,3 | 2,2 |
| *Enterococcus* sp. | 6,9 | 7,7 | 4,6 | | 4,8 | 4,1 |
| Autres Gram positifs | 6,2 | 7,7 | 9,5 | | 29 | 9 |
| **Gram négatifs** | **42,5** | **43,5** | **41,2** | **38,8** | **32,1** | **26,6** |
| *Escherichia coli* | 15 | 23,1 | 14,5 | | 13,5 | 13,4 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 6,9 | 4,5 | 5,3 | | 2,2 | 2,4 |
| Autres entérobactéries | 11 | 3,2 | 3,9 | | 6,3 | 6,6 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 5,6 | 5,1 | 5,3 | | 3,9 | 2,9 |
| Autres Gram négatifs | 4 | 7,6 | 12,2 | | 6,2 | 1,3 |
| **Anaérobies** | **3,9** | **1,3** | **1,3** | **1,2** | **4,2** | **3,7** |
| **Autres** | **8,8** | **14,8** | **4,6** | **5,7** | **2,7** | **2,7** |
| **Total des bactériémies** | **944** | **156** | **304** | **1165** | **1536** | **2022** |

SCN : staphylocoque à coagulase négative.

[1] Melvin MP, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s : a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997 ; 24 : 584-602.

[2] Panceri ML, et al. Aetiology and prognosis of bacteremia in Italy. *Epidemiol Infect* 2004 ; 132 : 647-54.

[3] Bouza E, et al. Report of ESGNI-001 and ESGNI-002 studies. Bloodstream infectious in Europe. *Clin Microbiol Infect* 1999 ; 5 : 2S1-2S12.

[4] Hadziyannis AS, et al. Blood culture results during the period 1995-2002 in a greek tertiary care hospital. *Clin Microbiol Infect* 2004 ; 10 : 657-78.

[5] CHU Dupuytren de Limoges, chiffres pour l'année 2005.

[6] CHU Dupuytren de Limoges, chiffres pour l'année 2010.

Europe (tableau 14.1), voyant les bactéries à Gram positif revenir en tête. Ce changement est dû à une augmentation d'hémocultures positives à staphylocoques à coagulase négative du fait du nombre important de patients porteurs de cathéters intravasculaires. Parmi les agents retrouvés dans les hémocultures positives, les espèces les plus fréquemment isolées actuellement sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative (tableau 14.1). Parmi les germes à Gram négatif, on retrouve d'autres espèces de la famille des entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* et *Proteus mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa* et, parmi les Gram positifs, streptocoques et entérocoques sont retrouvés dans des proportions variables selon les établissements et les services. En revanche, la fréquence d'isolement des bactéries anaérobies reste faible, en général inférieure à 3 % depuis plus de 10 ans (tableau 14.1).

L'interprétation des hémocultures positives est simple si le même germe est retrouvé à partir de plusieurs prélèvements et si la clinique est évocatrice. De plus, lorsqu'un pathogène spécifique (*Brucella* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, groupe HACEK, *Pasteurella* spp., *Campylobacter* spp., *Bacteroides* spp. et éléments fongiques) est retrouvé, même à partir d'une seule hémoculture positive, l'étiologie de l'infection ne fait aucun doute. En revanche, lorsqu'un germe commensal est isolé sur les deux flacons d'une seule hémoculture ou à partir d'un seul flacon, le bactériologiste doit tenter de faire une distinction entre souillure et véritable infection. Cette interprétation est impossible sans une étroite collaboration avec le clinicien, ce d'autant plus que les germes isolés (dans certains cas *Staphylococcus aureus* et souvent staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. et *Propionibacterium* spp.) appartiennent généralement à la flore cutanée et/ou environnementale. Par conséquent, la réalisation d'une hémoculture unique devrait être bannie de la pratique clinique puisque son interprétation en cas de positivité est très délicate. Ce problème se rencontre aussi lorsque le patient est porteur de matériel étranger, cathéter et prothèse, puisque des staphylocoques à coagulase négative, particulièrement *Staphylococcus epidermidis*, sont majoritairement isolés d'hémocultures.

Des hémocultures polymicrobiennes peuvent être rencontrées dans certaines circonstances et sur certains terrains ; c'est le cas pour les patients immunodéprimés (cirrhose, cancer colique, dysimmunité, etc.), au cours d'infections cutanées (brûlures, escarres, etc.) ou chez des patients ayant subi une chirurgie abdominale avec effraction. Dans ces situations, les germes retrouvés dans les hémocultures sont le reflet de ceux retrouvés localement au niveau du pus.

Il faut rappeler que, chez les patients au stade d'agonie, il n'est pas rare d'observer le passage de germes dans la circulation sanguine par rupture des barrières, sans que ces germes aient une signification clinique.

Toutes les souches isolées d'hémocultures doivent faire l'objet d'une identification et d'un antibiogramme. En cas de doute sur l'identité de plusieurs isolats, une étude moléculaire doit être réalisée afin de déterminer s'il s'agit bien du même clone.

Tout germe qui sera isolé d'une hémoculture devra être conservé dans une souchothèque à –80 °C.

## Hémocultures négatives

Les hémocultures négatives signent le plus souvent une absence réelle de bactéries dans le sang. Cependant, devant un contexte clinique évocateur de sepsis, d'endocardite infectieuse ou de tout autre syndrome infectieux, il faut toujours penser à une fausse négativité. Les causes d'échec de cultures sont nombreuses : prélèvement effectué au moment non optimal, trop tardivement au cours de la maladie ; prélèvement pratiqué sous antibiothérapie ; quantité insuffisante de sang ensemencé ; infection localisée sans bactériémie ; micro-organisme de culture impossible ; ou enfin origine non bactérienne.

Des repiquages négatifs d'hémocultures peuvent aussi être dus à un micro-organisme de culture difficile, le choix des conditions de subcultures n'étant pas adapté et/ou le temps de culture trop court. En effet, pour certains micro-organismes ayant des exigences nutritives particulières, les subcultures pourront se faire sur des milieux différents et en atmosphère adaptée en fonction de la morphologie et du contexte clinique, notamment pour les bactéries comme *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., les bactéries du groupe HACEK, ou des bactéries anaérobies. Les subcultures seront alors conservées au minimum 4 jours et traitées comme recommandé ultérieurement dans les chapitres correspondants. Il en est de même pour les streptocoques déficients, *Abiotrophia* et *Granulicatella*, qui nécessitent du pyridoxal ou de la cystéine pour leur croissance. Elles se caractérisent par une croissance en flacon d'hémoculture et une absence de croissance en milieu gélosé normal. En revanche, ces bactéries pousseront sur milieu gélosé additionné de pyridoxal ou de cystéine, ou en satellitisme autour d'une strie de *S. aureus*.

## Examens complémentaires

### Autres prélèvements

Le biologiste doit rechercher si, parmi les autres prélèvements reçus pour le même patient (LCR, autres liquides de ponctions, pus, urines, etc.), un autre isolat a été obtenu afin de le comparer aux souches isolées à partir des hémocultures ; de même, il doit comparer l'isolat au résultat d'une recherche d'antigène positive. Il faut rappeler que les hémocultures sont très rentables et conseillées dans un contexte de méningite ou de pneumopathie où la recherche d'une antigénurie, pneumococcique ou de légionelle, peut être contributive.

### *Sérologie*

La sérologie peut être utilisée en complément des hémocultures, notamment quand celles-ci sont négatives. Elle permet de diagnostiquer des bactériémies à germes difficilement cultivables comme *Brucella* spp. (test d'agglutination) et *Legionella* spp. (immunofluorescence indirecte [IFI]), mais aussi à germes intracellulaires ou non cultivables en laboratoire de routine comme *C. burnetii* (IFI) avec recherche d'antigènes de phases I et II, *Bartonella* spp. (IFI), ainsi que *Chlamydia pneumoniae* et *psittaci* (IFI) ou *Mycoplasma pneumoniae* (ELISA). En effet, une sérologie positive chez des patients présentant des signes de septicémie avec des hémocultures négatives permet d'affirmer un diagnostic étiologique.

### *Techniques de biologie moléculaire*

Plusieurs techniques de biologie moléculaire peuvent être utilisées pour aider au diagnostic des septicémies à hémocultures négatives. L'amplification génique (PCR) de fragments internes aux gènes codant pour l'ARN 16S, associée à la détermination de la séquence nucléotidique du fragment obtenu, ou pour un gène spécifique sont les plus utilisées pour la recherche et l'identification de germes à partir de sérum ou de sang total. Ces techniques permettent notamment d'identifier les germes non cultivables comme *C. burnetii* et *Bartonella* spp., mais aussi *Tropheryma whipplei* ou des germes devenus incultivables du fait d'une antibiothérapie prolongée préalablement. Il est à noter qu'actuellement la biologie moléculaire est peu recommandée sur sang total du fait de la présence de nombreux inhibiteurs qui peuvent rendre le résultat faussement négatif.

Néanmoins, certains fabricants proposent des kits pour la détection d'ADN de bactéries et de champignons directement dans le sang par biologie moléculaire en cas de suspicion de sepsis. Des études de faisabilité ainsi que de sensibilité et spécificité sont nécessaires afin d'évaluer ces différents kits.

Au total, la réalisation des prélèvements, le traitement des flacons d'hémocultures et l'interprétation des résultats constituent un tout nécessitant des précautions tout au long de la chaîne, une négligence initiale (souillure) pouvant compromettre un diagnostic et orienter vers une fausse piste. Le diagnostic des bactériémies et des septicémies est essentiel dans un laboratoire de bactériologie, les hémocultures permettant le plus souvent d'isoler et d'identifier l'agent responsable et d'orienter le choix de l'antibiothérapie grâce à l'antibiogramme, voire la détermination de la CMI directement ou par E-test®. Cet examen est primordial, car bon nombre de septicémies engagent le pronostic vital et seul un traitement approprié institué rapidement permet d'améliorer le pronostic. La négativation des cultures constitue également un élément non négligeable pour apprécier l'efficacité du traitement.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

BLOT F, NITENBERG G, BRUN-BUISSON C. New tools in diagnosing catheter-related infections. Support Care Cancer 2000 ; 8 : 287–92.

DUNE Jr WM, LAROCCO M. Laboratory diagnosis of bacterial infections. In : Cimolai N, editor. Blood culture systems. New York–Basel : Marcel Dekker Inc ; 2001. p. 189–209.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, et al. Color atlas and texbook of diagnosis microbiology. In : Guidelines for the collection, transport, processing, analysis and reporting of cultures from specific sources. 5th ed. Philadelphie–New York : Lippincott ; 1997. p. 121–70.

O'HARA CM, WEINSTEIN MP, MILLER JM. Manual of clinical microbiology. In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors. Manual and automated systems for detection and identification of micro-organisme. 8th ed. Washington DC : ASM Press ; 2003. p. 185–207.

CHAPITRE

15

# Endocardites

P. Parize, J.-L. Mainardi

## Introduction

L'endocardite infectieuse (EI) est une maladie sévère, toujours associée à une mortalité importante malgré les avancées de la prise en charge chirurgicale et les progrès des traitements anti-infectieux. Cette infection reste peu fréquente, avec une incidence annuelle standardisée sur l'âge et le sexe de 31 cas/an/million d'habitant, pour la France métropolitaine [1]. Cette incidence est restée stable au cours de ces dernières années, comme l'ont montré les études les plus récentes [1–6], malgré une amélioration de la prise en charge [7] et la pratique de l'antibioprophylaxie pour les gestes à risque. Ce paradoxe est expliqué par l'évolution des facteurs de risque d'EI. Si les facteurs prédisposants classiques, comme les valvulopathies postrhumatismales, ont été éradiqués dans les pays industrialisés, de nouveaux facteurs ont vu le jour. Ceux-ci incluent : les dégénérescences sclérotiques des valves cardiaques, expliquant la fréquence de survenue d'EI dans la tranche d'âge de 70–80 ans [1], l'augmentation de la pose de prothèses valvulaires cardiaques liée aux dégénérescences des valves, la toxicomanie intraveineuse et l'augmentation des EI iatrogènes et nosocomiales [8].

Durant les 40 dernières années, des modifications significatives sont survenues dans la microbiologie des EI : augmentation de la fréquence d'isolement des staphylocoques, en particulier *Staphylococcus aureus* [8], mais également des staphylocoques à coagulase négative, et émergence de certaines espèces de streptocoques comme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (ex-*S. bovis* biotype 1). Les nouvelles techniques de diagnostic microbiologique ont permis de faire diminuer la proportion d'EI d'étiologie indéterminée et ont ainsi contribué à l'amélioration de la prise en charge de la maladie. Ces techniques ont permis de confirmer le rôle important des bactéries intracellulaires dans cette pathologie, comme *Coxiella burnetii* (fig. 15.1C), et de mettre en évidence de nouveaux pathogènes, comme les *Bartonella* spp. (fig. 15.1A et 15.1B) et *Tropheryma whipplei.*

## Micro-organismes

Il est classique de distinguer deux cadres nosologiques : les EI à hémocultures positives et les EI à hémocultures négatives.

### Endocardite à hémocultures positives

Lors de l'enquête épidémiologique faite en France en 2008, le diagnostic d'EI était fait par hémoculture dans environ 91 % des cas [6]. Les *Streptococcacae* occupaient la première place des agents infectieux responsables d'EI et représentaient un peu moins de 50 % de l'ensemble des micro-organismes (encadré 15.1) [1,4]. Les streptocoques oraux (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, etc.) étaient stables, responsables de 18 % des cas d'EI. La participation des streptocoques du groupe D (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, ex-*S. bovis* biotype 1) était de 13 % en 2008. Il faut noter que ces micro-organismes représentaient 25 % des cas d'EI en 1999. Cette variabilité dans le temps de l'incidence des EI à streptocoques du groupe D pourrait être entre rapport avec un phénomène cyclique actuellement mal compris. La proportion importante de *S. gallolyticus* dans les cas d'EI s'explique dans tous les cas par deux phénomènes : un âge moyen de survenue plus tardif de l'EI et l'association étroite entre une endocardite à *S. gallolyticus* et la survenue de tumeurs du tube digestif. La place des entérocoques est quant à elle stable, aux alentours de 10 % ; les portes d'entrées de ces micro-organismes, lorsqu'elles sont trouvées, sont le plus souvent urinaires ou digestives. Dans la dernière enquête française, *Staphylococcus aureus* occupait la première étiologie bactérienne des EI, représentant plus d'un quart des micro-organismes responsables de cette pathologie [6]. Dans d'autres études et dans de nombreux pays, ce micro-organisme représente également souvent le germe le plus fréquemment isolé. Les staphylocoques à coagulase négative (9 %), quant à eux, sont essentiellement responsables d'EI survenant sur prothèse cardiaque.

En 1999, l'analyse comparative des principales caractéristiques des EI dues aux streptocoques oraux, streptocoques du groupe D (essentiellement *S. gallolyticus*) et *Staphylococcus aureus*, avait montré que l'âge moyen était significativement plus élevé pour les EI dues aux streptocoques du groupe D et que les patients ayant une EI à streptocoques du groupe D ou à *S. aureus* avaient par ailleurs moins souvent une cardiopathie sous-jacente connue. Les EI à *S. aureus* avaient une létalité plus importante et un recours à une intervention chirurgicale moins fréquente [1].

### Endocardite à hémocultures négatives

Cette entité représente selon les études 1,1 à 55 % des EI [6–13]. Cette large variation est due principalement aux différences dans les critères utilisés pour définir l'EI,

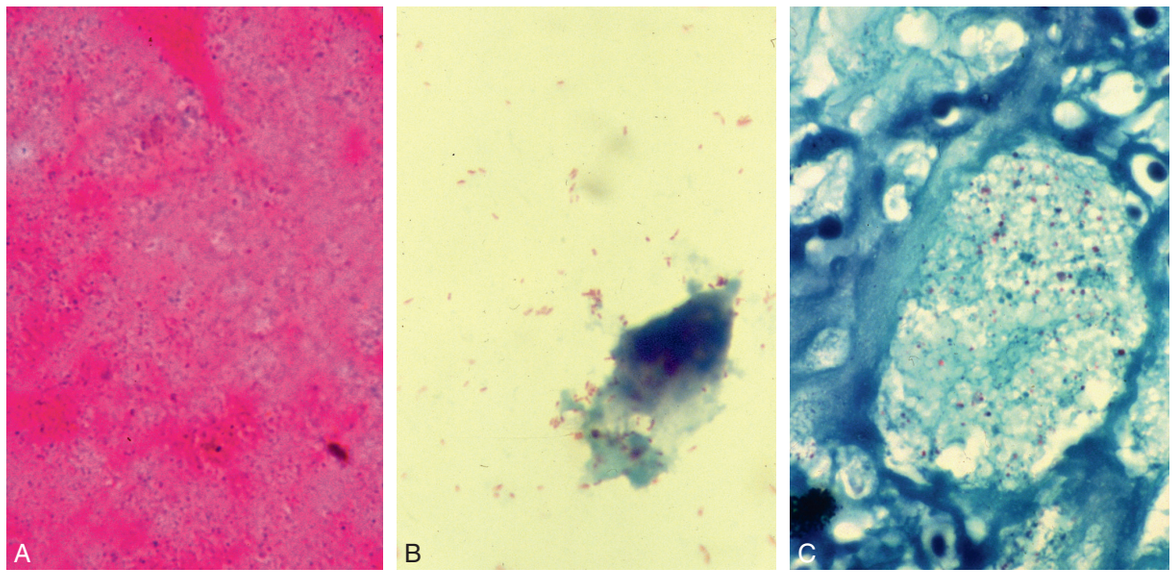



**Fig. 15.1.** – *Colorations effectuées sur des valves cardiaques.*
A) *Bartonella quintana* sur une coupe anatomopathologique d'une valve aortique (coloration de Gram (× 100) montrant la présence de petits bacilles à Gram négatif. B) *Bartonella quintana* dans une hémoculture (coloration de Gimenez (× 100) montrant la présence de petits bacilles apparaissant colorés en rose sur un fond bleu-vert. C) *Coxiella burnetii* sur une coupe anatomopathologique d'une valve aortique (coloration de Gimenez (× 100) montrant la présence de coccobacilles apparaissant colorés en rose sur un fond bleu-vert.

à l'interprétation du résultat des hémocultures, ainsi qu'à l'écart dans les techniques utilisées pour mettre en évidence les micro-organismes. Aujourd'hui, grâce à l'amélioration des milieux d'hémocultures, la proportion des EI à hémocultures négatives a été réduite et se situe autour de 10 % [13] (encadré 15.2). De plus, de nouvelles techniques diagnostiques sérologiques et moléculaires ont permis, depuis une vingtaine d'années, de mettre en évidence certains micro-organismes difficiles ou impossibles à identifier grâce aux hémocultures et ont permis de faire diminuer le nombre d'EI sans agent pathogène identifié autour de 5 %.

La cause principale des EI à hémocultures négatives est l'EI « décapitée » par un traitement antibiotique préalable à la réalisation d'hémocultures, situation qui demeure hélas trop fréquente. Les EI causées par des bactéries de culture fastidieuse ou lente sont la deuxième cause d'EI à hémocultures négatives [14].

Ces bactéries sont dominées par *Coxiella burnetii* (fig. 15.1C) qui a un métabolisme intracellulaire obligatoire et qui se multiplie et vit dans les phagolysosomes des cellules infectées à pH < 5. Cette bactérie, responsable de zoonose, représente 3 à 5 % de l'ensemble des EI et atteint majoritairement les patients ayant une valvulopathie préexistante (88,5 % des cas) [15,16].

Les bactéries du genre *Bartonella* ont également été reconnues comme agent d'EI à hémocultures négatives. Ces endocardites sont majoritairement dues à *B. henselae* et *B. quintana*, avec une prédominance de *B. quintana* [17,18]. Ces bactéries à Gram négatif (fig. 15.1A),

**ENCADRÉ 15.1**

### Micro-organismes responsables d'endocardite infectieuse en France en 2008 [8]

- *Streptococcaceae* : 48 %
  - Streptocoques du groupe D (*S. bovis* biotype 1 ; *S. gallolyticus*) : 13 %
  - Streptocoques oraux : 18 %
  - Entérocoques : 10 %
- *Staphylococcaceae* : 36 %
  - *Staphylococcus aureus* : 27 %
  - Staphylocoques à coagulase négative : 9 %
- Hémocultures négatives : 9 %
- Absence de micro-organisme identifié : 5 %

**ENCADRÉ 15.2**

### Principales étiologies des endocardites à hémocultures négatives

- Hémoculture négativée par une antibiothérapie préalable
- Bactéries à croissance difficile : HACCEK, streptocoques déficients (*Abiotrophia* spp. et *Granulicatella* spp.), *Brucella* spp., *Bartonella* spp.
- Agents fongiques : *Candida* spp., *Aspergillus* spp.
- Micro-organismes non cultivables sur milieu usuel : *Coxiella burnetii, Tropheryma whipplei, Legionella* spp., *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp.

intracellulaires facultatives, représentent 3 % des EI. *B. quintana* est transmis essentiellement par les poux de corps alors que *B. henselae* est transmis à l'homme par morsure ou griffure de chat ou par les puces de chat. Certaines caractéristiques épidémiologiques permettent de distinguer les deux types d'EI ; l'un, causé par *B. quintana*, survient principalement chez les patients sans valvulopathie préalablement connue, alcooliques et souvent sans domicile fixe et exposés aux poux de corps ; et le second, dû à *B. henselae*, est rencontré chez des patients ayant une valvulopathie sous-jacente souvent en contact avec des chats.

Assez récemment, la responsabilité de *Tropheryma whipplei* comme agent responsable d'EI à hémocultures négatives a été montrée après isolement et culture de la bactérie d'une valve cardiaque en 2000 [19]. Plusieurs études ont souligné la possibilité de survenue d'une atteinte isolée de l'endocarde par cet agent pathogène avec une absence des autres localisations classiques, en particulier digestives, de la maladie de Whipple [20,21]. Grâce à la biologie moléculaire et en particulier au développement de PCR spécifique de *T. whipplei*, il a été noté une augmentation des cas d'EI imputables à ce micro-organisme au cours de ces dernières années.

Enfin, parmi les autres bactéries pouvant être responsables d'EI à hémocultures négatives, les bactéries du groupe HACCEK (*Haemophilus* spp., *Actinobacillus actinomycetem commitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*) de la cavité oropharyngée sont les plus nombreuses (environ 2 à 3 %). Elles sont caractérisées par une croissance parfois difficile rendant compte d'un délai plus long pour leur mise en évidence au laboratoire, mais qui a été cependant nettement raccourci avec l'amélioration des milieux d'hémocultures.

Une place à part est représentée par les endocardites fongiques. En effet, si les espèces de *Candida* et d'*Aspergillus* sont rarement responsables d'EI, elles doivent être systématiquement évoquées dans les endocardites postopératoires, sur prothèses cardiaques, ou survenant chez le toxicomane [22].

### Nature des micro-organismes sur valves prothétiques versus valves natives

Les endocardites sur prothèses cardiaques survenant dans la première année après l'acte opératoire sont le plus souvent dues aux staphylocoques à coagulase négative introduits au moment de la chirurgie. Les micro-organismes responsables d'EI survenant à plus d'un an de la chirurgie se rapprochent de ceux responsables d'EI sur valve native.

## Physiopathologie

### Généralités

L'événement primaire dans la survenue d'EI est représenté par l'adhérence bactérienne sur l'endocarde de valves cardiaques lésées au cours d'une bactériémie, même transitoire. Si des gestes médicochirurgicaux invasifs peuvent engendrer un passage sanguin de certaines bactéries, certains gestes de la vie courante (mastication, brossage de dents, etc.) engendrent également des bactériémies transitoires rendant compte de la fréquence des EI survenant en l'absence de gestes à risque. L'adhérence bactérienne fait intervenir des facteurs tissulaires valvulaires et des facteurs bactériens. La deuxième étape dans la survenue d'EI consiste en la persistance et en la multiplication des bactéries au niveau de l'endocarde associées le plus souvent à une extension locale responsable de dégâts valvulaires. La troisième étape est représentée par la dissémination des micro-organismes dans les différents organes (rate, cerveau, rein, os, etc.) à l'occasion d'embolies septiques.

### Adhérence aux tissus valvulaires lésés

Des lésions inflammatoires ou mécaniques des valves conduisent à la colonisation bactérienne au cours des bactériémies [7].

- En réponse à une inflammation locale, les cellules endothéliales expriment différentes protéines, en particulier des intégrines [7,23], qui lient la fibronectine plasmatique à la surface des cellules endothéliales permettant l'adhésion des bactéries grâce à leur récepteur à la fibronectine. Une fois cette étape accomplie, les bactéries sont internalisées. En réponse à cette invasion, les cellules produisent différentes substances, en particulier des cytokines qui induisent l'agrégation de plaquettes, de fibrine et de cellules monocytaires conduisant à la formation des végétations. Ces phénomènes inflammatoires seraient responsables de la fréquence importante des EI à *S. aureus* chez des patients sans valvulopathie préexistante ou chez les patients toxicomanes par injection de substances impures.
- Les lésions mécaniques engendrent une altération de l'endothélium et entraînent la mise en contact des éléments sanguins avec les composants sous-endothéliaux aboutissant à la formation d'un coagulum. Ce coagulum, contenant du fibrinogène, de la fibrine et des plaquettes, constitue l'endocardite thrombotique non bactérienne. La colonisation bactérienne a lieu secondairement au cours d'une bactériémie. Cette colonisation engendre la production de cytokines responsable de l'augmentation du coagulum infecté donnant naissance à la végétation.

### Rôle des facteurs bactériens

Les principales espèces bactériennes responsables d'EI possèdent des adhésines bactériennes favorisant la colonisation, appelées MSCRAMMS (*microbial surface component reacting with adhesive matrix molecules* [24]) comme le récepteur au fibrinogène, à la fibronectine ou les exopolysaccharides.

### Survie des bactéries in situ

Après colonisation, les bactéries peuvent survivre et échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Les souches isolées d'EI sont résistantes à des facteurs plaquettaires,

en particulier au facteur microbicide plaquettaire [25], et également résistantes aux facteurs humoraux, comme le complément, ainsi qu'à différents facteurs cellulaires.

### Dissémination

La dissémination est favorisée par différentes exo-enzymes et exotoxines responsables des dégâts valvulaires locaux. Ces phénomènes aboutissent à un dysfonctionnement valvulaire par extension de l'infection, formation d'abcès septal et myocardique et, à terme, insuffisance cardiaque. La fragmentation de végétations est responsable d'emboles septiques ou non septiques. L'essaimage de micro-organismes rend compte de foyers septiques secondaires. Le relargage d'antigènes entraîne la formation de complexes immuns circulants et les phénomènes cliniques et biologiques de vascularite. Enfin, des dilatations de la paroi artérielle (anévrismes mycotiques) peuvent survenir et se rompre, responsables d'hémorragies.

## Diagnostic

Si en théorie le diagnostic d'EI repose sur l'association d'une bactériémie persistante et de lésions histologiques des valves cardiaques, des critères plus cliniques, échographiques et microbiologiques ont été proposés [26,27]. Ces critères de Duke ont permis d'améliorer la sensibilité du diagnostic d'EI sans perdre en spécificité et sont maintenant largement utilisés dans les études épidémiologiques.

La mise en évidence du germe responsable d'EI reste une des pierres angulaires du diagnostic et de la thérapeutique des EI. De nombreux « outils » sont maintenant disponibles et des recommandations microbiologiques et anatomopathologiques ont été faites pour améliorer le diagnostic [13,28]. Elles concernent les hémocultures, les sérologies, la mise en culture du sang sur culture cellulaire, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, et les techniques microbiologiques et anatomopathologiques d'études des valves et prothèses cardiaques.

### Hémocultures

Lors des endocardites, une bactériémie est constante, ce qui permet de réaliser des hémocultures quelle que soit la température du patient. Des informations cliniques pertinentes avec la mention « suspicion d'EI » doivent être indiquées au laboratoire.

#### *Nombre et type d'hémocultures*

En l'absence de traitement antibiotique dans les jours précédents et grâce à l'amélioration des milieux d'hémocultures, une série de trois hémocultures aérobies et anaérobies dans un intervalle de 24 heures espacées au minimum de 1 heure sont suffisantes [28–30]. En effet, pour les principaux agents responsables d'EI, les deux premières hémocultures sont positives dans plus de 90 % des cas. L'amélioration des milieux d'hémocultures rend compte également de l'isolement fréquent actuellement de *Candida* spp. au cours des EI fongiques. Si les trois premières hémocultures recommandées sont négatives après 48 à 72 heures d'incubation, une deuxième série d'examens doit être réalisée (encadré 15.3). Ces investigations incluent la pratique d'une série de trois nouvelles hémocultures en diversifiant si possible les milieux : flacons contenant des résines absorbantes ou du charbon pour inhiber l'action des antibiotiques en cas d'antibiothérapie antérieure, hémocultures de type lyse-centrifugation pour favoriser la croissance de germes exigeants en culture. Dans beaucoup d'hôpitaux, des systèmes de détection automatisée des hémocultures sont maintenant utilisés avec des flacons contenant des résines captant les antibiotiques.

#### *Durée d'incubation*

Il est toujours recommandé de prolonger la durée d'incubation pour une durée ≥ 15 jours pouvant aller jusqu'à 4 semaines, même si, avec l'amélioration des milieux d'hémocultures, le gain d'une incubation prolongée puisse apparaître plus faible que par le passé [31].

**ENCADRÉ 15.3**

**Stratégie diagnostique en cas de suspicion d'endocardite infectieuse à hémocultures négatives (d'après [13]).**

- Dans les 24 premières heures :
  - 3 hémocultures (flacons aérobies et anaérobies) ; avertir le laboratoire de la suspicion d'EI
- Si les hémocultures sont négatives après 48 heures d'incubation : investigation EI à hémocultures négatives :
  - 3 nouvelles hémocultures utilisant des résines captant les antibiotiques ou les systèmes de lyse-centrifugation
  - sérologies pour *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp.
  - facteurs rhumatoïdes et anticorps antinucléaires
- Si négatif :
  - 1 tube de sang EDTA pour PCR spécifique *Bartonella* spp. et *T. whipplei, Coxiella burnetii* et PCR ARN 16S et 18S
- Si négatif :
  - autres sérologies : *Chlamydia* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Legionella* spp., *Brucella* spp. et *Mycoplasma* spp., *Western-blot* pour *Bartonella* spp.
  - 1 tube de sang hépariné pour cultures cellulaires
- Si intervention chirurgicale, analyses des valves, de végétations, d'emboles :
  - coloration de Gram et de Gimenez
  - cultures prolongées (acellulaires)
  - méthodes moléculaires (PCR ARN 16S et 18S)
  - analyses histologiques avec coloration spéciale (Wharting Starry, PAS, Gimenez, Grocott)

## Sérologie

Si les trois premières hémocultures recommandées sont négatives après 48 à 72 heures d'incubation, il est justifié de réaliser des examens complémentaires comprenant au minimum des sérologies pour *Coxiella burnetii* et *Bartonella* spp. Pour *Coxiella burnetii*, en utilisant la technique de référence en immunofluorescence, un titre d'anticorps en IgG antiphase 1 ≥ 800 associé à un taux d'anticorps en IgA ≥ 100 est hautement prédictif et sensible, avec une sensibilité de 100 % et une valeur prédictive positive de 98 % [32]. Pour *Bartonella*, un titre d'IgG ≥ 800 avec la technique d'immunofluorescence est associé à une valeur prédictive positive de 95,5 % en faveur de la responsabilité de *Bartonella* en cas d'EI [17]. En fonction du contexte épidémiologique, d'autres sérologies pour des agents responsables d'EI à hémocultures négatives peuvent être demandées : *Brucella* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Candida* spp. et *Aspergillus* spp. (encadré 15.3).

## PCR sanguine

Deux techniques de réaction de PCR peuvent être utilisées sur sang en fonction du contexte, une PCR ayant pour cible un gène commun à toutes les bactéries, le gène qui code l'ARN ribosomal 16S, ou une PCR spécifique d'une espèce bactérienne en cas d'orientation diagnostique, par exemple établie sur la sérologie [33]. Il faut cependant noter que la PCR 16S est moins sensible à partir de sang que de matériel valvulaire et qu'il est raisonnable de l'envisager en cas de négativité des autres investigations (encadré 15.3). Très récemment, des techniques de PCR en temps réel sur sérum pour *Coxiella burnetii*, *Bartonella* et *T. whipplei* ont permis de montrer une sensibilité comprise entre 58 et 65 % pour le diagnostic. Ces techniques ne sont cependant actuellement pratiquées que par certains laboratoires. La PCR spécifique de l'agent de la fièvre Q n'apporterait pas de bénéfice diagnostique par rapport aux techniques sérologiques ; en revanche, les PCR *Bartonella* et *T. whipplei* peuvent être pratiquées sur sang en cas de bilan sérologique négatif, en particulier en l'absence de matériel valvulaire disponible pour analyse microbiologique. Des techniques de PCR fongique à large spectre sur sang peuvent également être réalisées avec une recherche d'ARN fongique 18S [13].

## Techniques microbiologiques d'étude des valves cardiaques (fig. 15.2)

Sur la partie de la végétation ou de la valve excisée destinée à l'anatomopathologie et avant son envoi, il est recommandé de réaliser trois empreintes sur lames. Une coloration de Gram et une coloration pour la mise en évidence de germes intracellulaires (coloration de Gimenez, coloration de Giemsa ; fig. 15.1) doivent être effectuées. Le broyat de la partie de la végétation est ensuite mis en culture [28]. Le résidu est congelé à –80 °C pour d'éventuelles études ultérieures (culture sur milieu cellulaire, biologie moléculaire). Les techniques de biologie moléculaire peuvent permettre d'identifier le micro-organisme responsable de l'EI, à condition d'avoir accès à du tissu valvulaire excisé au cours d'une chirurgie cardiaque. La PCR 16S représente actuellement une aide diagnostique importante pour les EI à hémocultures négatives puisqu'elle permet de mettre en évidence le micro-organisme à l'origine de l'infection dans un tiers des cas [20,34,35]. Certaines équipes considèrent qu'en cas de matériel valvulaire disponible, la biologie moléculaire doit être privilégiée par rapport à la culture classique en raison de la meilleure sensibilité de cette technique. Les PCR spécifiques de *Coxiella burnetii*, *Bartonella* et *T. whipplei* peuvent également être réalisées à partir de valves cardiaques réséquées, ainsi que la PCR fongique 18S [13].

## Étude anatomopathologique des valves cardiaques

En cas de chirurgie cardiaque, l'analyse anatomopathologique des valves cardiaques ou des végétations réséquées doit être systématiquement réalisée en parallèle de l'étude microbiologique afin de confirmer le diagnostic d'endocardite et de mettre en évidence le caractère non infectieux de certaines atteintes de l'endocarde (endocardites de Libmann-Sacks ou marastiques) [13,28].

## Culture du sang sur milieu cellulaire

Cette technique, réservée à des laboratoires spécialisés, peut permettre l'isolement de bactéries intracellulaires obligatoires (*Coxiella burnetii*, *Tropheryma whipplei*) ou facultatives (*Bartonella* spp.) (encadré 15.3). Cette technique fastidieuse semble ne pas apporter un bénéfice diagnostique important et doit donc être envisagée si tous les autres moyens diagnostiques sont négatifs. Comme pour la culture du sang sur milieu acellulaire, cette recherche, si elle est réalisée, doit être effectuée avant toute antibiothérapie.

## Étude de la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques

Cette étude doit être systématique et interprétée selon les recommandations du CA-SFM [36]. Une détermination de la CMI par la technique d'E-test® ou par une technique de référence est nécessaire pour les antibiotiques utilisés en thérapeutique. L'étude de sensibilité des souches de streptocoques et des entérocoques issues de l'enquête de 1999 [37] a montré que toutes les souches étaient sensibles à la pénicilline ou à l'amoxicilline avec des CMI ≤ 4 mg/l. Des hauts niveaux de résistance aux aminosides étaient observés chez *S. gallolyticus* et *Enterococcus faecalis*. Toutes les souches étaient sensibles aux glycopeptides. Dans cette enquête, il a été noté l'émergence de souches de streptocoques oraux résistantes à l'érythromycine.

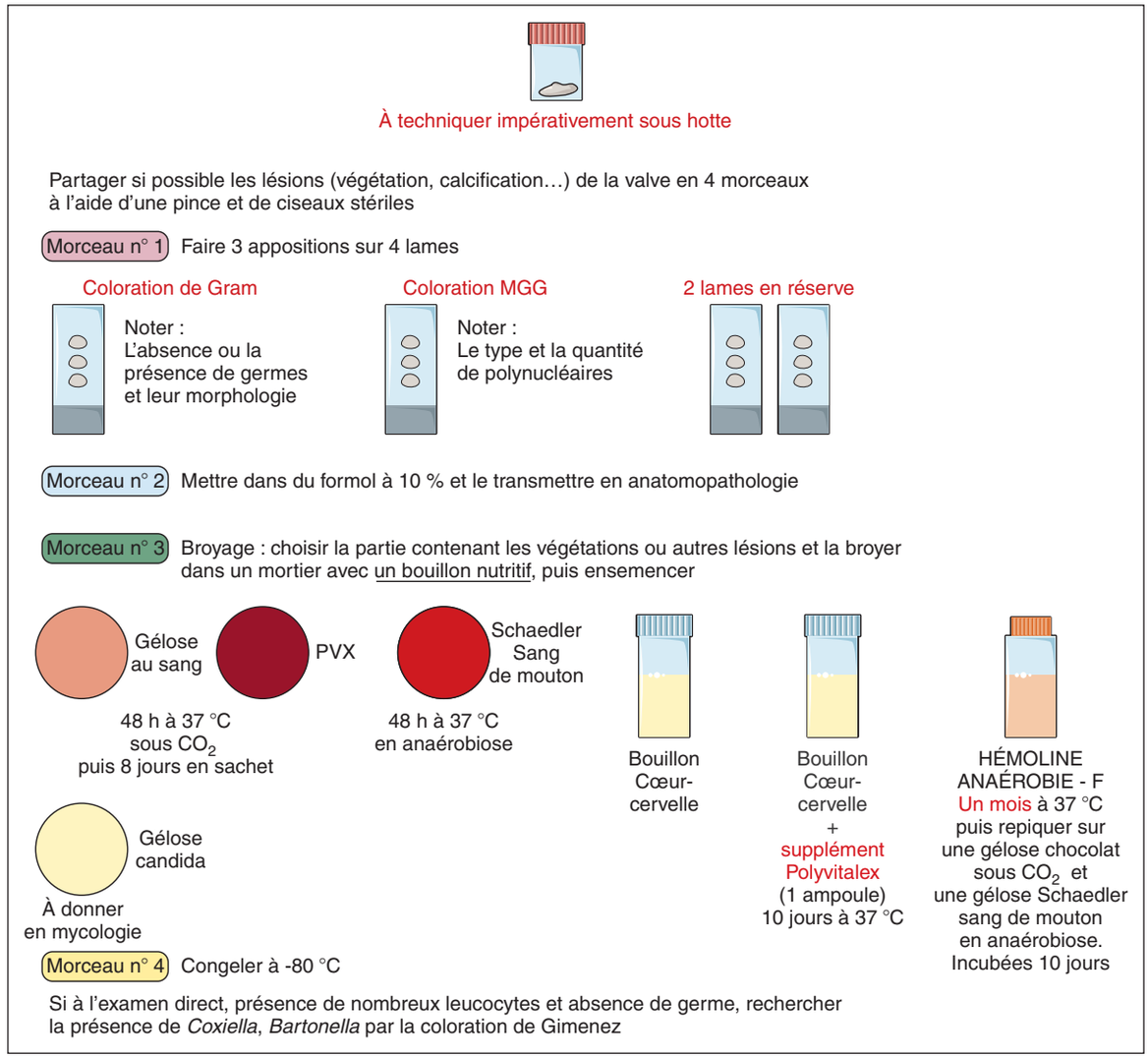



**Fig. 15.2.** – *Techniques d'études microbiologiques de valves cardiaques.*

## Traitement

La prise en charge de l'EI repose essentiellement sur l'éradication des micro-organismes par un traitement anti-infectieux bactéricide. Une prise en charge chirurgicale complémentaire est souvent nécessaire pour exciser les tissus infectés, drainer les abcès ou éliminer un matériel étranger sur lequel un biofilm s'est formé. Par ailleurs, la recherche et l'éradication des portes d'entrée infectieuses en fonction du micro-organisme responsable de l'EI constitue une partie de la prise en charge à ne pas négliger.

### Antibiothérapie

L'antibiothérapie doit être bactéricide et prolongée. La nature et la durée de l'antibiothérapie dépendent de plusieurs facteurs incluant la nature du micro-organisme, sa sensibilité aux antibiotiques, la survenue sur valve native ou sur prothèse, l'existence de complications et de tares sous-jacentes (insuffisance rénale). Les anti-infectieux sont administrés par voie parentérale de façon prolongée, en particulier pour les EI sur prothèse valvulaire. Le calcul de la durée de l'antibiothérapie prend en compte le premier jour de traitement anti-infectieux efficace. En cas de remplacement valvulaire avec culture positive de la valve excisée, la durée de l'antibiothérapie est définie à partir du jour de la chirurgie cardiaque. L'utilisation de fortes posologies d'antibiotiques assurant des concentrations sériques élevées est nécessaire pour assurer une diffusion des antibiotiques au sein des végétations. La surveillance par dosage sérique est recommandée afin de suivre l'efficacité du traitement anti-infectieux et de prévenir sa toxicité. La détermination du pouvoir bactériostatique ou bactéricide du sérum n'est plus systématique.

Les schémas thérapeutiques proposés pour les principaux micro-organismes sont présentés dans les tableaux 15.1, 15.2 et 15.3 adaptés selon les principales recommandations [6, 29, 38, 39]. Les recommandations thérapeutiques récentes ont tendance à réduire la place des aminosides dans le traitement des EI. En raison de la néphrotoxicité potentielle de cette classe thérapeutique, un schéma thérapeutique comprenant une bithérapie courte ou une monothérapie par β-lactamines est actuellement recommandé dans certaines situations (EI à *S. aureus* sur valve native, EI non compliquées à streptocoques) [38].

## Chirurgie

Presque la moitié des patients atteints d'EI bénéficient d'une prise en charge chirurgicale associée au traitement anti-infectieux. La décision de traitement chirurgical prend en compte les facteurs de risque d'évolution défavorable

**TABLEAU 15-1**

**Traitement antibiotique au cours des endocardites infectieuses (d'après [1]).**

| | | |
|---|---|---|
| – Streptocoques oraux et *S. gallolyticus* sensibles à la pénicilline (CMI < 0,125 mg/l) | Pénicilline G ou amoxicilline ± gentamicine | 1 mois si β-lactamine seule<br>15 jours si bithérapie |
| – Streptocoques oraux et *S. gallolyticus* de sensibilité diminuée à la pénicilline (CMI entre 0,125 et 2 mg/l)<br>– Streptocoques déficients | Pénicilline G ou amoxicilline ou ceftriaxone + gentamicine | 1 mois dont 15 jours de bithérapie |
| – Entérocoques | Amoxicilline + gentamicine | 4 à 6 semaines de bithérapie |
| – Allergie à la pénicilline<br>– Bactéries de haut niveau de résistance à la pénicilline (*E. faecium*) | Vancomycine ou teicoplanine | |

**TABLEAU 15-2**

**Traitement antibiotique au cours des endocardites infectieuses (d'après [2]).**

| | | |
|---|---|---|
| – Staphylocoques sensibles à la méticilline | Oxacilline ou cloxacilline + gentamicine | Valve native : 4 à 6 semaines avec 3–5 jours d'aminosides<br>Valve prothétique : 6 semaines avec 2 semaines d'aminosides et ajout de rifampicine |
| – Staphylocoques résistants à la méticilline<br>– Ou allergie à la pénicilline | Vancomycine + gentamicine | Valve native : 4 à 6 semaines avec 3–5 jours d'aminosides<br>Valve prothétique : 6 semaines avec 2 semaines d'aminosides et ajout de rifampicine |
| – HACCEK | Ceftriaxone ± gentamicine<br>ou ceftriaxone ± ciprofloxacine | 1 mois si β-lactamine seule<br>15 jours si bithérapie |
| – *Bartonella* spp. | Amoxicilline ou ceftriaxone ou doxycycline per os + gentamicine | 4 à 6 semaines dont 3 semaines d'aminosides |
| – *Coxiella burnetii* | Doxycycline + hydroxychloroquine | Variable selon évolution sérologique |
| – *Tropheryma whipplei* | Doxycycline + hydroxychloroquine<br>ou ceftriaxone puis cotrimoxazole | Traitement prolongé 12 à 18 mois |

**TABLEAU 15-3**

**Traitement antibiotique probabiliste au cours des endocardites infectieuses (avant, ou en l'absence d'identification de pathogène).**

| | | |
|---|---|---|
| – Valve native | Amoxicilline + gentamicine<br>ou amoxicilline et acide clavulanique + gentamicine | 4 à 6 semaines dont au minimum 2 semaines d'aminosides |
| – Valve prothétique < 1 an | Vancomycine + rifampicine + gentamicine | 6 semaines dont 2 semaines d'aminosides |
| – Valve prothétique > 1 an | Idem valve native | |

et les comorbidités du patient [40]. L'indication et le délai de la chirurgie doivent être discutés dès le début de la prise en charge du patient avec les chirurgiens cardiaques, car certaines situations peuvent nécessiter une prise en charge urgente (< 24 heures). Trois indications majeures conduisent à une chirurgie : la défaillance cardiaque réfractaire au traitement médical, le non-contrôle de l'infection malgré un traitement anti-infectieux adapté, et la prévention d'événements emboliques.

### Prophylaxie

Les indications et la nature de l'antibioprophylaxie pour les soins dentaires à risque à réaliser en fonction de la nature de la valvulopathie ont été révisées récemment [41–43]. Les dernières recommandations françaises, européennes et américaines concernant la prévention des EI réduisent les indications d'antibioprophylaxie aux seuls patients à haut risque d'EI (porteurs de valves prothétiques, patients ayant des antécédents d'EI ou présentant certaines cardiopathies congénitales). La prophylaxie est recommandée chez ces patients lors des soins dentaires nécessitant une manipulation de la gencive ou de la région périapicale de la dent, ou une perforation de la muqueuse orale. Pour les autres procédures invasives, notamment gastro-intestinales, urologiques ou les explorations respiratoires, une antibioprophylaxie n'est plus recommandée pour aucun groupe de patients.

## Conclusion

L'EI est toujours une pathologie infectieuse d'actualité dont l'incidence reste stable malgré la diminution des patients porteurs de valvulopathies postrhumatismales. On observe, en revanche, une modification du profil des patients atteints d'EI due essentiellement à l'augmentation de cette pathologie chez les patients âgés sans cardiopathie antérieure connue et à l'augmentation des endocardites associées aux soins. Depuis quelques années, il a également été noté des modifications de la répartition des micro-organismes en France, avec une place importante prise par *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (ex-*bovis* biotype 1) et les staphylocoques, en particulier *Staphylococcus aureus*. Ces modifications de la microbiologie ont conduit à une réflexion nouvelle sur l'antibioprophylaxie dont les indications ont été réduites. Enfin, la prise en charge thérapeutique a évolué avec une remise en question de l'intérêt des bithérapies initiales prolongées et une place importante prise par la chirurgie qui semble diminuer la létalité hospitalière.

BIBLIOGRAPHIE


[1] Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Beguinot I, Bouvet A, Briancon S, et al. Association pour l'Étude et la Prevention de l'Endocardite Infectieuse (AEPEI) Study Group. Changing profile of infective endocarditis : results of a 1-year survey in France. JAMA 2002 ; 288 : 75–81.

[2] Delahaye F, Goulet V, Lacassin F, Ecochard R, Selton-Suty C, Hoen B, et al. Characteristics of infective endocarditis in France in 1991. A 1-year survey. Eur Heart J 1995 ; 16 : 394–401.

[3] Hogevik H, Olaison L, Andersson R, Lindberg J, Alestig K. Epidemiologic aspects of infective endocarditis in an urban population. A 5-year prospective study. Medicine 1995 ; 74 : 324–39.

[4] Hoen B. Endocardites infectieuses : épidémiologie et approche diagnostique. Rev Med Interne 2007 ; 28 (Suppl. 1) : 22–6.

[5] Van der Meer JT, Thompson J, Valkenburg HA, Michel MF. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands. II. Antecedent procedures and use of prophylaxis. Arch Intern Med 1992 ; 152 : 1869–73.

[6] Hoen B, et al. ICAACA. 2010.

[7] Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. Lancet 2004 ; 363 : 139–49.

[8] Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis : a consequence of medical progress. JAMA 2005 ; 293 : 3012–21.

[9] Houpikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center : etiologic diagnosis of 348 cases. Medicine 2005 ; 84 : 162–73.

[10] Naber CK, Erbel R. Infective endocarditis with negative blood cultures. Int J Antimicrob Agents 2007 ; 30 (Suppl. 1) : 32–6.

[11] Hoen B, Selton-Suty C, Lacassin F, Étienne J, Briancon S, Leport C, et al. Infective endocarditis in patients with negative blood cultures : analysis of 88 cases from a one-year nationwide survey in France. Clin Infect Dis 1995 ; 20 : 501–6.

[12] Werner M, Andersson R, Olaison L, Hogevik H. A clinical study of culture-negative endocarditis. Medicine 2003 ; 82 : 263–73.

[13] Fournier PE, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta JP, Arzouni JP, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis : a prospective study of 819 new cases. Clin Infect Dis 2010 ; 51 : 131–40.

[14] Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev 2001 ; 14 : 177–207.

[15] Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev 1999 ; 12 : 518–53.

[16] Hartzell JD, Wood-Morris RN, Martinez LJ, Trotta RF. Q fever : epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc 2008 ; 83 : 574–9.

[17] Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, Mainardi JL, Marrie TJ, Bruneel F, et al. Epidemiologic and cli-

BIBLIOGRAPHIE

nical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis : a study of 48 patients. Medicine 2001 ; 80 : 245–51.

[18] Raoult D, Fournier PE, Vandenesch F, Mainardi JL, Eykyn SJ, Nash J, et al. Outcome and treatment of *Bartonella* endocarditis. Arch Intern Med 2003 ; 163 : 226–30.

[19] Raoult D, Birg ML, La Scola B, Fournier PE, Enea M, Lepidi H, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. N Engl J Med 2000 ; 342 : 620–5.

[20] Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Whipple's endocarditis : review of the literature and comparisons with Q fever, *Bartonella* infection, and blood culture-positive endocarditis. Clin Infect Dis 2001 ; 33 : 1309–16.

[21] Schneider T, Moos V, Loddenkemper C, Marth T, Fenollar F, Raoult D. Whipple's disease : new aspects of pathogenesis and treatment. Lancet Infect Dis 2008 ; 8 : 179–90.

[22] Pierrotti LC, Baddour LM. Fungal endocarditis, 1995–2000. Chest 2002 ; 122 : 302–10.

[23] Hemler ME, Elices MJ, Parker C, Takada Y. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. Immunol Rev 1990 ; 114 : 45–65.

[24] Patti JM, Hook M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. Curr Opin Cell Biol 1994 ; 6 : 752–8.

[25] Fowler VG, McIntyre LM, Yeaman MR, Peterson GE, Barth-Reller L, Corey GR, et al. In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in isolates of *Staphylococcus aureus* from endocarditis patients correlates with an intravascular device source. J Infect Dis 2000 ; 182 : 1251–334.

[26] Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis : utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. Am J Med 1994 ; 96 : 200–9.

[27] Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. Clin Infect Dis 2000 ; 30 : 633–8.

[28] Mainardi JL, Vandenesch F, Casalta JP, N'Guyen J, Benoît C, Tissot-Dupont H, et al. Recommandations pour le diagnostic microbiologique et l'étude anatomopathologique des valves cardiaques au cours des endocardites infectieuses. Bulletin de la Société Française de Microbiologie 1995 ; 10 : 12–5.

[29] Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Bolger AF, Levison ME, et al. Infective endocarditis : diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications : a statement for healthcare professionals from the committee on rheumatic fever, endocarditis, and Kawasaki disease, council on cardiovascular disease in the young, and the councils on clinical cardiology, stroke, and cardiovascular surgery and anesthesia, American heart association--executive summary : endorsed by the Infectious Diseases Society of America. Circulation 2005 ; 111 : 3167–84.

[30] Bayer AS, Bolger AF, Taubert KA, Wilson W, Steckelberg J, Karchmer AW, et al. Diagnosis and management of infective endocarditis and its complications. Circulation 1998 ; 98 : 2936–48.

[31] Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. Clin Infect Dis 2005 ; 41 : 1677–80.

[32] Tissot-Dupont H, Thirion X, Raoult D. Q fever serology : cutoff determination for microimunofluorescence. Clin Diagn Lab Immunol 1994 ; 1 : 189–96.

[33] Podglajen I, Bellery F, Poyart C, Coudol P, Buu-Hoi A, Bruneval P, et al. Comparative molecular and microbiologic diagnosis of bacterial endocarditis. Emerg Infect Dis 2003 ; 9 : 1543–7.

[34] Gauduchon V, Chalabreysse L, Étienne J, Celard M, Benito Y, Lepidi H, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 763–6.

[35] Greub G, Lepidi H, Rovery C, Casalta JP, Habib G, Collard F, et al. Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. Am J Med 2005 ; 118 : 230–8.

[36] Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Communiqué 2011. http://www.sfm.asso.fr.

[37] Mihaila-Amrouche L, Schlegel L, Bouvet A, Association pour l'étude et la prévention de l'endocardite infectieuse (AEPEI) Study Group. Impact of susceptibility to antibiotics of streptococci and enterococci isolated from patients with infective endocarditis on antibiotic treatment. Indian J Med Res 2004 ; 119(Suppl.) : 80–3.

[38] Task force on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis of the European Society of Cardiology, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, International Society of Chemotherapy for Infection and Cancer. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009) ; the task force on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2009 ; 30 : 2369–413.

[39] Wilson WR, Karchmer AW, Dajani AS, Taubert KA, Bayer A, Kaye D, et al. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococcci, staphylococci and Hacek microorganisms. JAMA 1995 ; 274 : 1706–13.

BIBLIOGRAPHIE

[40] Delahaye F, Célard M, Roth O, de Gevigney G. Indications and optimal timing for surgery in infective endocarditis. Heart 2004 ; 90 : 618–20.

[41] Delahaye F, Harbaoui B, Cart-Regal V, de Gevigney G. Recommendations on prophylaxis for infective endocarditis : dramatic changes over the past seven years. Arch Cardiovasc Dis 2009 ; 102 : 233–45.

[42] Brooks N. Prophylactic antibiotic treatment to prevent infective endocarditis : new guidance from the National Institute for Health and Clinical Excellence. Heart 2009 ; 95 : 774–80.

[43] Prophylaxie de l'endocardite infectieuse. Révision de la conférence de consensus de mars 1992. Recommandations 2002. Med Mal Infect 2002 ; 32 : 542–52.

CHAPITRE

16

# Diagnostic bactériologique et suivi biologique des méningites bactériennes

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen

La méningite infectieuse est une atteinte du système nerveux central limitée aux méninges par opposition à la méningo-encéphalite touchant le parenchyme cérébral.

Les méningites infectieuses se répartissent en trois groupes : les méningites virales, généralement bénignes et d'évolution spontanée favorable ; les méningites fongiques, rares et le plus souvent liées à une immunodépression ; et enfin les méningites bactériennes.

Parmi les méningites bactériennes, on distingue les méningites iatrogènes généralement associées à un contexte neurochirurgical, et les méningites communautaires. L'épidémiologie de ces dernières varie selon l'âge du patient (tableau 16.1). En pédiatrie, il a été observé cette dernière décennie à la fois une décroissance majeure des cas de méningites à *Haemophilus influenzae* sérotype b (du fait de l'instauration de la vaccination anti-*H. influenzae* sérotype b) et une augmentation des méningites à *Streptococcus pneumoniae* de sensibilité diminuée aux β-lactamines. Lors de méningites iatrogènes, les germes en cause sont le plus souvent des staphylocoques *aureus* ou coagulase négative, et des bacilles à Gram négatif (entérobactéries ou bacilles non fermentants).

Si le diagnostic de méningite est initialement envisagé sur des arguments cliniques, l'élément décisif pour affirmer une méningite repose sur l'examen du liquide céphalorachidien (LCR). Il s'agit toujours d'un examen d'urgence à traiter le plus rapidement possible.

## Prélèvement de LCR

Le prélèvement de LCR se fait habituellement par ponction lombaire (PL) dans l'espace L4–L5 ou L5–S1. Exceptionnellement, chez le nouveau-né, le prélèvement peut se faire par ponction transfontanellaire ou par ponction ventriculaire directe.

L'indication d'une PL est posée dans différents contextes :

- syndrome méningé ;
- en cas d'infection maternofœtale, pour éliminer toute atteinte méningée secondaire ;
- une PL de contrôle est parfois recommandée 36 à 48 heures après le début de l'antibiothérapie, pour vérifier l'efficacité du traitement antibiotique, un retard de stérilisation du LCR étant associé à la survenue de séquelles neurologiques. C'est le cas notamment des méningites à pneumocoques de sensibilité diminuée aux β-lactamines, et des méningites néonatales ;
- une PL de contrôle est également préconisée en cas de méningites néonatales, 48 heures après la fin du traitement.

## Démarche diagnostique

Le LCR est recueilli dans trois tubes à hémolyse stériles pour distinguer une hémorragie méningée d'une éventuelle brèche vasculaire locale lors du prélèvement. Il fait l'objet d'analyses biochimiques, cytologiques et bactériologiques (fig. 16.1).

Du fait de l'importance du diagnostic, de la fragilité des bactéries à tout écart de température, et en raison de la lyse rapide des polynucléaires, le LCR, aussitôt prélevé, devra être acheminé au laboratoire pour analyses, à l'abri du froid.

### Examen macroscopique

La première étape de l'analyse consiste à noter l'aspect du liquide. Le LCR normal est limpide et classiquement dit « eau de roche ». Différents aspects pathologiques peuvent être observés : eau de riz (ou trouble, à partir d'environ 200 éléments/mm$^3$), xanthochromique, hématique voire hémorragique. En cas de PL hémorragique, l'aspect xanthochromique du LCR après centrifugation peut témoigner d'une hémorragie méningée ancienne.

### Analyse biochimique

Deux paramètres sont systématiquement dosés dans le LCR : la glycorachie, et la protéinorachie.

La glycorachie doit toujours être déterminée simultanément à la glycémie, une glycorachie normale étant égale aux deux tiers de la glycémie. Une hypoglycorachie est généralement associée à une méningite bactérienne. Cependant, une hypoglycorachie est parfois observée lors de méningites ourliennes, de méningites à entérovirus, de chorioméningites lymphocytaires, de méningo-encéphalites herpétiques ou à cytomégalovirus (CMV), de certaines méningites carcinomateuses, lors d'hémorragies méningées ou au cours des sarcoïdoses. La glycorachie est le premier paramètre à se normaliser dans la

**TABLEAU 16-1**

**Épidémiologie bactérienne des méningites en fonction de l'âge.**

| *Nouveau-né* | *Enfants de 3 mois à 2 ans* | *Enfant de 2 à 15 ans*<br>*Adulte jeune* | *Adulte âgé* |
|---|---|---|---|
| Streptocoque groupe B<br>*Escherichia coli*<br>*Listeria monocytogenes* | *S. pneumoniae*<br>*Neisseria meningitidis* | *N. meningitidis*<br>*S. pneumoniae* | *S. pneumoniae*<br>*L. monocytogenes*<br>*N. meningitidis* |

PL de contrôle, la persistance d'une hypoglycorachie étant de mauvais pronostic, et pouvant témoigner d'une ventriculite.

Les valeurs normales de la protéinorachie sont comprises entre 0,10 et 0,45 g/l, ces valeurs étant cependant plus élevées en période néonatale jusqu'à 2 mois (tableau 16.2). Lors de méningites purulentes, la protéinorachie varie entre 1 et 5 g/l, et l'hyperprotéinorachie peut persister 2 à 3 semaines après le début de la méningite. Au cours du traitement, la protéinorachie est plus longue à se normaliser que la glycorachie ou la réaction cellulaire.

Des hyperprotéinorachies sont également observées dans certaines pathologies neurologiques, mais le contexte clinique diffère de celui des méningites.

Par ailleurs, en cas de suspicion de méningite tuberculeuse (BK), le dosage des chlorures montre une hypochlorurachie (normale : 110–120 meq/l).

Enfin, en cas de suspicion de méningite virale (en particulier à virus Echo, Coxsackie, oreillons, CMV, VZV [virus de la varicelle et du zona]), de même qu'en cas d'encéphalite herpétique, il y a augmentation de l'interféron α du LCR au début des signes cliniques (normale < 2 UI). Ce dosage est principalement réalisé par méthode biologique (culture cellulaire). Le dosage de l'interféron α doit être interprété en fonction du titre sérique, une atteinte virale méningée montrant une concentration plus élevée dans le LCR que dans le sérum.

## Examen microscopique

La **numération en cellule de Malassez** permet d'évaluer le nombre d'éléments nucléés et d'hématies par $mm^3$. En dehors de la période néonatale, le LCR a une cellularité comprise entre 3 et 5 éléments/$mm^3$ (tableau 16.2).

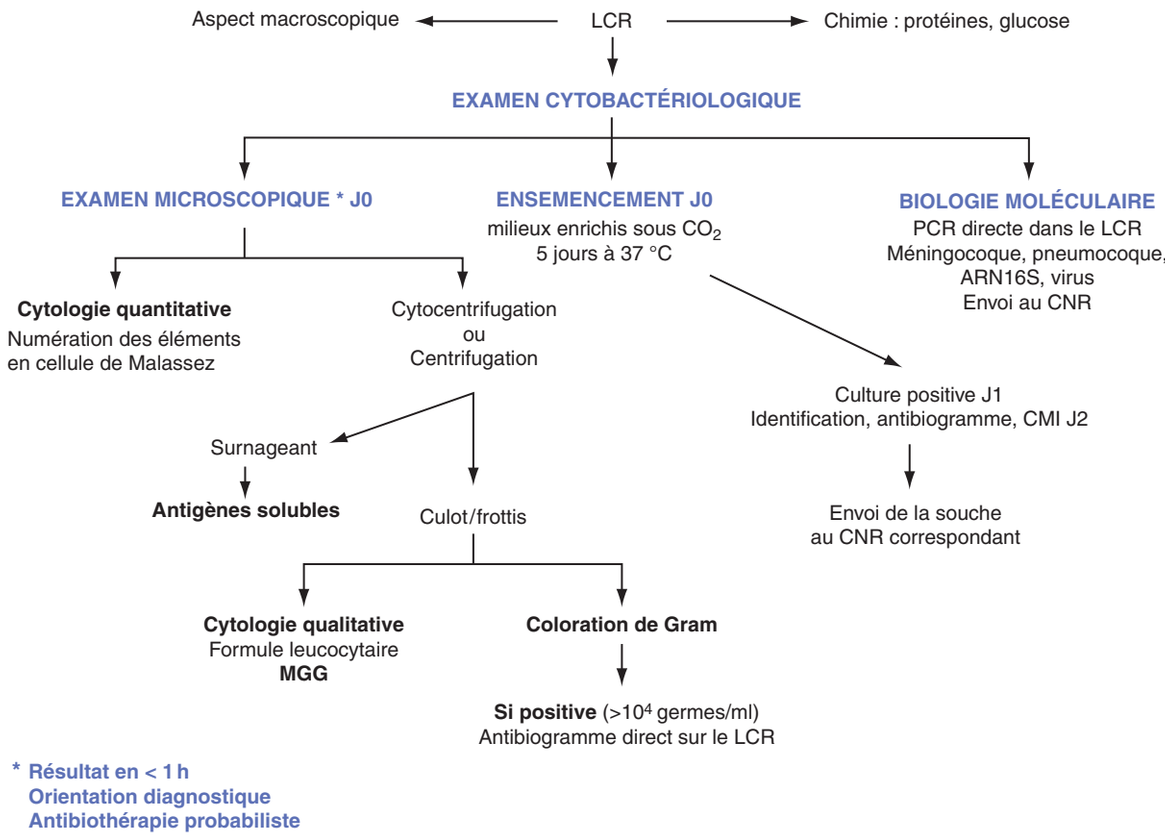



Fig. 16.1. – *Démarche diagnostique sur le liquide céphalorachidien (LCR).*

**TABLEAU 16-2**

**Caractéristiques du LCR normal en fonction de l'âge.**

| *Âge* | *Aspect* | *Cellules par mm³* | | *Protéines (g/l)* |
|---|---|---|---|---|
| | | *Moyenne* | *Écart* | |
| Prématuré | Jaune ou rosé | 9 | 0–29 | 0,65–1,50 |
| Nouveau-né à terme, 1re semaine de vie | Incolore ou xanthochromique | 8 | 0–22 | 0,2–1,70 |
| 0–4 semaines | Incolore et limpide | 11 | 0–50 | 0,35–1,89 |
| 4–8 semaines | Incolore et limpide | 7 | 0–50 | 0,19–1,21 |
| > 6 semaines | Incolore et limpide | 2 | – | 0,20–0,45 |

En fonction de l'âge et au-delà de 10 éléments/mm³, la formule leucocytaire est établie après cytocentrifugation et coloration au May-Grünwald-Giemsa.

La **coloration de Gram,** élément essentiel du diagnostic, permet la mise en évidence des bactéries dans le LCR (fig. 16.2 à 16.6).

En cas de PL hémorragique non coagulée, une dilution dans du sérum physiologique permet de calculer le rapport hématies/leucocytes : s'il est > 1000, il reflète le rapport sanguin, alors que s'il est < 1000, il peut témoigner d'un processus infectieux in situ.

La confrontation des données cytologiques et biochimiques du LCR oriente sur différentes hypothèses diagnostiques (tableau 16.3).

- **LCR avec prédominance de polynucléaires**
  - Éléments > 10/mm³, avec polynucléaires > 50 %
  - Hypoglycorachie
  - Hyperprotéinorachie

  } Probable méningite bactérienne

Généralement, le LCR des méningites bactériennes non traitées montre plus de 1000 éléments/mm³ dont plus de 80 % de polynucléaires neutrophiles.

- **LCR avec prédominance lymphocytaire**
  - Éléments > 10/mm³, avec lymphocytes > 50 %
  - Hyperprotéinorachie

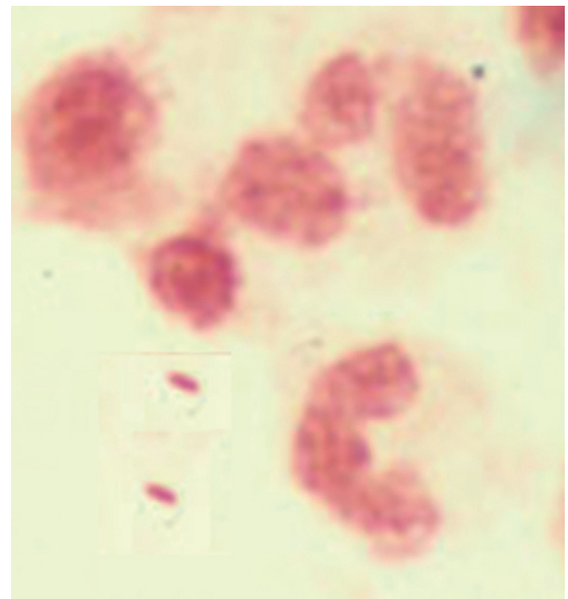


**Fig. 16.3.** – *Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à* E. coli *K1.*

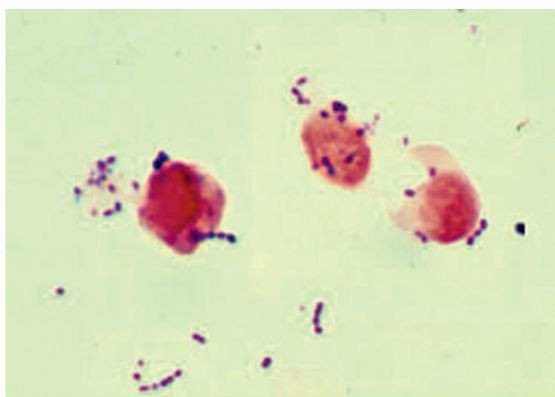


**Fig. 16.2.** – *Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à* S. agalactiae.

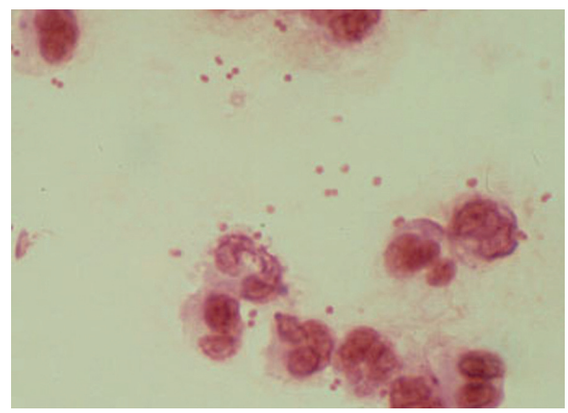


**Fig. 16.4.** – *Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à* N. meningitidis.

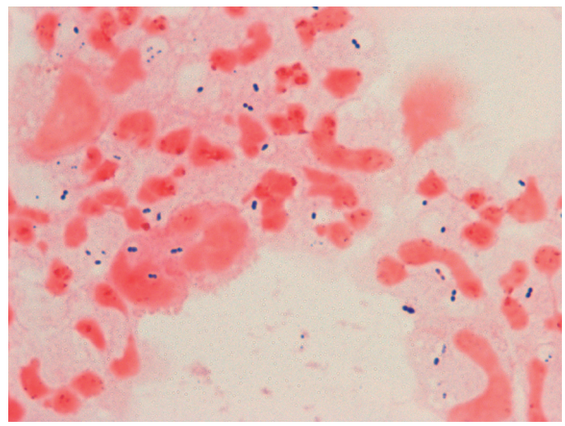


Fig. 16.5. – *Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à* S. pneumoniae.

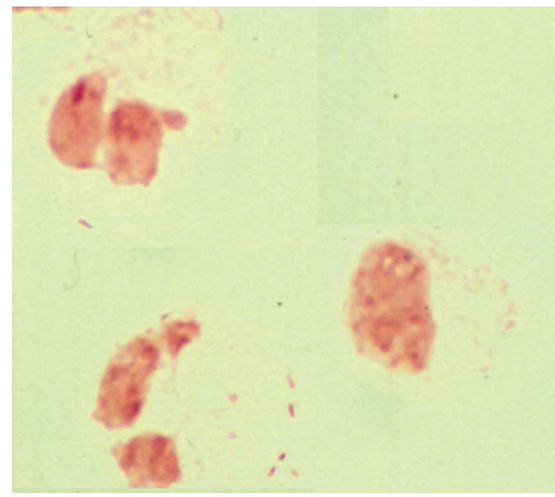


Fig. 16.6. – *Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à* H. influenzae.

- Si hypoglycorachie : en faveur d'une méningite bactérienne ; principalement *Listeria monocytogenes* ou BK si hypochlorurachie
- Si normoglycorachie : en faveur d'une méningite virale, confirmée par dosage de l'interféron α et/ou éventuellement par amplification génique virale.

- **LCR panaché**
  - Éléments > 10/mm$^3$ ; environ 50 % de polynucléaires et de lymphocytes
  - Protéinorachie et glycorachie normales

Les hypothèses diagnostiques sont variables : listériose, méningite purulente ou lymphocytaire à son début, abcès cérébral.

En cas de méningite virale, notamment à entérovirus de type Echovirus, le nombre d'éléments peut être supérieur à 1000 éléments/mm$^3$. Initialement, on peut observer une majorité de polynucléaires comme dans les méningites bactériennes, avec évolution ultérieure vers une cellularité majoritairement lymphocytaire en quelques heures.

## Analyse bactériologique

### *Culture bactérienne*

Quel que soit le nombre d'éléments, le LCR est ensemencé sur milieux de cultures adaptés aux bactéries recherchées. En effet, au tout début d'une méningite bactérienne, il est possible de constater une cellularité normale. Dans de

**TABLEAU 16-3**

**Orientation cytologique et biochimique des LCR.**

| *LCR* | *Aspect* | *Examen microscopique* | | | *Culture* | *PT (g/l)* | *Glu (mmol/l)* | *CRP* / *PCT* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Cytologie/ mm$^3$* | *Formule leucocytaire* | *Gram* | | | | |
| Normal | Eau de roche | < 2<br>< 30 (NN) | – | O | | 0,3 | 2/3 de glycémie | Normal |
| Méningite purulente | Trouble<br>Louche<br>Eau de riz | > 1000* | Polynucléaires 80–90 %* | Cg +<br>Cg +<br>Cg –<br>Bg – | Pneumocoque<br>SGB<br>Méningocoque<br>*Haemophilus*<br>Etc. | > 1 | < 2/3 de glycémie | CRP +++<br>PCT +++ |
| Méningite à liquide clair | Clair ou louche | 100–500 | Panaché | Bg + | *Listeria* | > 1 | < 2/3 de glycémie | CRP ++<br>PCT ++ |
| Méningite à liquide clair | Clair ou louche | 100–500 | Lymphocytes | Ziehl BAAR | *M. tuberculosis* | > 1 | < 2/3 de glycémie | |
| Méningite à liquide clair | Clair ou louche | 10–100 | Lymphocytes | 0 | Virus* | < 1 | Normale | CRP ±<br>PCT – |

PT : protéinorachie, Glu : glycorachie, CRP : protéine C-réactive, PTC : procalcitonine plasmatique.
* Penser aux méningites à entérovirus.

rares cas et selon les données cliniques, la recherche de germes anaérobies peut être envisagée. Les cultures sont observées quotidiennement, avec une réponse provisoire à 48 heures, et conservées en incubation 5 jours. Selon la cytologie ou le contexte clinique, différentes possibilités peuvent être envisagées.

### Cytologie normale

Le LCR est ensemencé en quadrant sur gélose chocolat Isovitalex® et sur gélose Columbia au sang incubées 5 jours à 37 °C sous 5 % de $CO_2$.

### Cytologie anormale et absence de germe à l'examen direct

La mise en culture du LCR sur gélose chocolat Isovitalex® sous 5 % de $CO_2$ et sur gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose est complétée par l'ensemencement d'un bouillon cœur-cervelle. Ces deux milieux sont incubés 5 jours à 37 °C.

### Présence de germes à l'examen direct

La morphologie, le groupement et la coloration de Gram permettent d'orienter le diagnostic. L'examen direct du LCR par la coloration de Gram est généralement positif à partir $10^4$–$10^5$ UFC/ml. Les patients ayant une quantité initiale de germes ≥ $10^7$ UFC/ml ont un risque de stérilisation retardée du LCR et de séquelles à court ou moyen terme plus élevé que les patients ayant un taux initial < $10^7$ UFC/ml.

En conséquence, en plus de l'ensemencement classique, une culture quantitative peut être réalisée par ensemencement au râteau de 100 µl de LCR pur, et de dilutions au 1/10 et 1/100 du LCR, sur géloses chocolat Isovitalex® incubées à 37 °C, sous $CO_2$ (fig. 16.7).

En cas d'examen direct positif, antibiogramme et détermination des CMI peuvent être directement tentés à partir du LCR, et sont confirmés secondairement après isolement bactérien (voir paragraphe « Identification bactérienne… »).

### Cas particuliers

- Patients immunodéprimés : en cas de suspicion de cryptococcose méningée, on recherche le cryptocoque par examen direct à l'encre de Chine. De plus, les ensemencements de la gélose chocolat Isovitalex® et du bouillon cœur-cervelle sont complétés par la mise en culture du LCR sur gélose Sabouraud. Le plus souvent, dans les cryptococcoses méningées, le LCR est lymphocytaire et normoglycorachique.
- Suspicion clinique de tuberculose avec localisation méningée : l'ensemencement sur milieux traditionnels est complété par la mise en culture sur géloses Löwenstein et Coletsos.
- Selon les données cliniques, une recherche de leptospire peut être entreprise. Dans ce contexte, le LCR est normoglycorachique et montre une hypercellularité lymphocytaire.

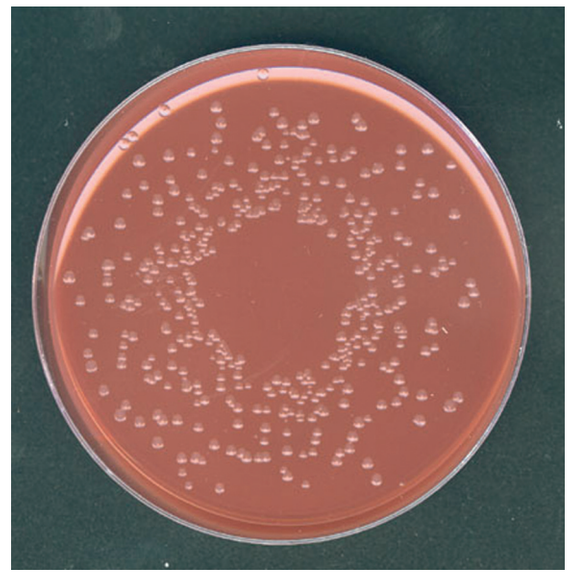


**Fig. 16.7.** – *Numération de germes dans le LCR après ensemencement au râteau ou au Spiralmeter.*
(Méningite à *E. coli* K1 – $10^5$ UFC/ml.)

### *Mise en évidence d'antigènes solubles*

La recherche d'antigènes solubles permet la mise en évidence des polysacharrides capsulaires de différentes bactéries, libérés dans les liquides biologiques au cours des infections. Cette recherche par agglutination de particules de latex sensibilisées est à envisager selon les modalités décrites dans la figure 16.8. On peut détecter des antigènes solubles de streptocoque du groupe B, de *Neisseria meningitidis*, d'*Escherichia coli* sérotype K1, d'*H. influenzae* sérotype b, et de *S. pneumoniae*. À noter que les antigènes capsulaires de *E. coli* K1 et de *N. meningitidis* B sont identiques.

Une technique immunochromatographique, reposant sur la mise en évidence de polysaccharide C de *S. pneumoniae*, a été récemment développée et apparaît plus sensible (Binax NOW®).

En cas de recherche positive sur la PL diagnostique, une appréciation semi-quantitative du titre d'antigènes solubles (exprimé en inverse de dilution) permet un suivi sur la PL de contrôle.

On suivra de même l'élimination urinaire de l'antigène soluble.

### *Biologie moléculaire*

La recherche de gènes spécifiques de certaines bactéries (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae, H. influenzae*, etc.), voire du sérogroupe bactérien ou de virus, peut être effectuée à l'aide de techniques d'amplification génique (PCR) directement réalisées sur le LCR. Ces techniques spécifiques

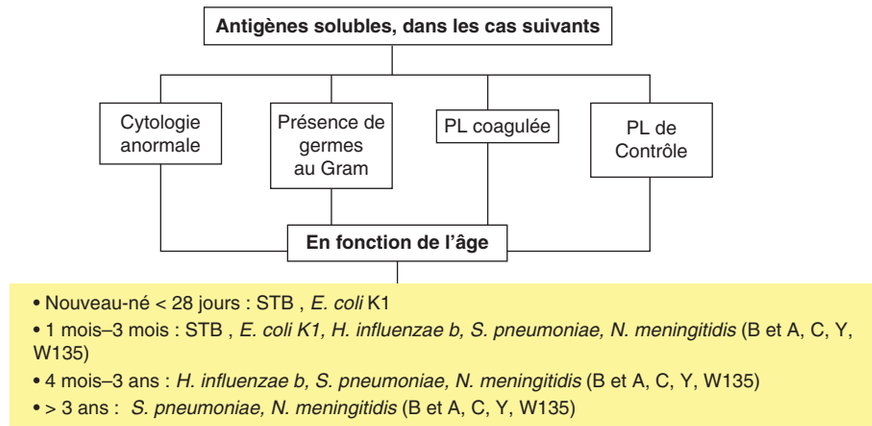



**Fig. 16.8.** – *Recherche d'antigènes solubles dans le liquide céphalorachidien.*

et rapides sont utiles lorsque l'examen direct et les antigènes solubles sont négatifs, ou en cas de méningite décapitée. Elles sont développées dans les chapitres 4 (fig. 4.8) et 33 (fig. 33.8).

De plus, la détection de *N. meningitidis* avec précision du sérogroupe peut être effectuée, par PCR (dans différents laboratoires et/ou au Centre national de référence [CNR] des *Neisseria*. Cette technique permet d'orienter la prophylaxie des sujets contacts, en cas de culture négative. Elle peut également être réalisée sur une biopsie d'un élément purpurique dans le cas d'un purpura fulminans.

## Identification bactérienne et détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries isolées font l'objet d'une identification allant jusqu'au sérogroupe ou sérotype pour *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *L. monocytogenes* et *S. pneumoniae*. En cas de méningite méningococcique, la prophylaxie des sujets contacts (traitement antibiotique ± vaccination) dépend du sérogroupe de la souche, un vaccin n'étant disponible que pour les sérogroupes A, C, Y et W135. L'envoi des souches isolées aux centres de référence correspondants est impératif.

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques repose sur l'antibiogramme standard, voire sur la détermination des CMI pour *S. pneumoniae* et *N. meningitidis*.

En 2008, 31 % des souches de pneumocoques isolées de LCR étaient de sensibilité diminuée à la pénicilline G (23 % pénicilline I et 8 % pénicilline R) et 8 % l'étaient au céfotaxime I. Entre 2001 et 2008, on observe une tendance à la diminution de la résistance à la pénicilline G quel que soit le groupe d'âge des patients. En 2008, dans les méningites des enfants de moins de 2 ans, il y a une augmentation significative des sérotypes de remplacement, en particulier les sérotypes 19A (25 % des souches), 7F (17 %), 24F et 15A (10 %) (données du CNR Pneumocoque, Rapport 2009).

En 2008, 24 % des souches de *N. meningitidis* isolées de méningites étaient de sensibilité diminuée à la pénicilline G, avec des CMI maximales à 0,75 mg/l (données du CNR Méningocoque, Rapport 2010).

Pour les méningites à *S. pneumoniae* et à *N. meningitidis*, les CMI de la pénicilline G, de l'amoxicilline et du céfotaxime ou de la ceftriaxone sont donc primordiales à déterminer pour adapter le traitement antibiotique. Les recommandations du CA-SFM 2011 figurent dans le tableau 16.4.

En cas d'évolution clinique défavorable, ou s'il n'y a pas de stérilisation du LCR, le dosage des antibiotiques dans le LCR permet si nécessaire d'adapter les posologies d'antibiotiques.

## Recherche d'antibiotique dans le LCR

La recherche d'antibiotique par procédé microbiologique est souhaitable pour éliminer toute cause de cultures faussement négatives : une goutte de LCR est déposée à la surface d'une gélose préalablement ensemencée par inondation avec une suspension bactérienne d'un germe sensible tel un streptocoque du groupe B (fig. 16.9). Une zone d'inhibition retrouvée après 24 heures d'incubation témoigne de la présence effective d'antibiotique dans le LCR. L'ensemencement d'un bouillon cœur-cervelle peut

**TABLEAU 16-4**

**Concentrations critiques en mg/l pour *S. pneumoniae* et *N. meningitidis*.**

| | *Concentrations critiques en mg/l* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *S. pneumoniae* | | *N. meningitidis* | |
| | *S* | *R* | *S* | *R* |
| Pénicilline G | ≤ 0,06 | > 2 | ≤ 0,06 | > 0,25 |
| Amoxicilline | ≤ 0,5 | > 2 | ≤ 0,12 | > 1 |
| C3G | ≤ 0,5 | > 2 | ≤ 0,12 | |

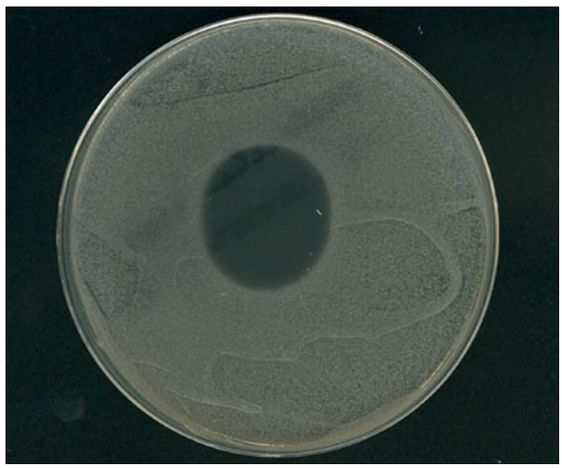


**Fig. 16.9.** – *Effet inhibiteur associé à la présence d'antibiotique dans le LCR d'un patient traité.*

cependant permettre d'éliminer, par effet de dilution, l'inhibition de la croissance bactérienne due à l'antibiotique. Cette recherche est effectuée en cas de suspicion de méningite décapitée et dans les PL de contrôle.

## Autres examens biologiques

Parallèlement à l'étude du LCR, le diagnostic et le bilan biologique d'une méningite sont complétés par d'autres examens biologiques. Une hémoculture, au minimum, est ainsi pratiquée pour majorer les chances d'isolement du germe, notamment en cas de bactérie fragile, telle que le méningocoque, ou de traitement déjà débuté.

Dans le cadre du bilan biochimique, les dosages et les évolutions de la protéine C-réactive (CRP) et/ou de la procalcitonine plasmatique (PCT) sont également essentiels pour le diagnostic et le suivi du traitement des méningites bactériennes. La PCT est plus sensible et spécifique que la CRP lors d'un processus infectieux bactérien. Lors d'une méningite bactérienne, l'élévation de la PCT est plus importante et plus précoce que celle de la CRP. Ainsi, le dosage de la PCT permet de différencier précocement méningite bactérienne et méningite virale, et diminue rapidement sous traitement antibiotique adapté.

Enfin, ce bilan biologique est complété par une numération formule sanguine. Une leucopénie est considérée comme un critère de gravité.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Antignac A, Ducos-Galand M, Guiyoule A, Pires R, Alonso JM, Taha MK. *Neisseria meningiditis* strains isolated from invasive infections in France (1999–2002) : phenotypes and antibiotic patterns. Clin Infect Dis 2003 ; 37 : 912–20.

Bonadio WA. The cerebrospinal fluid : physiologic aspects and alterations associated with bacterial meningitis. Pediatr Infect Dis J 1992 ; 11 : 423–32.

Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Communiqué 2010.

17e Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse «Les méningites purulentes communautaires» ; SPILF 2008. Med Mal Inf 2009 ; 39(3) : 145–210.

Feigin RD, McCracken Jr GH, Klein JO. Diagnosis and management of meningitis. Pediatr Infect Dis J 1992 ; 11 : 785–814.

Feldman WE. Relation of concentrations of bacteria and bacterial antigen in cerebrospinal fluid to prognosis in patients with bacterial meningitis. N Engl J Med 1977 ; 296 : 433–5.

Gendrel D, Bohuon C. Procalcitonin in pediatrics for differentiation of bacterial and viral infections. Intensive Care Med 2000 ; 26 : S178–81.

Gendrel D. Apport des données biochimiques dans le diagnostic des méningites purulentes communautaires. Med Mal Inf 1996 ; 1068–72.

Greenlee JE. Approach to diagnosis of meningitis. Cerebrospinal fluid evaluation. Dis Clin North Am 1990 ; 4 : 583–8.

Marcos M, Martinez E, Almela M, et al. New rapide antigen test for diagnosis of pneumococcal meningitis. Lancet 2001 ; 357 : 1499–500.

Mariani-Kurkdjian P, Doit C, Le Thomas I, et al. Concentrations bactériennes dans le liquide céphalorachidien au cours des méningites de l'enfant. Presse Med 1999 ; 28 : 1227–30.

Silver TS, Todd JK. Hypoglycorrhachia in pediatric patients. Pediatrics 1976 ; 58 : 67–71.

Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 855–7.

Varon E, Janoir C, Gutmann L. Centre National de Référence des Pneumocoques : Rapport d'activité année 2009.

ADRESSES UTILES

**CNR *Escherichia coli* et shigelles**
Dr François-Xavier Weill
Institut Pasteur
Unité biodiversité des bactéries pathogènes émergentes
25–28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83 40 ou 01 45 68 87 39 – Fax : 01 45 68 88 37
E-mail : colishig@pasteur.fr

**CNR *Escherichia coli* et shigelles – Laboratoire associé**
Pr Edouard Bingen
AP–HP – Hôpital Robert-Debré
Service de microbiologie
48, boulevard Serrurier, 75019 Paris
Tél. : 01 40 03 23 40 – Fax : 01 40 03 24 50
E-mail : edouard.bingen@rdb.aphp.fr

**CNR *Haemophilus influenzae***
Dr Olivier Gaillot
Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHU de Lille
Boulevard du Professeur J. Leclercq
59037 Lille cedex
Tél. : 03 20 44 54 80 Fax : 03 20 44 48 95
E-mail : olivier.gaillot@chru-lille.fr

**CNR Méningocoques**
Dr Mohamed Taha
Institut Pasteur
Unité des *Neisseria*
25–28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83 30 ou 01 40 61 31 08 – Fax : 01 40 61 30 34
E-mail : meningo@pasteur.fr

**CNR Pneumocoques**
Dr Emmanuelle Varon, Pr Laurent Gutmann
Hôpital européen Georges-Pompidou
Laboratoire de microbiologie
20, rue Leblanc, 75908 Paris cedex 15
Tél. : 01 56 09 39 67 – Fax : 01 56 09 24 46
E-mail : laurent.gutmann@hop.egp.aphp.fr

**CNR Streptocoques**
Pr Claire Poyart
AP–HP/Groupe hospitalier Cochin–Saint-Vincent-de-Paul
Service de bactériologie
27, rue du Faubourg Saint-Jacques
75679 Paris cedex 14
Tél. : 01 58 41 15 44 – Fax : 01 58 41 15 48
E-mail : claire.poyart@cch.ap-hop-paris.fr

CHAPITRE

17

# Analyse bactériologique des selles

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen

## Introduction

Les diarrhées aiguës infectieuses sont responsables, dans les pays en voie de développement du tiers des décès par déshydratation. Elles restent fréquentes dans nos régions comme en témoigne la fréquence des toxi-infections alimentaires familiales ou des collectivités (crèches, etc.).

Tous les épisodes diarrhéiques (selles fécales) ou dysentériques (selles aqueuses, non fécales) ne sont pas infectieux. Toutes les diarrhées infectieuses ne sont pas bactériennes (parasites, levures, virus). Toutes les diarrhées bactériennes ne sont pas dues à des bactéries spécifiques (diarrhées par dysmicrobisme, c'est-à-dire par modification dans l'équilibre des flores intestinales). La prescription d'une coproculture doit être envisagée après avoir éliminé une cause non infectieuse de diarrhée grâce à l'examen clinique et l'interrogatoire.

De nombreuses bactéries sont incriminées dans l'étiologie des diarrhées infectieuses aiguës. Certaines d'entre elles ont un pouvoir entéropathogène bien établi (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., etc.) (tableau 17.1). D'autres bactéries sont devenues pathogènes après acquisition de facteurs de virulence. C'est le cas en particulier d'*Escherichia coli*, espèce représentant 80 % de la flore intestinale aérobie de l'homme. *E. coli* est à la fois une bactérie commensale et une bactérie entéropathogène par l'expression de facteurs de virulence acquis et/ou constitutifs. Ainsi, un pouvoir entéropathogène est actuellement reconnu pour six pathovars d'*E. coli* :

- Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement et de la diarrhée du voyageur.
- Les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) sont responsables de dysenteries proches de la shigellose.
- Les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) sont retrouvés au cours des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique.
- Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont la cause de diarrhées infantiles persistantes souvent épidémiques dans les pays en voies de développement. Certains sérotypes d'EPEC ont également été incriminés au cours du SHU.
- Les *E. coli* à adhésion diffuse (*diffusely-adhering E. coli* [DAEC]) et les *E. coli* entéroagrégatifs (EAggEC) sont à l'origine de diarrhées aqueuses persistantes chez l'enfant.

Le but essentiel de la coproculture est de rechercher, parmi une flore commensale très abondante, des bactéries habituellement absentes et réputées pour leur pouvoir pathogène. On peut également, en plus de la recherche de ces bactéries, mettre en évidence des toxines ou des gènes codant pour les toxines dans les selles (*Clostridium difficile*, EHEC).

Les recherches sont fonction des différents contextes cliniques :

- adulte ou enfant de plus de 2 ans et contexte par défaut :
  - réalisation d'une coproculture standard comprenant la recherche de *Salmonella* spp., de *Shigella* spp. et de *Campylobacter* spp. (voire *Yersinia enterocolitica* si le sujet est diarrhéique).
- enfant de moins de 2 ans :
  - réalisation d'une coproculture standard en sachant que l'étiologie virale prédomine dans cette tranche d'âge.
- contextes cliniques particuliers :
  - notion de voyage récent en « pays tropical » ;
  - malade sous traitement antibiotique ;
  - toxi-infection alimentaire collective (TIAC) ;
  - patients infectés par le VIH ;
  - syndrome hémolytique et urémique (SHU) ;
  - intoxination alimentaire ;
  - syndrome cholériforme ;
  - détection de colonisation par des bactéries multirésistantes (BMR) ;
  - détection de portage chez le personnel de restauration (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*).

## Prélèvements

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

Les selles seront recueillies dans un récipient stérile. Les flacons choisis doivent être bien hermétiques (fermeture à vis) et munis d'une cuillère ou d'une spatule permettant un prélèvement et un ensemencement plus pratiques. À partir de matières fécales émises dans un récipient propre, la valeur de quelques grammes de selles est prélevée à l'aide d'une spatule ou du flacon cuillère et introduite dans un flacon stérile. Un fragment purulent muqueux ou sanglant est choisi lorsqu'il en existe.

Un écouvillonnage rectal est parfois indiqué, notamment chez le nourrisson et l'enfant.

Les biopsies de muqueuse rectale faites sous rectoscopie sont analysées comme des matières fécales en l'absence de demande spécifique du clinicien (par exemple recherche de BK). Il est préférable, lorsque cela est possible, de techniquer la coproculture immédiatement. Si ce n'est pas le cas, la conservation se fera à +4 °C et ne devra pas dépasser 12 heures.

Certaines bactéries doivent être recherchées systématiquement (le plus couramment : *Salmonella, Shigella,*

TABLEAU 17-1

**Mécanismes pathogéniques des bactéries entéropathogènes.**

| *Entéro-invasif* | *Cytotoxique* | *Toxigénique* | *Adhérent* |
|---|---|---|---|
| *Salmonella* | *C. difficile* | *Vibrio cholerae* | EPEC |
| *Shigella* | *Shigella* | *Shigella* | EHEC |
| *Y. enterocolitica* | EPEC | *Y. enterocolitica* | |
| *Campylobacter* | EHEC | ETEC | |

*Yersinia* et *Campylobacter*) et d'autres ne le sont que sur demandes spécifiques dans un contexte particulier (EHEC, *C. difficile, V. cholerae*, etc.).

Chez un malade atteint d'un épisode aigu de diarrhée, deux ou trois prélèvements peuvent être nécessaires. Pour la recherche d'un portage, notamment dans le cadre de la médecine préventive, un seul prélèvement est généralement admis.

## Démarche diagnostique

### Examen macroscopique

L'aspect macroscopique des selles sera toujours noté et guidera le choix des milieux de cultures.

### Examen microscopique

L'**examen direct à l'état frais** permet de déceler la présence de leucocytes et d'hématies dans les selles (éventuellement de parasites). Il est possible si les selles sont diarrhéiques ou afécales.

#### *Recherche de leucocytes dans les selles diarrhéiques*

- Déposer sur une lame microscopique une petite goutte de mucus fécal ou de selle liquide. Ajouter un égal volume de bleu de méthylène (bleu de Loeffler utilisé pour la coloration des réticulocytes). Mélanger avec une petite baguette de bois.
- Recouvrir d'une lamelle. Laisser la coloration se faire pendant 2 à 3 minutes. Examiner à l'objectif à sec (× 40 ou × 60).

#### *Autre technique*

Dès l'émission de selles liquides, faire un étalement sur lames. Sécher, colorer au bleu de méthylène ou au Giemsa.

La recherche de leucocytes est simple et rapide mais peu sensible :

- 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 entérotoxigéniques : 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.

On note donc la présence de leucocytes, d'hématies, de cellules, la densité et la mobilité de la flore bactérienne (*Campylobacter*, *Vibrio*, etc.), la présence éventuelle de levures.

L'**examen du frottis après coloration de Gram** permet d'apprécier l'importance et l'équilibre de la flore entre les bactéries à Gram positif et Gram négatif. Une flore équilibrée est composée majoritairement de bacilles à Gram négatif, mais toujours avec présence de bacilles à Gram positif. Toute perturbation notable de cet équilibre doit être signalée.

Le mode opératoire est le suivant :

- selle solide : dilution de la selle au 1/10$^{e}$ dans de l'eau distillée, bien agiter au vortex, faire un étalement de la suspension sur lame et colorer ;
- selle liquide : déposer directement une goutte de selle sur lame et colorer.

### Ensemencement

#### *Milieux, inoculum, durée et température d'incubation*

Des milieux sélectifs d'isolement et des milieux d'enrichissement sont utilisés en fonction du contexte clinique.

La recherche de salmonelle et shigelle doit être **systématique**. Différents milieux sélectifs sont commercialisés : gélose *Salmonella Shigella* (SS), gélose Hektoen, etc. Des milieux chromogènes ont été mis au point pour permettre une différenciation plus aisée des salmonelles (SM ID2, OSCM II, etc.). Les milieux sont incubés 24 heures à 37 °C. Pour la recherche de *Salmonella*, on ensemence un milieu d'enrichissement au sélénite – milieu de Leifson – ou au tétrathionate (milieu de Mueller-Kauffmann) avec 0,5 ml de selle. Il est important de les repiquer de préférence après 3 à 6 heures au maximum d'incubation à 37 °C afin d'éviter la multiplication des bactéries commensales mal inhibées au-delà de ce délai.

Il n'existe pas de milieu d'enrichissement pour les *Shigella*.

Le mode opératoire est le suivant :

- dilution de la selle au 1/10e dans de l'eau distillée ;
- ensemencer systématiquement :
  - une goutte de la dilution en quadrant sur un milieu pour recherche de salmonelle, shigelle (Hektoen, SS, milieux chromogènes) ;
  - une goutte de la dilution en **bouillon Mueller-Kauffman** (pour l'enrichissement en salmonelle).
- ensemencer en plus :
  - un milieu de **Karmali** pour la recherche de *Campylobacter* ;
  - selles sanglantes :
    - un milieu **MacConkey Sorbitol** pour la recherche d'*E. coli* O157 et autres STEC, et conserver la selle pour recherche de *Shiga like* toxines (voir chapitre correspondant) ;
    - un milieu sélectif pour ***Yersinia*** (voir chapitre correspondant) ;
    - un milieu sélectif pour rechercher ***Clostridium difficile*** et recherche de la toxine de ***C. difficile*** en immunochromatographie ;
    - un **milieu de Sabouraud** : si présence de levures à l'examen direct ;
    - en cas de suspicion de choléra : ensemencer un milieu spécial alcalin **TCBS** après enrichissement en eau peptonée alcaline à 1 % du NaCl pendant 6 h à 37 °C pour la recherche du vibrion.

La démarche diagnostique de la coproculture est résumée dans la figure 17.1.

## *Recherche de salmonelles et shigelles*

L'orientation s'effectue selon l'**aspect des colonies :**

- sur milieu Hektoen après 24 heures à 37 °C, les colonies suspectes sont $H_2S$ + et lactose – ;
- sur la gélose SS, la présence de colonies incolores ou faiblement colorées avec ou sans centre noir est une forte présomption de *Salmonella* ou de *Shigella* ;
- sur les milieux chromogènes, la détection spécifique de l'estérase des *Salmonella* donne une coloration des colonies variant du rose au mauve.

La démarche diagnostique de la recherche des salmonelles et shigelles est résumée dans la figure 17.2.

On repère au moins cinq colonies suspectes isolées. La recherche de l'uréase (milieu urée-indole) est faite sur **chaque colonie suspecte :**

- éliminer les colonies de *Proteus* : uréase + (milieu urée-indole rouge en 2 heures) ;
- ensemencer avec les autres colonies à partir du milieu urée-indole une galerie d'identification (API 20 E® ou galerie automatisée) et un antibiogramme d'entérobactéries ;
- ensemencer les colonies suspectes sur milieu de Kligler-Hajna.

Devant les caractères biochimiques présomptifs, auxquels on ajoute pour les *Salmonella* le caractère ONPG, on tente une première agglutination sur la culture en milieu de Kligler-Hajna avec un sérum polyvalent anti-*Salmonella* (OMA, OMB, etc.) ou anti-*Shigella*. Si cette agglutination est positive, elle permet de donner au clinicien un diagnostic présomptif qui ne peut être définitif qu'après l'identification biochimique détaillée. Il existe en effet des communautés antigéniques, notamment entre *Salmonella, Enterobacter hafniae* et *Citrobacter.*

L'identification définitive se fait par les caractères biochimiques et l'étude de la formule antigénique (voir le chapitre consacré aux entérobactéries). Un test présomptif des salmonelles consiste en la lyse par les bactériophages spécifiques (phage Salmonella 01 de Felix et Callow ; Biorad) est pratiqué sur une gélose Mueller-Hinton en déposant une microgoutte d'une suspension phagique. À partir de la 5e heure d'incubation à 37 °C, on peut déjà voir une plage de lyse au niveau du dépôt de la goutte.

Le diagnostic différentiel se pose essentiellement entre *Shigella* et *Alkalescens dispar* que l'on différencie par l'alcalinisation en 2 à 3 jours du citrate de Christensen et la présence d'une lysine décarboxylase. Génétiquement, les *Shigella* sont des *E. coli*, immobiles, auxotrophes, adaptés à l'homme et porteurs d'un plasmide d'invasivité. L'isolement et l'identification des *Shigella* sp. sont donc délicats.

## Diagnostic différentiel du genre *Shigella* (tableau 17.2)

*Shigella* est à la fois immobile, non gazogène (sauf variété de *S. flexneri* G), $H_2S$, uréase, LDC, ONPG, citrate Simmons, citrate de Christensen et acétate de Trabulsi négatifs.

## Diagnostic d'espèce des *Shigella* (caractères discriminants)

Ce diagnostic est décrit au tableau 17.3.

## Identification antigénique des *Shigella*

- Utiliser une culture en milieu solide non inhibiteur. Faire les agglutinations de préférence à partir des colonies réensemencées sur milieu de Kligler-Hajna.
- Effectuer les agglutinations à l'aide des réactifs Bio-Rad.
- Les sérotypes les plus répandus en France sont *S. sonnei* et *S. flexneri.*

## Envoi de la souche au CNR *E. coli-Shigella*

Cet envoi se fait à l'Institut Pasteur (Paris) dans un tube de gélose conservation (Bio-Rad, Réf. 63683).

## *Recherche de* Campylobacter *spp*

Les *Campylobacter* spp. (voir chapitre correspondant) représentent désormais la deuxième cause de gastro-

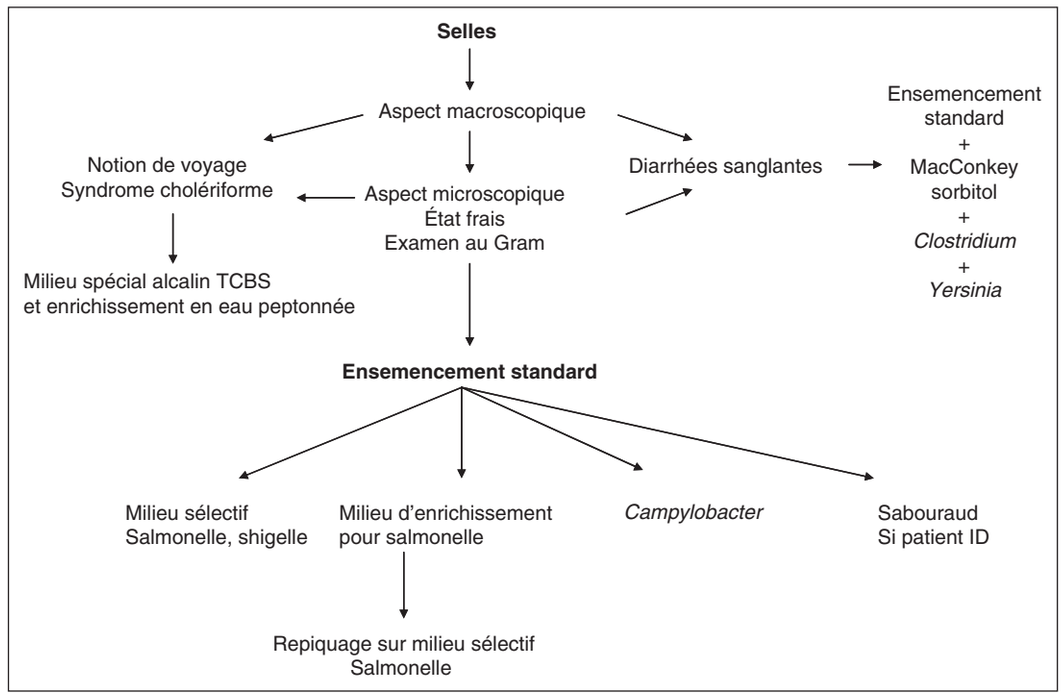



**Fig. 17.1.** – *Démarche diagnostique d'une coproculture.*

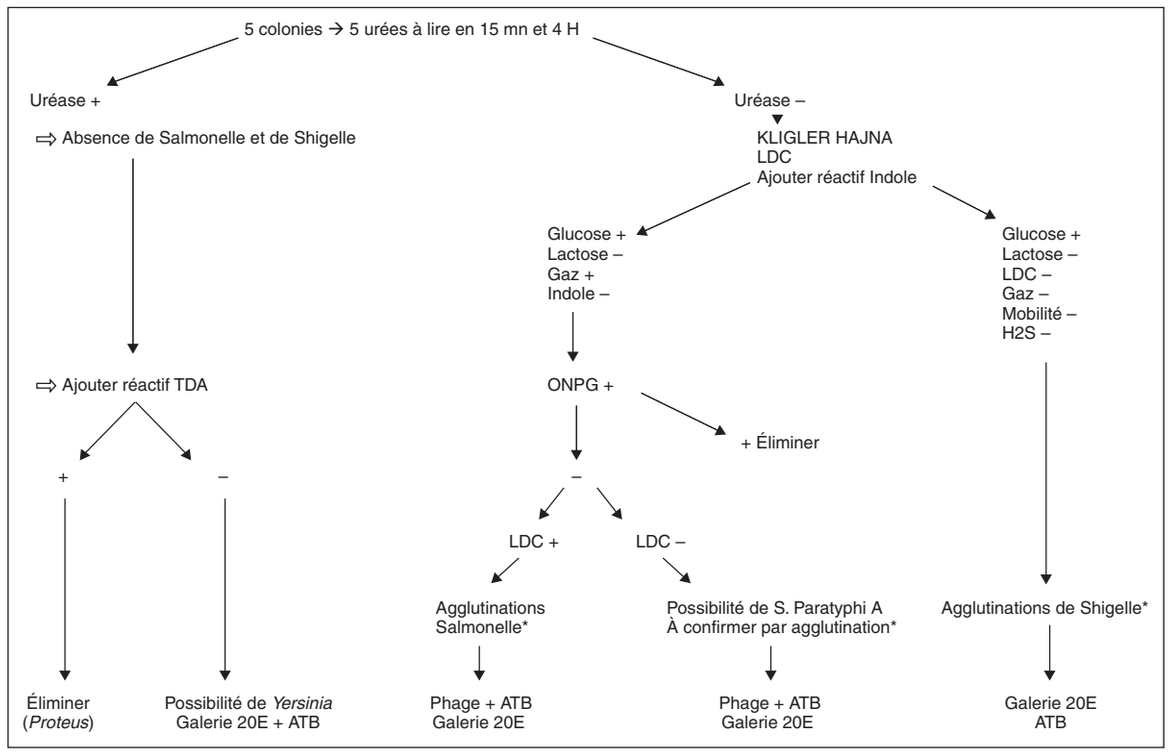



**Fig. 17.2.** – *Démarche diagnostique pour la mise en évidence des salmonelles et des shigelles.*
* Classiquement, on ne procède à l'agglutination qu'après confirmation du diagnostic d'espèce par galerie ; toutefois, on peut être amené pour gagner du temps à pratiquer une agglutination à ce stade.

**TABLEAU 17-2**

**Caractères différentiels entre *Shigella* et *E. coli*.**

| *Caractères* | *Shigella* | *E. coli* | |
|---|---|---|---|
| | | *E. coli* typique | *Alkalescens dispar* |
| ONPG | d | + | + |
| Gaz en glucose | – | + | – |
| Mobilité | – | + | – |
| LDC | – | d | d |
| Acétate de Trabulsi | – | + | d |
| Citrate Christensen | – | + | d |
| Indole | d | + | + |

+ : le plus souvent positif ; d : variable d'une espèce à l'autre.

**TABLEAU 17-3**

**Caractères biochimiques différentiels des différentes espèces de *Shigella*.**

| *Caractères* | *S. dysenteriae* | *S. flexneri* | *S. boydii* | *S. sonnei* |
|---|---|---|---|---|
| ONPG | d | – | – | + |
| Mannitol | – | + | + | + |
| Indole | – | d | d | – |
| ODC | – | – | – | + |

– : le plus souvent négatif ; d : variable d'une espèce à l'autre.

**TABLEAU 17-4**

**Caractères différentiels des principales espèces de *Campylobacter*.**

| | *Catalase* | *Oxydase* | *25 °C* | *42 °C* | *Hippurate* | *Céfalotine* | *Acide nalidixique* | *$H_2S$ (Kligler)* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *C. fetus* | + | + | + | – | – | S | R | – |
| *C. jejuni* | + | + | – | + | + | R | S | – |
| *C. coli* | + | + | – | + | – | R | S | + |

entérite bactérienne en France. Leur recherche doit être systématiquement réalisée chez les enfants et pour les adultes sur demande spéciale ou en présence de selles liquides. La culture se fait sur un milieu spécifique (milieu Karmali, de Skirrow ou de Buztler) en 24 à 48 heures à 37 °C en atmosphère microaérophile.

## Examen direct

L'observation microscopique directe de selles diarrhéiques au microscope à contraste de phase peut permettre un diagnostic avec présence de bactéries présentant une mobilité caractéristique en « vol de mouette ».

L'examen après coloration de Gram met en évidence des petits bacilles à Gram négatif incurvés.

### *Aspect des colonies*

On repère après 48 heures d'incubation les colonies suspectes. Selon l'humidité du milieu, on retrouve de petites colonies grisâtres convexes à bords réguliers ou des colonies plates muqueuses de forme irrégulière.

- *C. fetus*, colonies petites, rondes, transparentes.
- *C. jejuni*, colonies grises, humides, plates et qui ont tendance à s'étaler après 48 heures d'incubation à 37 °C.

Les caractères suivants sont recherchés (tableau 17.4) :

- oxydase + ;
- très mobiles en « vol de mouette » ;
- test à l'hippurate : à partir d'une culture riche sur gélose chocolat Isovitalex® :
  - suspension laiteuse *dans 0,25 ml de Nacl* + un disque d'hippurate :
  - incuber 4 heures à 37 °C ;
  - lecture : ajouter 5 gouttes de ninhydrine ;
  - réincuber 10 à 15 minutes (au maximum) à 37 °C ;
  - test + : bleu foncé ;
  - test – : incolore, jaune léger, bleu très clair.
  - envoi de la souche au CNR *Campylobacter* et *Helicobacter*, Pr Mégraud, Université Bordeaux 2, EA 516.

## *Recherche de* Clostridium difficile

*Clostridium difficile*, bacille à Gram positif anaérobie strict, est à l'origine de colites pseudomembraneuses ou de diarrhées postantibiotiques. Cet agent est majoritairement impliqué dans les diarrhées nosocomiales, en particulier chez l'adulte. Le portage digestif asymptomatique de *C. difficile* est estimé à 3 % dans la population adulte, mais il peut atteindre 15 à 25 % des sujets après un traitement antibiotique ou un séjour dans une unité à forte endémicité. En revanche, un taux de portage élevé est habituellement observé chez les jeunes enfants : 50 à 70 % des enfants de moins de 2 ans sont colonisés.

Les deux facteurs principaux de virulence sont la toxine A et la toxine B. Ce sont des exoprotéines de grande taille.

La toxine A est nommée entérotoxine, car fortement entérotoxique dans le modèle de l'anse ligaturée de lapin ; elle possède également une activité cytotoxique. La toxine B ou cytotoxine est mille fois plus puissante que la A.

Ces toxines inactivent des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine (monoglycosylation des protéines Rho).

Les souches non toxinogènes sont considérées comme non virulentes.

Le diagnostic bactériologique repose sur la recherche des toxines. En parallèle, la culture de *C. difficile* est recommandée. On retiendra qu'il s'agit d'un examen demandé spécifiquement dans un contexte clinique particulier (diarrhée nosocomiale, prise d'antibiotiques, immuno-déprimé).

### Mise en évidence des toxines

La grande majorité des souches produisent simultanément les toxines A et B. Leur mise en évidence directement à partir des selles est un excellent marqueur de la présence d'une souche toxinogène de *C. difficile*.

La méthode de référence consiste à rechercher un effet cytopathogène (ECP) de la toxine B par culture cellulaire (lignées cellulaires MRC5, Vero, CHO, HeP2). Cette méthode présente une excellente sensibilité, n'est pas standardisée et nécessite une infrastructure lourde, avec un le délai de réponse de plusieurs jours.

Des tests immuno-enzymatiques ou immunochromatographiques ont été développés. Ils détectent soit la toxine A seule, soit les toxines A et B au moyen d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Les tests mettant en évidence les deux toxines doivent être utilisés de préférence pour détecter les souches pathogènes A-B+. Les tests unitaires rapides permettent de rendre un résultat en moins de 30 minutes.

En ce qui concerne les techniques de biologie moléculaire, des trousses de PCR en temps réel sont actuellement commercialisées et permettent le dépistage des deux gènes codant les toxines (*tcdA, tcdB*).

#### *Culture et mise en évidence de la bactérie dans les selles*

Le diagnostic rapide par recherche d'antigène dans les selles est effectué par la mise en évidence de la glutamate déshydrogénase par agglutination ou par méthode immuno-enzymatique (Triage™, Biosite®) *C. difficile* Quick Check ou Check complete, Techlab. Couplés au dépistage de la toxine A, ces tests présentent une valeur prédictive négative de plus de 99 %

Concernant l'isolement de *C. difficile* par culture, cette dernière est effectuée dans des conditions d'anaérobiose stricte (sachet individuel ou jarre) sur milieux sélectifs contenant de la cyclosérine et de la céfoxitine comme le milieu TCCA (gélose cœur-cervelle + 5 % de sang de cheval, 0,1 % de taurocholate, 250 mg/l de cyclosérine et 10 mg/l de céfoxitine). Une gélose chromogène Chrom IDC *difficile* est commercialisée (bioMérieux).

Les subcultures peuvent être effectuées sur gélose au sang ou milieu de Wilkins-Chalgren.

Après 48 heures d'incubation en anaérobiose à 37 °C, les colonies présentent les caractéristiques suivantes :

- colonies à bords irréguliers (3 à 5 mm), non hémolytiques, présentant un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire ;
- odeur caractéristique de crottin de cheval (libération de crésol) ;
- colonies fluorescentes sous ultraviolet (mais dépend du milieu utilisé).

L'identification se fait à l'aide de galeries biochimiques (Rapid® ID32A, API 20 A®, etc.). L'identification peut également se faire par un test d'agglutination avec un latex sensibilisé par des anticorps antiglutamate déshydrogénase (GDH).

La culture seule ne permet pas de dire si la souche est toxinogène ou non. Il est donc recommandé de déterminer le pouvoir toxinogène de la souche isolée ; cette méthode s'appelle la culture toxigénique. La détermination du pouvoir toxinogène de la souche peut se faire par PCR à partir des colonies, par le test de cytotoxicité ou par les méthodes immuno-enzymatiques à partir du surnageant d'un bouillon de culture de la souche (après 3 jours environ pour atteindre une production maximale de toxine).

## *Recherche des différents pathovars d'*Escherichia coli

Les différents pathovars responsables de diarrhées ainsi que leurs sérotypes, les gènes de virulence qui leur sont associés et leur principe d'identification sont résumés dans le tableau 17.5.

### Mise en évidence des *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC)

Il était classique de rechercher, en plus des bactéries responsables de diarrhées, les EPEC, dans les selles liquides de nourrissons présentant un tableau de fièvre avec déshydratation (fig. 17.3). Le rôle de ces bactéries est actuellement discuté. Dans cette tranche d'âge, les causes principales restent d'origine virale : *Rotavirus, Adenovirus*.

La procédure d'identification consiste en une agglutination sur lame des colonies en présence de sérums qui doit apparaître en moins de 5 secondes et présenter un caractère massif.

**TABLEAU 17-5**

**Caractéristiques des différents pathovars *d'Escherichia coli* responsables de diarrhées.**

| *Nom* | *Acronymes français (anglais)* | *Pathologie* | *Sérogroupes O associés* | *Facteurs de virulence* | *Support génétique* | *Principes d'identification* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *E. coli* entéropathogène | ECEP (EPEC) | Épidémies de diarrhées infantiles aqueuses fébriles | 26, 55, 86, 111, 114, 119, 124, 125, 126, 127, 128, 142 | Intimine (attachement-effacement) | Locus LEE (gènes *eae*, *tir*) | Sérotypage (kit commercialisé) |
| | | | | *Fimbriae* BFP (adhésion) | Plasmide pEAF (gène *bfp*) | PCR des gènes *eae* ou *bfp* |
| *E. coli* entérohémorragique | ECEH (EHEC, STEC) | Colites hémorragiques sporadiques ou épidémiques, SHU, PTT | 157, 26, 111 | Intimine (attachement-effacement) | Locus LEE (gènes *eae*, *tir*) | Sérotypage- (kit commercialisé) |
| | | | | Shigatoxines STX1 et STX2 | Phages (gènes *stx1*, *stx2*) | PCR des gènes *stx1* et *stx2* |
| | | | | Entérohémolysine | Plasmide pO157 (gène *ehxa*) | |
| E. coli entérotoxinogène | ECET (ETEC) | Diarrhées infantiles aqueuses (tiers-monde), « tourista » | 6, 8, 15, 20, 25, 27, 63, 78, 80, 85, 115, 128, 139, 148, 153, 159, 167 | CFA (adhésion), entérotoxines ST (thermostable) et LT (thermolabile) | Plasmidique (gènes *cfa*, *est*, *elt*) | PCR des gènes *est* et *elt* |
| *E. coli* entéro-invasif | ECEI (EIEC) | Syndrome dysentérique | 28, 29, 124, 136, 143, 144, 152, 164, 167 | Invasines Ipa, *inter cell spread*, entérotoxine ShET2 | Plasmide pINV (locus *ial* : gènes *ipa*, *icsA*) | Kératite du cobaye (test de Sereny), PCR de détection du plasmide pINV |
| *E. coli* entéro-agrégatif | ECEAg (EAggEC) | Diarrhées infantiles persistantes (tiers-monde) | 3, 4, 7, 9, 15, 21, 51, 55, 59, 77, 86, 91, 92, 106, 111, 126, 127 | *Fimbriae* AAF (adhésion), entérotoxines EAST, Pet | Plasmide pAA (gène *aaf*) | |
| *E. coli* à adhésion diffuse | ECAD (DAEC) | Rôle pathogène discuté | 4, 15, 28, 44, 50, 55, 69, 75, 86, 125, 126, 127, 128 | Adhésines Afa, AIDA | | |

SHU : syndrome hémolytique et urémique ; PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique.

## Mise en évidence des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) (fig. 17.4 et 17.5)

Les EHEC sont responsables de cas sporadiques ou d'épidémies de diarrhées souvent sanglantes pouvant évoluer vers des pathologies plus graves, le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT).

Le diagnostic des infections à EHEC est difficile, ces bactéries étant rapidement éliminées du tube digestif. De plus, la quantité présente dans les selles reste très faible, surtout au moment de l'apparition du SHU. Le recueil des selles doit s'effectuer au maximum 4 à 6 jours après le début des prodromes digestifs.

Le diagnostic (fig. 17.6) repose d'une part sur la mise en évidence des EHEC dans les selles par des méthodes phénotypiques et biochimiques, et d'autre part sur la détection des gènes de virulence (*stx* et *eae*) par des méthodes moléculaires. Il est indispensable de réaliser un enrichissement des selles en eau peptonée pendant 4 à 6 heures à 37 °C.

Il existe également un diagnostic sérologique reposant sur l'augmentation du titre sérique des anticorps spécifiques antilipopolysaccharides (LPS).

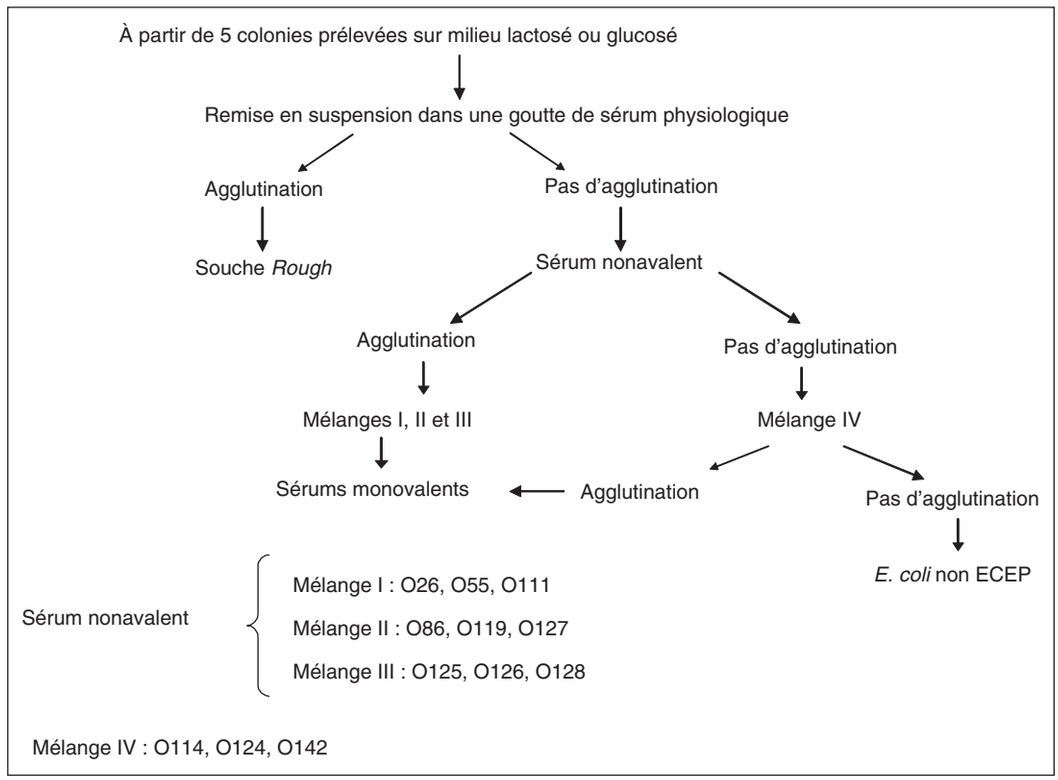



**Fig. 17.3.** – *Détermination du sérotype d'*Escherichia coli *entéropathogène (ECEP).*

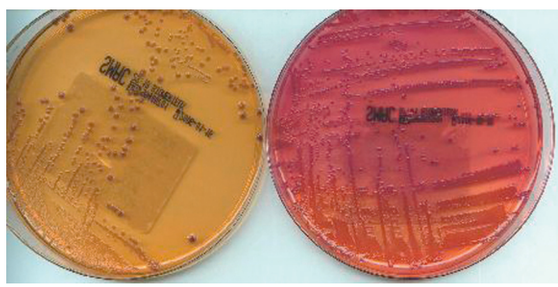


**Fig. 17.4.** – *Aspect des colonies d'*Escherichia coli *O157 : H7 Colonies sorbitol – sur milieu SMAC – céfixime-tellurite; à gauche, d'*Escherichia coli *sorbitol positif à droite.*

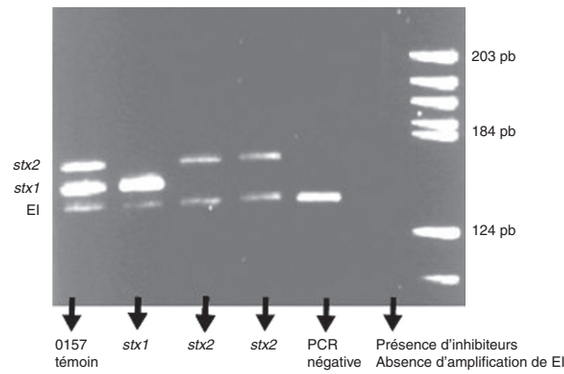



**Fig. 17.5.** – *Mise en évidence de la présence ou de l'absence des gènes pour les EHEC et de l'amplification de l'étalon interne (EI).*
L'absence d'amplification d'EI signe la présence d'inhibiteurs de la TAQ polymérase et implique de recommencer la PCR sur des échantillons dilués. Sur la piste de droite, marqueurs de poids moléculaire.

### *Méthodes biochimiques de détection et d'isolement des EHEC*

Les EHEC n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sur un milieu particulier, sauf le sérotype O157 : H7. En effet, contrairement aux autres *E. coli*, *E. coli* O157 : H7 ne fermente pas le sorbitol et ne possède pas de β-glucuronidase. Ainsi, l'absence de fermentation de sorbitol a justifié l'utilisation de la gélose MacConkey au sorbitol (SMAC). Le milieu SMAC a été rendu plus sélectif par l'adjonction de tellurite et de céfixime dont les CMI sont plus élevées pour les *E. coli* O157 : H7 que pour les autres *E. coli*. La présence de

colonies suspectes (sorbitol négatives) d'*E. coli* O157 : H7 (fig. 17.4) sur SMAC doit être confirmée par :

- un test d'agglutination latex réalisé directement sur la colonie suspecte pour vérifier la présence de l'antigène somatique O157 ;
- l'identification biochimique de l'espèce.

Les EHEC non-O157 n'ont pas les caractéristiques biochimiques communes rendant possible l'utilisation d'un milieu d'isolement particulier. Ces souches fermentant le sorbitol ne seront pas repérées sur SMAC ; ce milieu est donc inadapté. Une solution alternative pour l'isolement de ces souches est l'utilisation de la gélose « entérohémolysine ». La méthode est fondée sur le fait qu'une proportion importante des EHEC a la propriété de produire une entérohémolysine décelable sur gélose contenant des érythrocytes de moutons lavés, additionnés d'ions $Ca^{2+}$. Les colonies (EHEC) suspectes obtenues sur gélose au sang peuvent être confirmées par la recherche des gènes *stx* codant les Shiga toxines par PCR.

De nouvelles techniques, fondées sur le principe d'immunochromatographie, utilisent un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex recouverte d'anticorps spécifiques d'*E. coli* O157 : H7 (c'est-à-dire O157 et éventuellement H7). Ces méthodes, faciles à mettre en œuvre, donnent un résultat rapide (15 à 20 minutes). Cependant, elles ne détectent que les EHEC de sérogroupe O157.

La technique de référence pour la recherche de vérotoxines libres sur filtrat de selles est la cytotoxicité sur cellules Vero ou HeLa, spécifique si elle est neutralisée par un antisérum anti-Stx. Spécifique, ce test est difficile à mettre en œuvre et ne peut être utilisé qu'en laboratoire spécialisé.

Des techniques immunologiques de type ELISA ont été développées. De valeur inégale, elles sont moins sensibles que la cytotoxicité sur cellules Vero. Cependant, quelques tests ont été commercialisés et présentent une bonne sensibilité : Premier EHEC test, VTEC-Screen Seiken RPLA.

### *Méthodes génétiques de détection des STEC*

Compte tenu de la présence en très faible quantité des EHEC dans les selles, l'amplification génique in situ par PCR des gènes codant pour les shiga-toxines STX1 et STX2 dans les selles représente une méthode très sensible. Elle constitue la méthode la plus sensible pour détecter les STEC. Cependant, elle ne peut actuellement être réalisée que par des laboratoires spécialisés (Tableau 17.6).

De très nombreux systèmes PCR ont été décrits. Les gènes de virulence *stx* (*stx1, stx2* et variants) et *eae* peuvent être recherchés séparément.

La détection des gènes de pathogénicité est effectuée directement sur les selles après un enrichissement de 3 à 5 heures en eau peptonée. Dans le cas d'une réponse positive de la PCR, l'isolement de la bactérie responsable est indispensable pour la recherche des gènes de pathogénicité (*stx, eae, ehxA*) pour des études d'épidémiologie moléculaire (pulsotypie, rybotypie).

La méthode par hybridation sur colonies avec une sonde spécifique marquée est un bon recours pour retrouver la bactérie responsable mais nécessite davantage de temps et de personnel qualifié.

### *Envoi de la souche au CNR E. coli-Shigella*

Cet envoi pour les souches isolées de patients adultes se fait à l'Institut Pasteur (Paris). Pour les enfants, l'envoi des selles et/ou des souches est effectué au laboratoire associé au CNR *E. coli-Shigella* (Hôpital Robert-Debré, Paris) dans un tube de gélose conservation (Bio-Rad, Réf. 63683) (fig. 17.6).

### *Diagnostic sérologique des infections à EHEC*

Dans la majorité des cas, les malades développent des anticorps antilipopolysaccharides (LPS). Le diagnostic sérologique doit être réalisé sur un sérum précoce et un sérum tardif afin d'observer une augmentation du titre des anticorps attestant de l'infection. L'importance de la réponse immunitaire est directement liée à la sévérité de la maladie.

La détection des anticorps anti-LPS du sérogroupe O157 mais aussi contre d'autres EHEC (O26, O91, O103, O111, O128 et O145) est réalisée avec différentes techniques : ELISA, *immunoblotting*, hémagglutination. Les trois classes d'anticorps (immunoglobulines G [IgG], IgM et IgA) sont détectables précocement, à un titre souvent très élevé, et permettent d'attester de l'infection même plusieurs semaines après le début des prodromes digestifs.

La recherche de ces anticorps est indispensable pour le diagnostic lorsque la mise en évidence directe des gènes codant pour les Stx et/ou des EHEC dans les selles est impossible, en particulier pour des études épidémiologiques. La recherche des anticorps anti-LPS permet également d'identifier les sérogroupes autres que 0157 : H7. La plus grande prévalence des infections à *E. coli* O157 : H7 par rapport à celles dues aux autres sérotypes paraît être surestimée en raison de la facilité avec laquelle ce sérotype peut être mis en évidence.

## Mise en évidence des autres pathovars d'*Escherichia coli*

La détection des autres pathovars responsables de diarrhées reste du domaine des laboratoires spécialisés. Initialement fondée sur le pouvoir pathogène chez l'animal ou l'effet cytopathogène en culture cellulaire, l'identification de ces souches est actuellement réalisée par des techniques de biologie moléculaire (tableau 17.6).

### *Recherche de germes multirésistants aux antibiotiques*

Chez les malades hospitalisés dans des services à risque (réanimation, oncohématologie, etc.), la détection de la

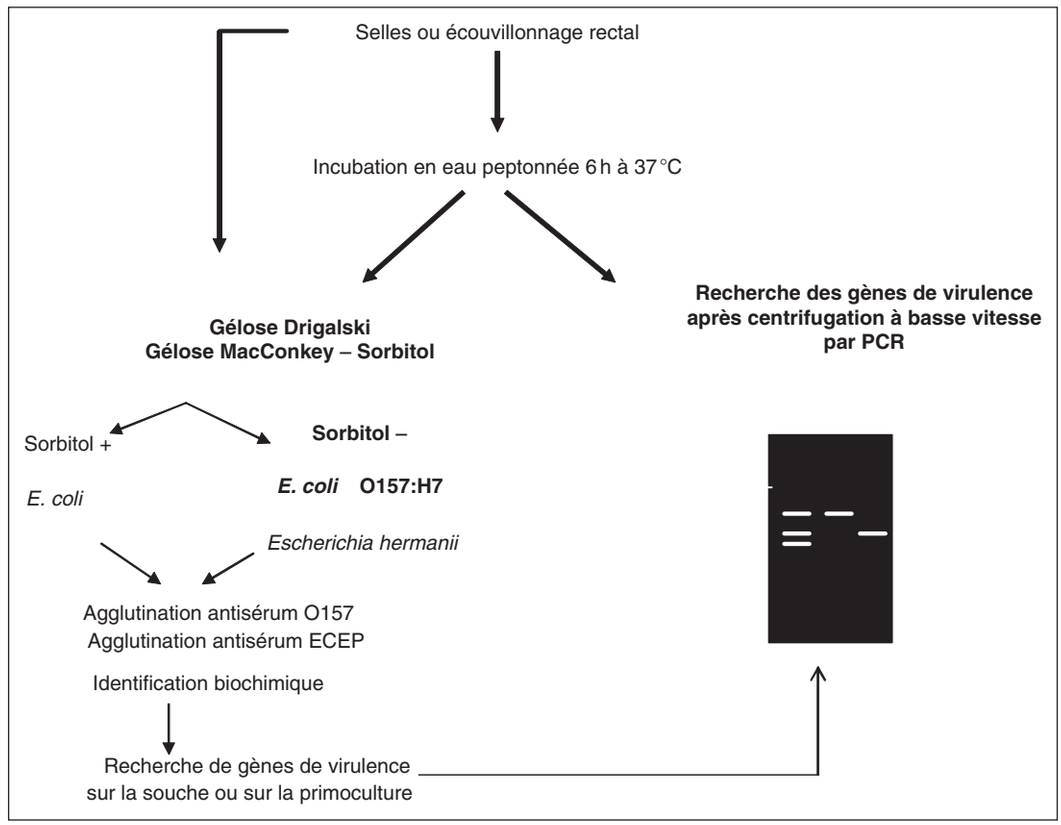



Fig. 17.6. – *Principe de mise en évidence des EHEC dans les selles.*

**TABLEAU 17-6**

**Séquences des amorces nucléotidiques permettant la détection spécifique des gènes de virulence des principaux pathovars d'*Escherichia coli*.**

| *Nom* | *Acronymes français (anglais)* | *Cibles* | *Séquences des amorces* | *Taille du produit* | *Référence* |
|---|---|---|---|---|---|
| *E. coli* entérotoxinogène | ECET (ETEC) | ST (*est*) | TCT GTA TTG TCT TTT TCA CC | 186 | Frankel, 1989 |
| | | | TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC | | |
| | | LT (*elt*) | GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC | 750 | |
| | | | CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC | | |
| *E. coli* entéro-invasif | ECEI (EIEC) | Locus *ial* | TGG AAA AAC TCA GTG CCT CT | 422 | Lüscher, 1994 |
| | | | CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT | | |
| *E. coli* entéroagrégatif | ECEAg (EAggEC) | Plasmide pAA | CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT | 630 | Schmidt, 1995 |
| | | | CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T | | |

| *Nom* | *Acronymes français (anglais)* | *Cibles* | *Séquences des amorces* | *Taille du produit* | *Référence* |
|---|---|---|---|---|---|
| *E. coli* entéropathogène | ECEP (EPEC) | *eae* | TTA ACG GCT ATT TCC GCA TGA G | 249 | CNR |
| (et *E. coli* entérohémorragique) | | | TCG TCA CCA GAG GAA TCG GAG T | | |
| *E. coli* entérohémorragique | ECEH (EHEC, STEC) | *stx1* | GGA AGA GTC CGT GGG ATT AC<br>GAA AGC GAT GCA GCT ATT AAT AAT G | 135 | CNR |
| | | *stx2* | CAA CGG TTT CCA TGA CAA CG<br>GTG ACA GTG ACA AAA CGCA G | 184 | |

colonisation par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques est effectuée dans les selles des patients à l'aide de milieux chromogènes contenant des antibiotiques pour les entérocoques résistants à la vancomycine et les entérobactéries productrices de β-lactamase à spectre étendu (BLSE) (chapitre 11).

## *Analyse semi-quantitative des selles*

En milieu spécialisé (réanimation, grands prématurés et patients immunodéprimés), peut être réalisée une analyse semi-quantitative de la flore fécale afin de prévenir le risque éventuel de septicémie par translocation endogène.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Barbut F, Braun M, Burghoffer B, Lalande V, Eckert C. Rapid detection of toxigenic strains of *Clostridium difficil*e in diarrheal stools by real-time PCR. J Clin Microbiol 2009; 47 (4) : 1276–7.

Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). AFSSA; 6, avril 2003. www.afssa.fr.

Frankei G, Giron JA, Valmassoi J, Schoolnik GK. Multigene amplification : simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. Mol Microbiol 1989; 3 : 1729–34.

Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, et al. Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis 2001; 32 (3) : 331–51.

Lüscher D, Altwegg M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. Mol Cell Probes 1994; 4 : 285–90.

Référentiel en microbiologie médicale. SFM, éd; 2010.

Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heeseman J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1995; 33 : 701–5.

CHAPITRE

18

# Examen cytobactériologique des urines (ECBU)

S. Bonacorsi

## Données physiopathologiques

L'infection du tractus urinaire (ITU) se caractérise par la multiplication de micro-organismes au sein de l'arbre urinaire (bactériurie) s'accompagnant d'une réaction inflammatoire avec afflux de leucocytes dans l'urine ou leucocyturie. L'ITU se fait quasi exclusivement par voie ascendante et les bactéries responsables d'ITU sont presque toujours d'origine digestive. L'appareil urinaire est normalement stérile, bien que s'ouvrant vers l'extérieur, et la présence de bactéries dans l'urine suffirait donc à définir l'ITU. Mais l'urine est contaminée physiologiquement lors de son émission par les germes du méat et du tiers inférieur de l'urètre ou du périnée. Aussi, l'ECBU se caractérise par une analyse quantitative de la culture de l'urine associée à une analyse quantitative de la leucocyturie.

En outre, l'urine constitue un bon milieu de culture. Aussi, la réalisation et le transport du prélèvement doivent répondre à des règles strictes qui conditionnent l'interprétation de cet examen.

L'ITU est plus particulièrement fréquente chez la femme et la jeune fille en raison d'un urètre court, s'ouvrant à la vulve au voisinage du vagin et de l'anus. Chez le jeune nourrisson avant 3 mois, le sexe ratio est inversé. Cette plus forte proportion de garçons serait expliquée par une forte colonisation bactérienne du prépuce à cet âge. Cette colonisation rend compte de la difficulté du prélèvement chez le jeune nourrisson mâle. Le risque d'infection serait moindre chez les garçons circoncis.

Différents facteurs de risque de l'ITU ont été identifiés :

- les anomalies anatomiques : chez l'adulte, il pourra s'agir de tout obstacle présent sur les voies excrétrices (lithiase, hypertrophie prostatique, etc.), et chez l'enfant, de malformations favorisant la stase urinaire avec en particulier le reflux vésico-urétéral ;
- les anomalies fonctionnelles rencontrées notamment chez le patient diabétique, au cours de la grossesse ou chez la personne âgée ;
- enfin, les facteurs iatrogènes, liés à toute intervention sur les voies urinaires, avec en particulier le sondage urinaire, pour lequel le risque cumulé d'infection urinaire est de 100 % après 30 jours de sondage [3].

L'ITU peut être limitée à la vessie (cystite) ou se compliquer d'une atteinte rénale (pyélonéphrite) caractérisée par la survenue de fièvre et de douleurs lombaires. L'atteinte du parenchyme rénal fait toute la gravité potentielle de l'infection urinaire. À court terme, elle peut se compliquer de bactériémie avec localisation secondaire ou de choc infectieux. À long terme et en cas de répétition, la pyélonéphrite peut être responsable d'insuffisance rénale et/ou d'hypertension artérielle.

## Prélèvement et acheminement

Le mode de prélèvement idéal des urines est la ponction vésicale sus-pubienne (PSP) qui permet d'éviter toute contamination par la flore de l'urètre. Toutefois, cette technique est trop invasive pour être utilisée en première intention. L'alternative à la PSP est représentée par le sondage « aller-retour ». Bien que moins invasive, cette technique n'est pas dénuée de complications. En pratique, le recueil d'urine se fait le plus souvent chez l'adulte coopératif par voie naturelle selon la technique dite du « milieu de jet » et selon des règles strictes qui conditionnent la qualité de l'ECBU [9].

### Sujet adulte coopératif et enfant avec miction volontaire

La réalisation du prélèvement sera confiée au patient adulte ou aux parents de l'enfant ; il conviendra donc de leur fournir des renseignements précis. Les urines sont recueillies de préférence le matin après lavage soigneux des organes génitaux externes avec une solution antiseptique ou un savon doux, et rinçage soigneux à l'eau. Chez une femme qui présente des pertes, même minimes, la mise en place d'une protection vaginale est indispensable. La première partie de la miction sera rejetée, permettant d'éliminer tout ou partie de la flore commensale de l'urètre inférieur, et seul le milieu du jet sera recueilli dans un flacon stérile.

### Sujet adulte non coopératif ou incontinent

Le recueil chez la femme sera réalisé par sondage urinaire à l'aide d'une sonde de petit calibre. Cette manœuvre est à éviter chez l'homme car pourvoyeuse de prostatites et on lui préférera le recueil par collecteur pénien, voire par cathétérisme sus-pubien en cas de rétention d'urine [3].

### Chez le petit enfant sans miction volontaire

Après un nettoyage soigneux de la région périnéale, un sac plastique collecteur sera fixé au moyen d'un adhésif.

Ce sac ne doit pas être laissé plus de 30 minutes. Au-delà de ce temps, on place un nouveau sac après avoir recommencé le nettoyage. Pour les Anglo-Saxons, ce mode de prélèvement est entaché d'un taux inacceptable de faux positifs (> 50 %). Aussi, toute analyse d'urine issue de ce mode de prélèvement, suggérant la présence d'une infection urinaire, devrait être confirmée par la réalisation d'un sondage chez la fille ou d'une ponction sus-pubienne chez un garçon [1].

### Chez les porteurs de sonde à demeure

Le tuyau d'évacuation sera clampé pendant 10 minutes afin de laisser l'urine s'accumuler en amont, puis l'urine sera ponctionnée via l'opercule spécifique de la sonde après désinfection à l'alcool iodé. Il ne faut pas déconnecter le système de drainage qui doit rester fermé. Ce type de prélèvement, pratique, ne reflète cependant pas toujours la ou les espèces bactériennes présentes dans la vessie mais plutôt les espèces colonisant la sonde urinaire. C'est pourquoi, dans toute la mesure du possible, on privilégiera le prélèvement juste après un changement de sonde [3].

### Acheminement

Afin d'éviter toute prolifération bactérienne, le transport au laboratoire se fera en moins de 2 heures. Au-delà de ce délai, le flacon d'urine sera placé dans un récipient contenant de la glace (les urines pourront être gardées 24 heures à 4 °C, en sachant toutefois que la réfrigération ne préserve pas les leucocytes). Un autre moyen permettant d'empêcher toute prolifération bactérienne est de mettre l'urine en présence d'un agent bactériostatique sous forme de poudre comme l'acide borique. Ce système permet une conservation des urines à température ambiante pendant 24 heures sans modification notable du taux de bactéries et sans altération des leucocytes. Ce système, simple mais plus onéreux, nécessite d'obtenir un volume minimal d'urine (5 ou 10 ml) afin que l'agent bactériostatique ne soit pas trop concentré (risque d'effet bactéricide). Enfin, l'acide borique est susceptible de diminuer la sensibilité de la recherche de leucocyte estérase par bandelette urinaire (voir ci-après).

En l'absence de système de prévention de prolifération bactérienne, on pourra utiliser la technique de la lame immergée ensemencée, au lit du malade par l'infirmière. Lame et flacon seront tous deux adressés au laboratoire.

### Renseignements accompagnant le prélèvement

Ces renseignements sont indispensables car ils permettront au microbiologiste d'optimiser l'ECBU et son interprétation. Ils concernent l'âge et le sexe du patient, le mode et l'heure du prélèvement, les motifs de la demande, les antécédents d'ITU, la notion de maladie concomitante, le traitement éventuellement déjà institué.

## Techniques d'analyse au laboratoire

Les urines doivent être analysées sans retard. Elles sont normalement jaune clair et doivent être limpides. L'émission d'urines troubles suggère une infection urinaire, mais n'est cependant pas spécifique ; elle peut être liée à la présence de cristaux, de médicaments, etc.

### Examen microscopique

#### *Détermination de la leucocyturie*

En théorie, la technique de choix pour détecter une leucocyturie anormale est la mesure du taux d'excrétion des leucocytes ou compte d'Addis. Le sujet, au repos, vide sa vessie puis absorbe un grand verre d'eau. On recueille les urines des 3 heures suivantes. Le compte d'Addis représente le nombre d'éléments par millilitre multiplié par le volume de la diurèse en millilitre, pendant 3 heures divisé par 180 minutes. Normalement, il y a moins de 5 000 leucocytes/minutes, et moins de 5 000 hématies/minutes. Toutefois, en raison de la lourdeur de sa réalisation, le compte d'Addis (ou hématies leucocytes-minute) reste réservé à la surveillance des néphropathies interstitielles.

En pratique, la numération des leucocytes s'effectue sur un échantillon d'urine en utilisant un hématimètre ou « cellule » calibrée. D'abord, on procède à une homogénéisation des urines sur un agitateur type Vortex®. La numération des éléments figurés se fait dans un hématimètre en verre de Nageotte, Lemaur, ou Malassez, permettant la numération dans des volumes respectivement de 50, 40, et 1 $mm^3$. Le système Kova® slide est une lame en plastique qui a l'avantage d'être jetable et de contenir 10 cellules de 1 $mm^3$ par lame. Le résultat est exprimé en hématies et leucocytes par $mm^3$, ou par ml. Une urine normale contient moins de 10 leucocytes par $mm^3$. Les cellules ne sont pas toutes d'origine vésicale. L'identification des cellules est possible ; elle sera précisée par l'étude du culot urinaire. On doit distinguer les lymphocytes et polynucléaires (souvent altérés et en amas). On rencontre aussi des cellules rondes rénales, des cellules en raquette de la couche moyenne de l'épithélium vésical, de grandes cellules à petits noyaux d'origine vaginale.

#### *Détermination du taux d'hématies*

La numération des hématies sera systématiquement réalisée. La présence d'un taux anormal d'hématies dans un contexte infectieux peut se rencontrer au cours d'ITU à bactéries lithogènes *Proteus mirabilis, Klebsiella* spp., ou *Corynebacterium urealyticum.*

#### *Autres analyses*

L'examen microscopique de l'état frais permet de mettre en évidence la présence :

- de cylindres : les cylindres ont pour origine la lumière tubulaire rénale. Ils peuvent être hyalins et sont alors principalement composés de la protéine de Tamm-Horsfall qui est une défensine de l'arbre urinaire. Ces cylindres sont physiologiques. Les cylindres pathologiques contiennent des hématies et/ou des leucocytes (cylindres hématiques et/ou leucocytaires). Leur présence permet d'identifier le rein comme la source de l'hématurie et/ou de la leucocyturie ;
- de cristaux médicamenteux, d'oxalate de calcium, d'acide urique, phospho-ammoniaco-magnésien. Ces derniers signent la présence d'une lithiase secondaire à une infection liée à une bactérie productrice d'uréase (notamment *Proteus mirabilis, Corynebacterium urealyticum*) et qui provoque une alcalinisation des urines ;
- de levures, *Trichomonas*, spermatozoïdes, œufs de parasites (*Schistosoma haematobium*) ou bactéries.

### *Examen direct après coloration*

L'examen direct, après coloration de Gram, d'une urine non centrifugée ne présente une sensibilité proche de 100 % que pour des concentrations bactériennes $>10^5$ UFC/ml [9]. Malgré une sensibilité médiocre, cet examen reste indispensable en apportant des informations immédiates au clinicien sur le type de bactéries impliquées ou la présence de levures permettant d'adapter le traitement. En cas de présence d'une flore polymorphe, l'examen direct permettra d'évoquer une contamination du prélèvement et de faire aussitôt pratiquer une autre analyse. De plus, dans certains cas, notamment lors de culture stérile avec examen direct positif, il permettra d'adapter les milieux de culture, l'atmosphère et le temps d'incubation.

## Bandelettes réactives chimiques

Ces bandelettes permettent de détecter simultanément et rapidement la présence de leucocytes et de bactéries sur des urines fraîchement émises.

Les leucocytes sont mis en évidence grâce à la détection d'une leucocyte estérase provenant à la fois des leucocytes intacts et des leucocytes lysés. Le seuil de détection est d'environ 10 leucocytes par $mm^3$. Des faux positifs sont possibles en cas de contamination par la flore vaginale ou de présence de *Trichomonas*. La sensibilité du test est diminuée en cas de forte glycosurie ou protéinurie, ou en présence d'acide borique, d'acide ascorbique ou d'acide oxalique. Enfin, les céphalosporines de 1re génération et les tétracyclines peuvent provoquer des faux négatifs [9].

Les bactéries produisant une nitrate réductase sont détectées par la recherche de nitrites. La principale limite de ce test est qu'il ne peut détecter que les entérobactéries (toutes productrices de nitrate réductase) et non les bactéries à Gram positif telles que les entérocoques et les staphylocoques. Le seuil de détection est de $10^5$ UFC/ml. Toutefois, ce seuil n'est atteint que si les urines ont séjourné suffisamment longtemps dans la vessie (>4 heures) pour permettre aux bactéries de convertir suffisamment de nitrates en nitrites pour être détectées. En pratique, il est recommandé de tester les urines du matin.

L'association des deux tests pour la détection des infections urinaires permet de palier les défauts de sensibilité de chacun. Ainsi, l'absence simultanée de nitrites et de leucocyte estérase présente une très bonne valeur prédictive négative chez l'adulte ou le grand enfant sans facteur de risque associé. Une « bandelette négative » chez un patient sans facteur de risque associé permet d'éliminer raisonnablement le diagnostic d'infection urinaire et de ne pas réaliser un ECBU.

Notons enfin que la performance du test de la bandelette dépend du respect strict des temps de lecture. Dans le but de standardiser cette lecture, elle peut être réalisée par des petits automates. Ces derniers présentent l'avantage, en plus, d'éditer un résultat sur papier qui permet d'avoir une trace écrite du résultat dans le dossier du patient.

## Uroculture – à la fois quantitative et qualitative

### *Choix des milieux*

La très grande majorité des bactéries responsables d'infections urinaires ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur géloses ordinaires (tableau 18.1).

#### Milieux non chromogènes

Initialement, les milieux les plus usuels étaient adaptés à la croissance des entérobactéries avec le plus souvent un indicateur de l'attaque du lactose permettant une différenciation des colonies. Les milieux les plus utilisés étaient soit non sélectifs – le milieu de CLED, et milieu lactosé au bromocrésol pourpre –, soit sélectifs – le milieu de MacConkey. L'utilisation d'un milieu sélectif pour les bactéries à Gram négatif rendait impératif l'ensemencement d'une gélose adaptée aux bactéries à Gram positif telle qu'une gélose au sang avec ou sans inhibiteurs type acide nalidixique plus colimycine.

#### Milieux chromogènes

Le principe du milieu chromogène est d'utiliser des substrats synthétiques qui sont des analogues structuraux d'une molécule naturellement clivée par une enzyme caractéristique d'une espèce bactérienne ou d'un groupe d'espèces bactériennes. Le substrat clivé acquiert des propriétés chromogéniques et précipite en colorant la colonie sans diffuser dans la gélose. La plupart des milieux chromogènes utilisent un jeu de différents substrats permettant une très bonne différenciation des colonies et une identification présomptive de la, ou des espèces bactériennes présentes dans l'urine. Le tableau 18.2 indique les enzymes détectées et l'aspect des colonies suivant les différents milieux commercialisés. Aujourd'hui, les milieux chromogènes, bien que plus onéreux, ont largement supplanté les milieux non chromogènes en raison de plusieurs avantages. Ces milieux permettent une discrimination plus fine

**TABLEAU 18-1**

**Espèces responsables d'infections urinaires (proportion en %).**

| *Espèces bactériennes* | *Infections communautaires Réseau AFORCOPI-BIO Rapport Onerba 2002 (n = 417)* | *Infections nosocomiales Groupe d'étude ESCMID Europe c000 (n = 421)* | *Infections SAU d'un hôpital pédiatrique 2005 (n = 221)* |
|---|---|---|---|
| **Gram négatif** | | | |
| *Escherichia coli* | 68 | 38 | 79 |
| *Proteus mirabilis* | 8 | 7 | 9 |
| *Klebsiella* spp. | 5 | 9 | 3 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 1 | 6 | 0,5 |
| Autres entérobactéries | 3 | 7 | 1 |
| *Acinetobacter* spp. | | 2 | |
| **Gram positif** | | | |
| *Enterococcus* spp. | 5 | 17 | 3 |
| *Staphylococcus saprophyticus* | 3 | | 0,5 |
| *Staphylococcus aureus* | 3 | 2 | 2 |
| *Streptococcus agalactiae* | 3 | | 1 |
| Autres | 1 | 2 | 1 |
| Levures | | 10 | |

**TABLEAU 18-2**

**Milieux chromogènes et ECBU : enzymes recherchées et aspect des colonies.**

| | *Espèces ou groupe d'espèces bactériennes* | | | |
|---|---|---|---|---|
| Enzyme détectée<br>Réaction chromogénique et milieu commercialisé | *E. coli** | Groupe *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* | Groupe : *Proteus**, *Morganii, Providencia* | *Enterococcus* |
| β-D-glucuronidase [1]<br>→ colonie rose | + | – | – | – |
| β-D-galactosidase [2]<br>→ colonie rose | + | + | – | – |
| β-D-glucosidases [3]<br>→ colonie bleue | – | + | – | + |
| Tryptophane désaminase [4]<br>→ pigmentation beige de la gélose | – | – | + | – |
| Uriselect 4®<br>Enzymes 2 + 3 + 4 | rose | violet | beige | bleu |
| CHROMagar Orientation®<br>Enzymes 2 + 3 + 4 | rose | violet | beige | bleu |
| CPS ID 3®<br>Enzymes 1 + 3 + 4 | rose | bleu | beige | bleu |
| Chromogenic UTI medium®<br>Enzymes 2 + 3 + 4 | rose | violet | beige | bleu |

* La confirmation de l'espèce *Escherichia coli* et l'identification de l'espèce *Proteus mirabilis* seront réalisées par la recherche d'indole (test complémentaire), positive dans le premier cas et négative dans le deuxième cas.

des colonies et donc une meilleure sensibilité de détection des urines polymicrobiennes (fig. 18.1). Ils permettent une identification directe d'*E. coli*, *Enterrococcus* spp. et de *Proteus mirabilis*, à l'aide de tests complémentaires simples (indole, état frais) permettant un rendu d'identification plus rapide au clinicien et une éventuelle adaptation de l'antibiothérapie probabiliste. Ils permettent une économie substantielle en réactifs et en temps-technicien. Il est à noter toutefois que, dans de rares cas, ce système d'identification peut être pris en défaut. Ainsi, par exemple, de rares souches de *Citrobacter freundii* indologènes dépourvues de β-D-glucosidases peuvent être identifiées à tort comme *E. coli* (tableau 18.2). Par ailleurs, quelques souches d'*Enterobacter* spp. et de *Citrobacter* spp. ont été décrites avec un phénotype de β-D-glucuronidase. Le microbiologiste, notamment en milieu hospitalier, du fait de la plus grande diversité des entérobactéries rencontrées, devra donc rester vigilant et bien contrôler l'adéquation entre l'identification et l'antibiogramme. Un autre risque est représenté par la possibilité de confondre un entérocoque et un streptocoque du groupe B qui peut être responsable d'infection urinaire chez la femme enceinte ou le nouveau-né. Chez ces patients, l'utilisation en parallèle d'une gélose au sang apparaît souhaitable.

## Autres milieux

D'autres milieux seront utilisés en fonction du contexte clinique ou en fonction du Gram :

- en cas de suspicion de tuberculose, la recherche de *M. tuberculosis* sera réalisée sur les milieux adéquats (voir chapitre Mycobactéries) ;
- en cas de cystite hémorragique chez des patients immunodéprimés, on recherchera *Corynebacterium urealyticum* en ensemençant une gélose au sang et en prolongeant l'incubation au-delà de 24 heures ;
- en présence de bactéries à Gram positif à l'examen direct, une gélose au sang sera systématiquement ensemencée ;
- en présence de germes à l'examen direct et en l'absence de culture en 24 heures, une recherche d'anaérobies et de germes exigeants sera réalisée en ensemençant une gélose au sang incubée en anaérobiose durant 48 heures et une gélose « chocolat » sous $CO_2$ durant 48 heures ;
- en présence de levures, un milieu Sabouraud ou un milieu chromogène pour levures (permettant l'identification présomptive de *C. albicans* notamment) sera ensemencé et incubé à 30 °C.

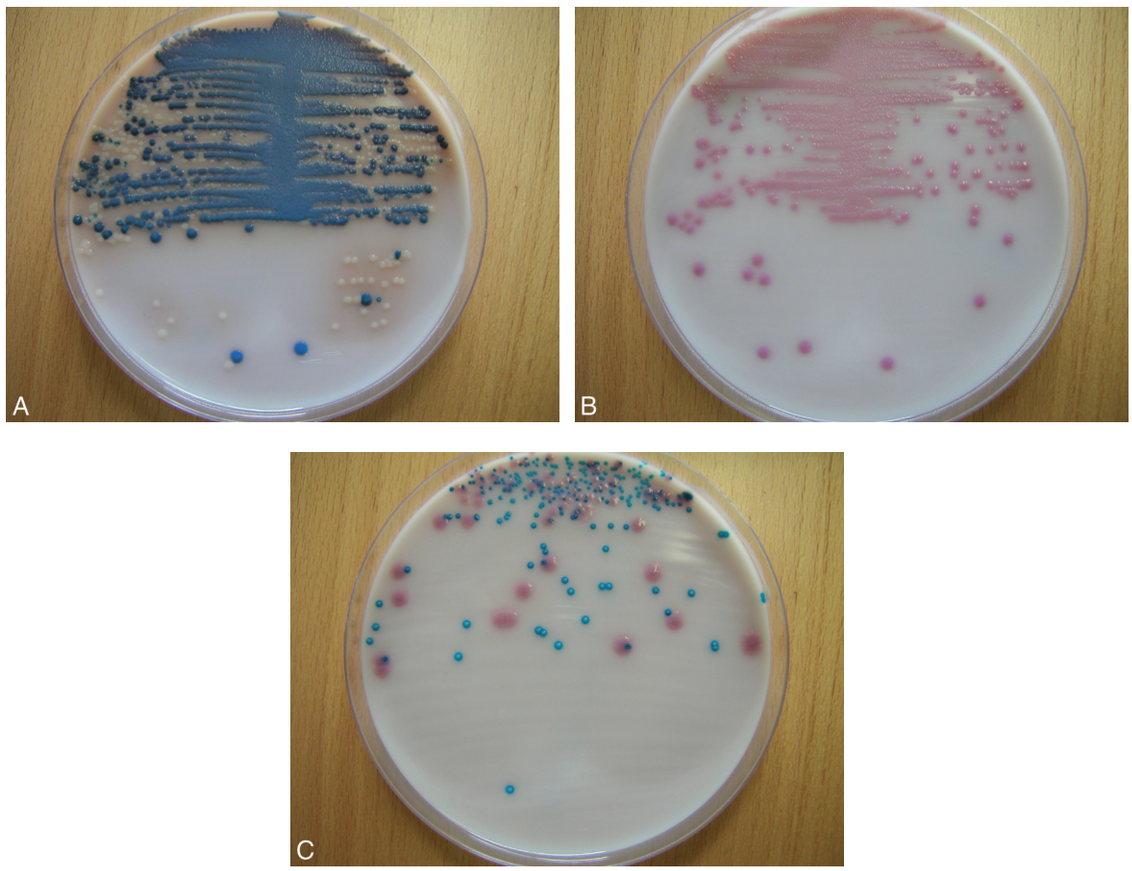



**Fig. 18.1.** – *Exemples d'uroculture quantitative sur milieu chromogène.*
A) $10^6$ UFC/ml de *Klebsiella pneumoniae* et de *Proteus mirabilis*. B) $10^5$ UFC/ml d'*Escherichia coli*. C) $10^4$ UFC/ml d'*Escherichia coli* et de streptocoque du groupe D.

### Modes d'ensemencement

L'ensemencement doit répondre au double but de dénombrer les bactéries et d'isoler la ou les bactéries en cause en obtenant des colonies bien distinctes les unes des autres.

- **Méthode originale de Kass :** on fait des dilutions en série de 10 en 10. Un volume connu de chaque dilution est étalé sur une boîte de Pétri.
- **Méthode simplifiée de Véron :** l'urine est diluée au 1/100e en eau distillée stérile. On étale 0,1 ml de cette dilution. Une colonie correspond à 1 000 bactéries par millilitre.
- **Méthode de l'anse calibrée :** cette méthode est actuellement la plus utilisée. L'urine est prélevée à l'aide d'une anse de 10 µl et ensemencée selon une méthode standardisée qui permet, grâce à un abaque, de convertir l'aspect de la culture en UFC/ml, et ce sans dénombrement (fig. 18.1). Cette méthode simple, sans dilution préalable, permet une numération de $10^3$ à $10^6$ UFC/ml tout en permettant l'obtention de colonies isolées.
- **Méthode de la lame immergée :** on plonge dans l'urine fraîchement émise une lame portant des milieux nutritifs, généralement MacConkey et CLED. Cette méthode permet l'ensemencement des urines au lit du malade. Toutefois, elle présente le désavantage de ne pas obtenir des colonies isolées pour des concentrations de $10^6$ bactéries par ml et donc nécessite souvent le réensemencement en isolement de l'urine en cas d'infection.

### Appareils et méthodes automatiques

Différents automates ont été mis au point pour détecter les bactériuries significatives. Ces automates permettent de cribler rapidement (< 1/2 heure) les urines et de déterminer les échantillons qui seront alors ensemencés. Différentes technologies ont été développées. La microscopie à flux couplée soit à un système d'analyse d'image (IRIS iQ200®), soit un système de marquage fluorescent (Sysmex UF-100®, bioMérieux UF-500i, UF-1000i) permet non seulement le compte des bactéries, mais aussi celui des leucocytes, des hématies et la détection de cristaux, de levures. La technologie de l'automate Cellenium-160US® repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente marquant l'ensemble des bactéries qui sont détectées et dénombrées par un microscope à fluorescence. Le Coral UTI Screen system® repose sur la quantification de l'ATP bactérien par fixation sur la luciférine et émission de lumière après action de la luciférase. Tous ces automates ont l'inconvénient d'être chers et ne peuvent être utilisés que par les laboratoires traitant plusieurs centaines d'échantillons d'urines par jour. Les échantillons détectés positifs doivent être secondairement ensemencés.

### Incubation des urocultures

La majorité des bactéries des infections urinaires poussent en 18 à 24 heures et, en dehors de contextes particuliers, il n'y a pas lieu de prolonger l'incubation. Dans certains cas, bactéries exigeantes, déficientes, ou culture négative, malgré la présence de bactéries à l'examen direct, il faut savoir modifier le milieu de culture (gélose au sang ou « chocolat »), et l'atmosphère (anaérobiose et $CO_2$), et prolonger l'incubation.

## Interprétation des urocultures

### Interprétation de la bactériurie quantitative sur échantillons obtenus par la technique du « milieu de jet »

Les critères de Kass [5] qui servent historiquement de référence pour l'interprétation de la bactériurie sont les suivants :

- bactériurie $< 10^4$/ml : bactériurie non significative (contaminants) ;
- bactériurie $> 10^5$/ml : bactériurie significative.

Il reste une zone d'incertitude entre $10^4$–$< 10^5$ UFC/ml. Ces critères ont été établis dans le cadre d'études réalisées chez des patientes présentant une pyélonéphrite ou une bactériurie asymptomatique. Toutefois, Stamm et al. ont montré, en réalisant une étude chez des femmes présentant une cystite, qu'une observance stricte des critères de Kass pouvait entraîner le rejet à tort de diagnostic d'ITU pour près de 50 % des cas [8]. Dans cette étude, le taux de bactériurie seuil permettant d'inclure 95 % des cystites était de $10^3$ UFC/ml. En outre, de nombreux facteurs affectent le comptage des bactéries (infection débutante, mictions nombreuses et répétées, pH acide urinaire, urée augmentée, localisation prostatique, etc.). En conséquence, il est admis que, sous respect strict des conditions de prélèvement, de transport et d'analyse des urines, toute bactériurie $> 10^3$ UFC/ml est à prendre en considération [3]. Le bactériologiste devra tenir compte, pour l'interprétation et la poursuite de l'analyse, de l'aspect monomicrobien ou polymicrobien de la culture, de la leucocyturie, du contexte clinique et des ECBU faits antérieurement ainsi que du type de micro-organisme retrouvé. Un groupe de microbiologistes européens a proposé un classement en catégories des germes retrouvés en culture dans les ECBU en fonction de leur niveau d'implication dans l'étiologie des infections urinaires [4] :

- un premier groupe pouvant être considéré comme pathogène lorsque les germes sont isolés, même en petites quantités, ($10^3$ UFC/ml) : *Escherichia coli* et *Staphylococcus saprophyticus* ;
- un deuxième groupe, plus habituellement impliqué dans le cadre des infections urinaires nosocomiales, lorsqu'il existe des facteurs anatomiques ou iatrogènes favorisants et pour lequel un taux de $10^4$ UFC/ml peut être proposé : tribu *Proteae*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. et *Staphylococcus aureus* ;
- un troisième groupe, dont l'implication comme pathogène exige un niveau de bactériurie $> 10^5$ UFC/ml. Ce groupe

**TABLEAU 18-3**

**Taux de bactériurie pouvant justifier l'identification et l'antibiogramme du germe isolé en fonction du patient, des germes et du nombre d'espèces (d'après [4]).**

| *Mode de prélèvement* | *Patient* | *Type de germes** | *Nombre d'espèces isolées* | *Taux de bactériurie significative (UFC/ml)* |
|---|---|---|---|---|
| « Milieu de jet » | Symptomatique | Groupe 1 | 1 ou 2 | $10^3$ |
| | | Groupe 2 | 1 | $10^4$ |
| | | Groupe 3 | 1 | $10^5$ |
| | Asymptomatique | Groupes 1–3 | 1 | $10^5$ |
| Sondage simple | Symptomatique Asymptomatique | Groupes 1–3 | 1 ou 2 | $10^3$ |
| Ponction sus-pubienne | Symptomatique Asymptomatique | Groupes 1–4 | 1 ou 2 | $10^1$ |
| Sur sonde à demeure | Symptomatique | Groupes 1–3 | 1 ou 2 | $10^4$ |

* Les groupes 1 à 4 sont définis dans le texte.

comprend des espèces à Gram positif (*Streptococcus agalactiae*, les staphylocoques à coagulase négative autres que *Staphylococcus saprophyticus*), à Gram négatif (*Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, autres *Pseudomonaceae*) ou les *Candida* spp.;

- un quatrième groupe comprenant les espèces considérées comme contaminantes qui appartiennent habituellement à la flore uréthrale ou génitale de proximité : lactobacilles, streptocoques α-hémolytiques, *Gardnerella vaginalis, Bifidobacterium* spp., bacilles diphtérimorphes (sauf *Corynebacterium urealyticum*). Seul leur isolement à partir d'une ponction sus-pubienne peut permettre d'évoquer leur rôle pathogène.

L'ensemble de ces critères d'interprétation est réuni dans le tableau 18.3.

**ENCADRÉ**

Notons que si une culture polymicrobienne est en faveur d'une contamination de l'urine, les infections urinaires à deux germes, bien que rares, existent. Donc, toute culture polymicrobienne ne doit pas conduire systématiquement à l'absence de poursuite du prélèvement.

## Interprétation de la bactériurie quantitative sur échantillons obtenus par une technique différente de celle du « milieu de jet »

Les taux de bactériurie significatifs varient selon le mode de prélèvement et sont indiqués dans le tableau 18.3. Il est à noter que, pour la ponction sus-pubienne, le taux est de 10 UFC/ml et nécessite donc l'ensemencement d'un volume minimal de 100 µl.

## Cas particulier de la bactériurie asymptomatique

La bactériurie asymptomatique se définit comme la présence de bactéries dans l'urine à un taux significatif (tableau 18.3) en dehors de tout signe d'infection urinaire. La bactériurie asymptomatique peut survenir avec ou sans leucocyturie. La fréquence de la bactériurie chez la femme jeune est inférieure à 1 %, mais des fréquences de plus de 10 % peuvent être observées chez les patients de plus de 80 ans, les diabétiques, les patients ayant une vessie neurologique, les hémodialysés, et les patients sondés de façon intermittente ou à demeure. Toutefois, la recherche de bactériurie asymptomatique systématique n'est reconnue comme apportant un bénéfice réel que dans deux contextes cliniques particuliers. Au cours de la grossesse, la bactériurie asymptomatique représente un risque accru de survenue de pyélonéphrite et d'accouchement prématuré et doit être systématiquement recherchée par la réalisation d'une uroculture au cours du premier trimestre. En prévision d'une intervention sur les voies urinaires et notamment d'une résection transuréthrale de la prostate ou de l'ablation d'une sonde JJ, une bactériurie asymptomatique sera systématiquement recherchée et traitée afin de prévenir un risque accru de sepsis [3, 7].

## Interprétations des discordances entre leucocyturie et bactériurie

Dans un certain nombre de cas, le microbiologiste et le clinicien peuvent être confrontés à une discordance entre la leucocyturie et la bactériurie. Les principales situations cliniques pour lesquelles une telle discordance peut survenir sont citées dans le tableau 18.4.

**TABLEAU 18-4**

**Contextes cliniques au cours desquels sont observées des discordances entre leucocyturie et bactériurie.**

| *Leucocyturie sans bactériurie* | | *Bactériurie sans leucocyturie* |
|---|---|---|
| Causes néphrologiques | Néphrites tubulo-interstitielles (lupus, maladie de Kawazaki, etc.) | Patient neutropénique |
| Causes infectieuses | MST : uréthrites à gonocoque, *C. trachomatis*, anaérobies<br>Vaginite, leucorrhée<br>Tuberculose rénale<br>Infection urinaire décapitée | Jeune nourrisson<br><br>Début d'infection |
| Inflammation de l'arbre urinaire | Calculs<br>Radiothérapie<br>Sondage | |

### *Identification et antibiogramme*

Une identification sera réalisée pour les bactéries non identifiées par le milieu chromogène. L'antibiogramme est effectué en parallèle en testant les antibiotiques qui ont une bonne élimination urinaire, en particulier : β-lactamines, quinolones et fluoroquinolones, cotrimoxazole, aminosides, fosfomycine.

### Après obtention de l'identification

Les résultats définitifs devront être accompagnés de commentaires. Clairement rédigés, ils devront dans certains cas susciter le dialogue avec le clinicien. Certaines remarques sont fréquentes :

- concernant le mode de prélèvement, en cas de souillure, il faut rappeler les règles strictes du prélèvement ;
- l'ECBU est un des rares examens bactériologiques répétitifs ; en cas d'interprétations litigieuses, il convient de demander un nouvel ECBU ;
- des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, signent une ITU iatrogène ;
- parfois, l'antibiogramme n'est fourni qu'à titre indicatif ; il faut alors souligner que ce n'est pas une incitation à l'antibiothérapie.

### *Surveillance de l'ITU par le laboratoire*

Au cours du traitement, si l'infection est liée à une bactérie usuelle sans mécanisme de résistance particulier, il n'y a pas lieu de redemander un ECBU après 48 heures de traitement ni au-delà, sauf en cas d'évolution défavorable (reprise de la fièvre, douleurs, etc.). La stérilisation des urines est rapide (<48 heures). Le retour à la normale de la leucocyturie est plus lent et peut nécessiter 5 à 7 jours. En cas d'infection avec un germe inhabituel ou multirésistant, un ECBU de contrôle à 48 heures et un autre après l'arrêt du traitement pourront être prescrits.

## Contextes particuliers

### Tuberculose

Toute leucocyturie sans bactériurie doit faire évoquer une tuberculose rénale. En fonction du contexte, une recherche de mycobactérie sera réalisée sur urines préalablement décontaminées 3 jours de suite (voir le chapitre « Mycobactéries »).

### Patients immunodéprimés

La survenue d'une cystite hémorragique chez un patient immunodéprimé ou un patient âgé ou un patient ayant subi une intervention urologique doit faire évoquer une infection à *Corynebacterium urealyticum* responsable de cystites dites « incrustantes ». Cette suspicion pourra être confortée par la présence de cristaux type phosphate ammoniacomagnésiens ou d'un pH urinaire alcalin. Les urines devront être ensemencées sur gélose au sang et l'incubation sera prolongée au moins de 48 heures. Cette corynébactérie a de plus la particularité d'être multirésistante.

*Actinobaculum schaalii* est une espèce récemment décrite proche des *Actinomyces* qui a été incriminée dans les infections urinaires chez le patient âgé avec des facteurs urologiques prédisposants (hypertrophie prostatique, cancer, etc.). Ce bacille à Gram positif, oxydase négative, catalase négative, est de croissance lente (>3 jours) sur gélose enrichie et sous atmosphère anaérobie ou enrichie en $CO_2$. Son identification reste délicate et repose sur les méthodes moléculaires.

Les levures poussent habituellement bien sur les milieux chromogènes en 24 heures. Toutefois, un milieu type Sabouraud ou chromogène pour levure sera ensemencé en présence de levures à l'examen direct, et en cas de suspicion clinique d'infection urinaire avec urine stérile.

### Prostatite

Les prélèvements selon la méthode de Meares et Stamey se font en recueillant 3 échantillons d'urines [6] :

- 1re échantillon = 1 ml d'urines du premier jet ;
- 2e échantillon = urines du milieu du jet ; on pratique alors un massage prostatique ;
- 3e échantillon = urines du premier jet après massage.

En cas de prostatite, il y a 10 fois plus de bactéries dans le 3e échantillon que dans les deux autres. Pour d'autres, l'examen bactériologique des urines après massage prostatique est déconseillé, en raison de la douleur qu'il provoque et du risque de dissémination bactérienne, le diagnostic sera réalisé sur un simple ECBU.

BIBLIOGRAPHIE

[1] American Academy of Pediatrics. Practice parameter : the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. Pediatrics 1999 ; 103 : 843–52.

[2] Bouza E, San Juan R, Munoz P, et al. An European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study). European Study Group on Nosocomial Infections. Clin Microbiol Infect 2001 ; 7 : 523–31.

[3] Conférence de consensus co-organisée par la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) et l'Association française d'urologie (AFU). Infections urinaires nosocomiales de l'adulte. Med Mal Inf 2002 ; 33 : 193–215.

[4] European Confederation of Laboratory Medicine. European urinalysis guidelines. Scand J Clin Lab Invest 2000 ; 231 : 1–86.

[5] Kass EH. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract ; with observations on the use of methionine as a urinary antiseptic. AMA Arch Intern Med 1957 ; 100 : 709–14.

[6] Meares EM, Stamey TA. Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. Invest Urol 1968 ; 5 : 492–518.

[7] Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, et al. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. Clin Infect Dis 2005 ; 40 : 643–54.

[8] Stamm WE, Counts GW, Running KR, et al. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. N Engl J Med 1982 ; 307 : 463–8.

[9] Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. Clin Infect Dis 2004 ; 38 : 1150–8.

CHAPITRE

19

# Examens bactériologiques des sécrétions trachéobronchiques (hors mycobactéries)

C. Martin, F. Garnier, M.-C. Ploy, F. Denis

## Introduction

Les infections respiratoires sont les infections les plus fréquentes et surviennent à tout âge, avec cependant une fréquence accrue chez les enfants et les vieillards. Elles surviennent dans des contextes cliniques divers : immunodépression, terrain génétique (mucoviscidose), patient intubé-ventilé, mais aussi chez des sujets sans facteurs de risque particuliers.

Les micro-organismes responsables d'infections pulmonaires sont nombreux : virus (les plus fréquents), bactéries et plus rarement des champignons. Les recherches de certains agents bactériens pathogènes (mycobactéries, *Chlamydophila pneumoniae*, mycoplasmes, légionelles, *Bordetella pertusis*) réalisées dans un contexte clinique particulier et nécessitant l'utilisation des techniques spécifiques ne seront pas traitées dans ce chapitre. L'examen des sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose sera abordé à la fin de ce chapitre.

## Rappels anatomocliniques

La stérilité des voies aériennes sous-glottiques (bronches et alvéoles) est le résultat d'une épuration bactérienne assurée par trois types de défense (fig. 19.1) :

- mécanique (réflexe de toux, division bronchique, épithélium bronchique cilié, etc.) ;
- humoral (IgAs, IgG, lysozyme, surfactant, antiprotéases) ;
- cellulaire (macrophages, lymphocytes, polynucléaires).

Pour une bonne interprétation des cultures, il est nécessaire de connaître la composition de la flore oropharyngée présente dans certains prélèvements (expectorations,

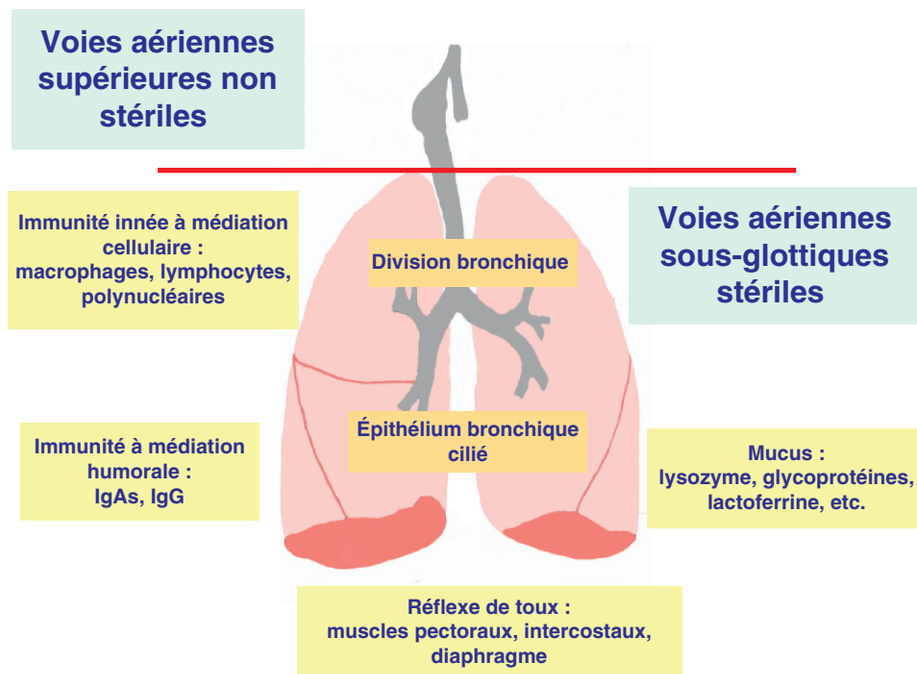



Fig. 19.1. – *Mécanismes concourant à la stérilité des voies respiratoires inférieures.*

aspirations bronchiques). La flore oropharyngée est constituée de streptocoques (*Streptococcus mutans, S. salivarius, S. sanguis, S. mitis*), de pneumocoques, de *Neisseria*, de *Branhamella*, d'*Haemophilus*, de corynébactéries et de staphylocoques. De nombreuses espèces anaérobies appartiennent également à la flore de colonisation. Toutes ces bactéries peuvent être source de contamination de prélèvements d'origine pulmonaire, mais sont aussi à l'origine de surinfections.

## Pathogenèse

Sur le plan anatomique, il est nécessaire de distinguer les voies aériennes supérieures septiques des voies aériennes inférieures sous-glottiques où la stérilité est de règle.

Il est nécessaire de distinguer les infections du parenchyme pulmonaire de celles des voies respiratoires basses.

Les infections des voies respiratoires sont les bronchites (aiguës ou chroniques). Elles sont le plus souvent d'origine virale, surtout chez l'enfant. Le rôle de bactéries commensales des voies aériennes supérieures (*S. pneumoniae, H. influenzae* et *B. catharralis*) nécessite une confrontation avec les éléments cliniques. Chez les patients atteints de bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO), des bactéries résistantes (*S. aureus*, entérobactéries, *P. aeruginosa*) peuvent être sélectionnées au cours des antibiothérapies précédentes.

Les infections parenchymateuses sont les pneumonies ou pneumopathies et les abcès. La colonisation et l'infection bactérienne s'effectuent selon différents modes : après bactériémie (nécessité de prélever des hémocultures), par contiguïté (péricardique), par déglutition ou par inhalation, qui est le mode le plus fréquent. Un drainage insuffisant des voies respiratoires (bronchite, dilatation des bronches, sténose, atalectasie) par destruction de l'épithélium ou une altération des tissus (fibrose) induit une stase bactérienne qui permet l'installation du processus infectieux. Les bactéries les plus fréquemment responsables de pneumonies communautaires sont *S. pneumoniae,* les entérobactéries*, H. influenzae, Legionella pneumophila* et *B. catharralis*, mais aussi *Mycoplasma pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Coxiella burnetii.* Les bactéries responsables des pneumopathies nosocomiales sous ventilation mécanique sont *S. aureus* et les entérobactéries ; le rôle des bactéries anaérobies a également été évoqué.

## Diagnostic bactériologique direct

Le diagnostic des infections pulmonaires bactériennes nécessite des prélèvements de sang ; les hémocultures sont indispensables dans les atteintes parenchymateuses. Chez l'adulte, la détection d'antigènes solubles de pneumocoque ou de *Legionella pneumophila* (sérotype 1) dans les urines permet un diagnostic plus précoce de ces infections pulmonaires. Chez l'enfant, la colonisation par le pneumocoque peut entraîner une « fausse » positivité du test lié au portage ; cette recherche n'est donc pas recommandée pour cette tranche d'âge.

En dehors des expectorations, différents prélèvements pulmonaires seront effectués en milieu spécialisé :

- fibroaspiration ;
- aspiration endotrachéale (AET) ;
- liquide bronchoalvéolaire (LBA) ;
- mini-liquide bronchoalvéolaire (mini-LBA) ;
- cathéter distal protégé ;
- brossage bronchique distal protégé.

Le choix du prélèvement est fonction de l'importance clinique, du terrain du patient (immunodépression) et des recherches spécifiques (bactéries « atypiques », mycobactéries) (tableau 19.1). La stratégie diagnostique d'une infection bronchopulmonaire va dépendre de sa gravité clinique. Les possibilités techniques ne sont pas les mêmes s'il s'agit de malades dits ambulatoires ou de malades hospitalisés dans des services de réanimation ou de soins intensifs qui sont intubés ou trachéotomisés. Pour des cas simples chez des patients ayant un état général conservé, l'analyse bactériologique des expectorations convenablement recueillies et lavées peut fournir des résultats acceptables. En revanche, si le processus infectieux présente un caractère vital, la réalisation d'un prélèvement fiable – aspiration endotrachéale, mini-LBA, brossage distal protégé ou cathéter distal protégé – sera nécessaire. Il en est de même si une étiologie à bactérie anaérobie est suspectée.

### Prélèvements

La qualité du prélèvement conditionne la qualité de l'analyse et des résultats.

#### *Expectoration*

L'expectoration est le seul prélèvement respiratoire réalisé par le patient. Il doit être réalisé à jeun, après rinçage buccodentaire à l'eau distillée stérile, après un effort de toux ou après kinésithérapie.

Le prélèvement est recueilli dans un tube à fond conique. L'exsudat produit doit provenir d'une origine profonde et ne pas être un exsudat rhinopharyngé contaminé par la salive. Le malade doit être amplement informé du but recherché. Malgré ces informations, le prélèvement qui parvient au laboratoire est souvent d'origine salivaire et impropre à une analyse correcte.

#### *Fibroaspiration et aspiration endotrachéale (AET)*

L'AET est réalisée lors d'une fibroscopie bronchique chez des patients atélectasiques ou chez les malades intubés ou trachéotomisés à l'aveugle. Un système d'aspiration étanche (poche d'aspiration reliée par deux tuyaux au manomètre de dépression branché au vide mural) relié à la sonde d'aspiration stérile introduite dans la trachée per-

**TABLEAU 19-1**

**Bactéries à rechercher en fonction du contexte clinique et du prélèvement reçu au laboratoire.**

| *Bactérie* | *Expectoration* | *Aspiration bronchique* | *LBA* | *Prélèvement protégé* | *Autres* |
|---|---|---|---|---|---|
| *Staphylococcus aureus* | ●●●● | ●●● | ●●●● | ●●● | Hémoculture |
| *Streptococcus pneumoniae* | ●●●● | ●●● | ●●●● | ●●● | Hémoculture, antigène soluble urinaire |
| *Hæmophilus influenzae* | ●●●● | ●●● | ●●●● | ●●● | |
| *Moraxella catharralis* | ●●●● | ●●● | ●●●● | ●●● | |
| *Klebsiella pneumoniae* | ●●●● | ●●● | ●●●● | ●●● | Hémoculture |
| Bacille à Gram négatif autres | ○●●● | ○●● | ○●●● | ○●● | |
| *Pseudomonas aeruginosa* | ○●●● | ○●● | ○●●● | ○●● | |
| *Burkholderia cepacia* | ○●● | ○● | ○●● | ●○ | |
| *Nocardia* spp. | ○○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | |
| Mycobactéries | ○○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | |
| *Legionella* spp. | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | Antigène soluble urinaire, biologie moléculaire |
| *Chamydophila pneumoniae* | ○●○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○○ | Biologie moléculaire |
| *Mycoplasma pneumoniae* | ○●○○ | ○○○ | ○○○○ | ○○○○ | Biologie moléculaire |
| Anaérobies | ○○ | ○○○ | ○○○○ | ○○○○ | |

● Pneumopathies communautaires (○ recherche en fonction des circonstances cliniques).
● Pneumopathies nosocomiales ou immunodépression (○ recherche en fonction des circonstances cliniques).
● Exacerbations bronchiques (○ recherche en fonction des circonstances cliniques).
● Mucoviscidose (○ recherche en fonction des circonstances cliniques).

met le recueil des sécrétions qui, bien que contaminées par la flore oropharyngée, présenteront l'avantage d'avoir été recueillies au niveau même de la lésion ou à proximité. Si les sécrétions sont peu abondantes, l'opérateur pourra injecter et réaspirer 20 à 50 ml de solution saline stérile, réalisant ainsi un mini-lavage.

## Cathéter distal protégé

L'aspiration bronchique à l'aide d'un cathéter distal protégé est réservée aux malades intubés et ventilés à lésions bilatérales puisque l'introduction d'un double cathéter protégé est faite à l'aveugle. Après injection de 1 ml de sérum physiologique et réaspiration à la seringue, l'extrémité du cathéter est sectionnée aseptiquement comme une brosse et placée dans un tube stérile.

## Brossage distal bronchique protégé

Cette technique associe les avantages de la fibroscopie – prélèvement dirigé au niveau du foyer infectieux – et de l'aspiration trachéale – absence de contamination par la flore pharyngée du fait de la protection de la brosse par un double cathéter obturé d'un bouchon de polyéthylène glycol amovible terminal qui est introduit par le canal du fibroscope. Le fibroscope est dirigé vers la zone à étudier. Le double cathéter est ensuite introduit dans le fibroscope. Après brossage, l'extrémité de la brosse est sectionnée aseptiquement, puis placée dans un tube contenant 1 ml de solution saline stérile.

## Liquide bronchoalvéolaire (LBA) et mini-LBA

La réalisation d'un LBA consiste à instiller du sérum physiologique au travers du chenal interne du fibroscope, lequel est positionné dans une bronche de 3e ou 4e génération. Les bronchioles distales et les alvéoles sont ainsi échantillonnées. Un volume total de 100 à 200 ml est administré par aliquots successifs de 50 ml. Le premier aliquot n'est pas utilisé pour l'analyse microbiologique.

La réalisation d'un mini-LBA est réalisée à l'aveugle, un volume restreint à 20 ml de sérum physiologique étant instillé au moyen d'un double cathéter stérile et obturé. Il est positionné à l'aveugle dans l'arbre trachéobronchique. Le bouchon de polyéthylène glycol est expulsé à l'aide d'une seringue de 10 ml remplie d'air (Combicath®, Plastimed). Après instillation, 3 à 5 ml sont recueillis par aspiration.

Le LBA est plus particulièrement destiné à la recherche de virus (cytomégalovirus [CMV]), de champignons (*Pneumocystis jirovecii*), de levures et de certaines bactéries (légionelles, *Nocardia*, *Actinomyces*).

### Autres prélèvements

Le tubage gastrique, essentiellement réservé à la recherche de mycobactéries, est pratiqué à jeun et recueille les sécrétions pulmonaires dégluties au cours de la nuit. Les biopsies pulmonaires permettent en plus une étude immunologique et histologique, parallèlement à la recherche bactériologique. Les aspirations nasopharyngées sont réalisées dans le cadre du diagnostic de chlamydiose et surtout de coqueluche.

## Transport et stockage

La flore commensale d'accompagnement des expectorations et des aspirations non protégées va se multiplier rapidement et fausser les résultats de l'analyse semi-quantitative. De plus, certains agents infectieux comme le pneumocoque ou *B. pertussis* sont fragiles et nécessitent un transport rapide (moins de 2 heures).

Le prélèvement est recueilli dans un récipient stérile : pilulier, tube à fond conique. En ce qui concerne les brosses, celles-ci sont mises dans un tube contenant 1 ml de sérum physiologique.

## Éléments non bactériologiques du diagnostic

L'examen cytologique des expectorations est important pour valider le caractère profond du prélèvement et ainsi permettre d'éliminer ceux dont l'origine salivaire est certaine. Les critères retenus sont détaillés dans le tableau 19.2.

## Traitement des prélèvements au laboratoire

Les différentes étapes de traitement des échantillons au laboratoire sont résumées figure 19.2.

**TABLEAU 19-2**

**Critères de sélection des expectorations pour la poursuite de l'étude bactériologique.**

| *Classe selon Bartlett-Murray et Washington* | *Cellules épithéliales/champ* | *Leucocytes/champ* | *Qualification* |
|---|---|---|---|
| 1 | >25 | <10 | Refusé |
| 2 | >25 | 10–25 | Refusé |
| 3 | >25 | >25 | Refusé |
| 4 | 10–25 | >25 | Accepté |
| 5 | <10 | >25 | Accepté |

Moyenne sur 10 champs (grossissement x 100).

### Expectorations, fibroaspiration et aspiration endotrachéale

Les aspirations bronchiques seront traitées d'une manière analogue aux expectorations. Si l'aspiration est trop diluée, une centrifugation est réalisée. L'examen direct (fig. 19.3) et l'ensemencement seront effectués sur le culot.

L'aspect (hémorragique, purulent, etc.) est noté. L'examen direct après coloration de Gram (grossissement $\times 100$) est effectué sur la fraction la plus purulente du produit. Le nombre de leucocytes/champ et le nombre de cellules épithéliales/champ sont déterminés et permettent de ne pas poursuivre l'analyse bactériologique pour les prélèvements de classes 1, 2 et 3 (tableau 19.2). La présence de bactéries (abondance, morphologie, aspect monomicrobien ou polymicrobien) est également précisée.

À quantité égale, sécrétions et fluidifiant (solution à 10 % de Digesteur®, Eurobio) sont mélangés et homogénéisés pendant 2 minutes sur Vortex puis laissés 15 minutes à la température du laboratoire. Une dilution à $10^{-4}$ (2 dilutions successives de 0,1 ml dans 10 ml d'eau distillée) pour les expectorations, ou une dilution à $10^{-3}$ en eau distillée (10 µl dans 10 ml) pour les fibroaspirations est ensemencée à l'aide d'une anse calibrée de 10 µl sur une gélose au sang en aérobiose, un milieu permettant la croissance des bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.) et une gélose au sang cuit additionnée de Polyvitex® ($CO_2$) ± bacitracine. Les milieux sont examinés après 24 et 48 heures d'incubation. Une colonie représente $10^5$ UFC/ml (dilution à $10^{-3}$) et $10^6$ UFC/ml (dilution à $10^{-4}$). Le seuil est de $10^7$ UFC/ml pour les expectorations et de $10^5$ UFC/ml pour les aspirations bronchiques.

### Liquide bronchoalvéolaire (LBA) et mini-LBA

Après homogénéisation, le LBA est ensemencé directement avec une anse calibrée de 10 µl sur une gélose au sang, une gélose au sang cuit additionnée de Polyvitex® ($CO_2$). À partir d'une dilution au 1/100e sont ensemencés un milieu pour bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.), une gélose sélective au sang additionnée d'acide nalidixique. Les milieux sont examinés après 24 et 48 heures d'incubation. Une colonie représente $10^2$ UFC/ml et $10^4$ UFC/ml (dilution à $10^{-2}$). Le seuil est de $10^4$ UFC/ml pour ces prélèvements. Secondairement, un examen direct après cytocentrifugation (1500 rpm, 15 minutes) après coloration de Gram et de MGG est réalisé. La présence de cellules épithéliales signe une contamination salivaire.

### Cathéter distal protégé et brossage distal protégé

Les brossages bronchiques protégés distaux, les aspirations bronchiques distales (cathéter) sont ensemencés selon une méthodologie commune. Après homogénéisation (Vortex), le cathéter est ensemencé directement avec une anse calibrée de 10 µl sur une gélose au sang, un milieu pour bacilles à Gram négatif (CLED, BCP,

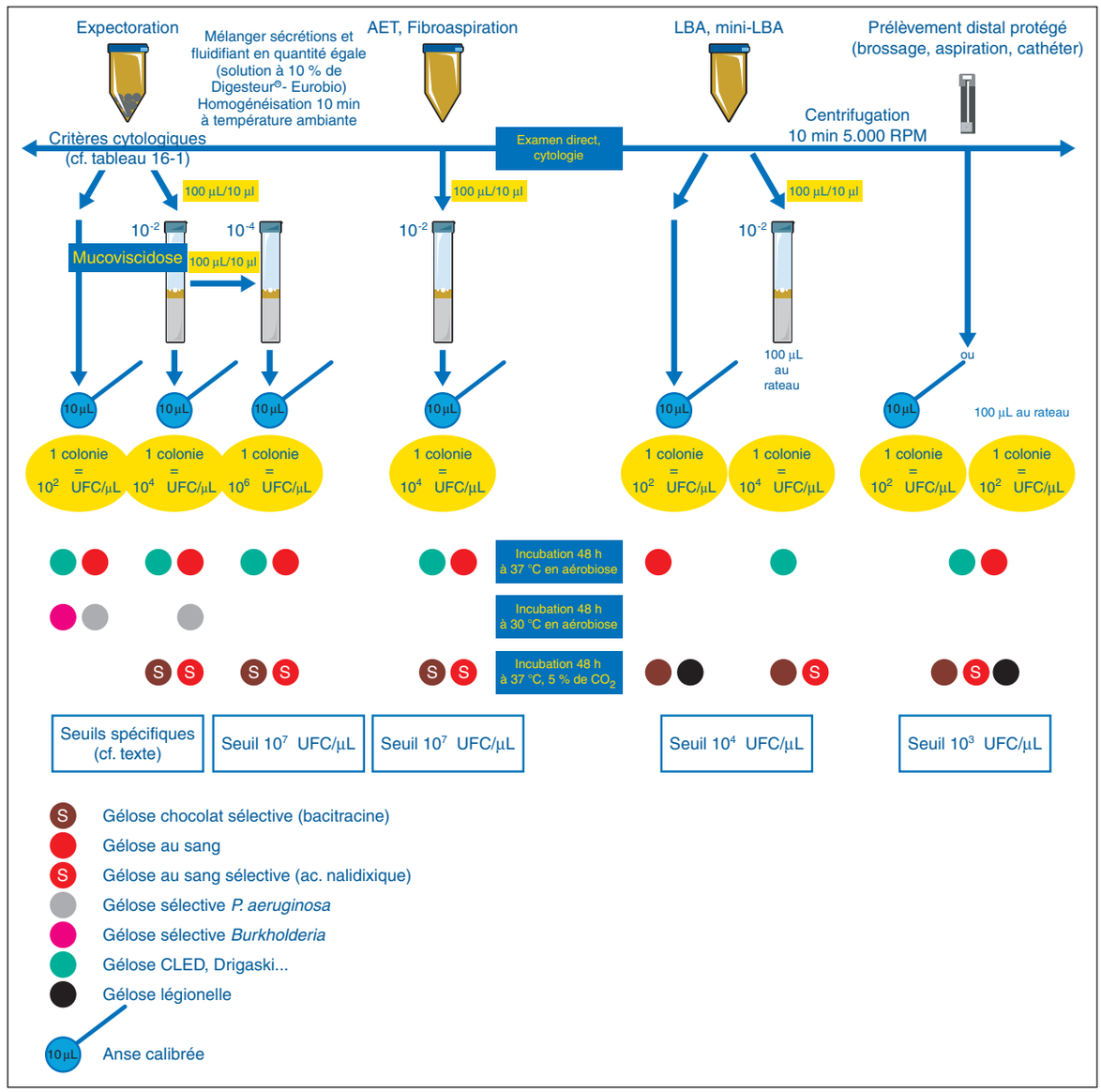



**Fig. 19.2.** – *Représentation synoptique des étapes de l'étude bactériologique des différents prélèvements des sécrétions bronchiques.*

MacConkey, etc.), une gélose au sang cuit additionnée de Polyvitex® ($CO_2$). Un bouillon de type Schaedler pour la recherche d'anaérobies et des milieux adaptés en fonction des recherches spécifiques (légionelles, mycoplasmes ou autres) seront également mis en œuvre selon les indications de la prescription médicale ou en fonction des renseignements cliniques. Les milieux sont examinés après 24 et 48 heures d'incubation. Une colonie représente $10^2$ UFC/ml. Le seuil est de 10 colonies ($\geq 10^3$ UFC/ml). Un examen direct (Gram) est réalisé sur un culot de centrifugation d'une fraction du prélèvement.

## Interprétation

La qualité du prélèvement est primordiale et doit être évaluée et signalée au service clinique pour les prélèvements non protégés. La numération semi-quantitative et la détermination de seuil permettent d'aider à l'interprétation des résultats, mais l'implication dans la symptomatologie de bactéries pouvant être en situation commensale ou pathogène comme *H. influenzae, S. aureus* ou *S. pneumoniae* est difficile à évaluer sans un dialogue avec le clinicien (tableau 19.3).

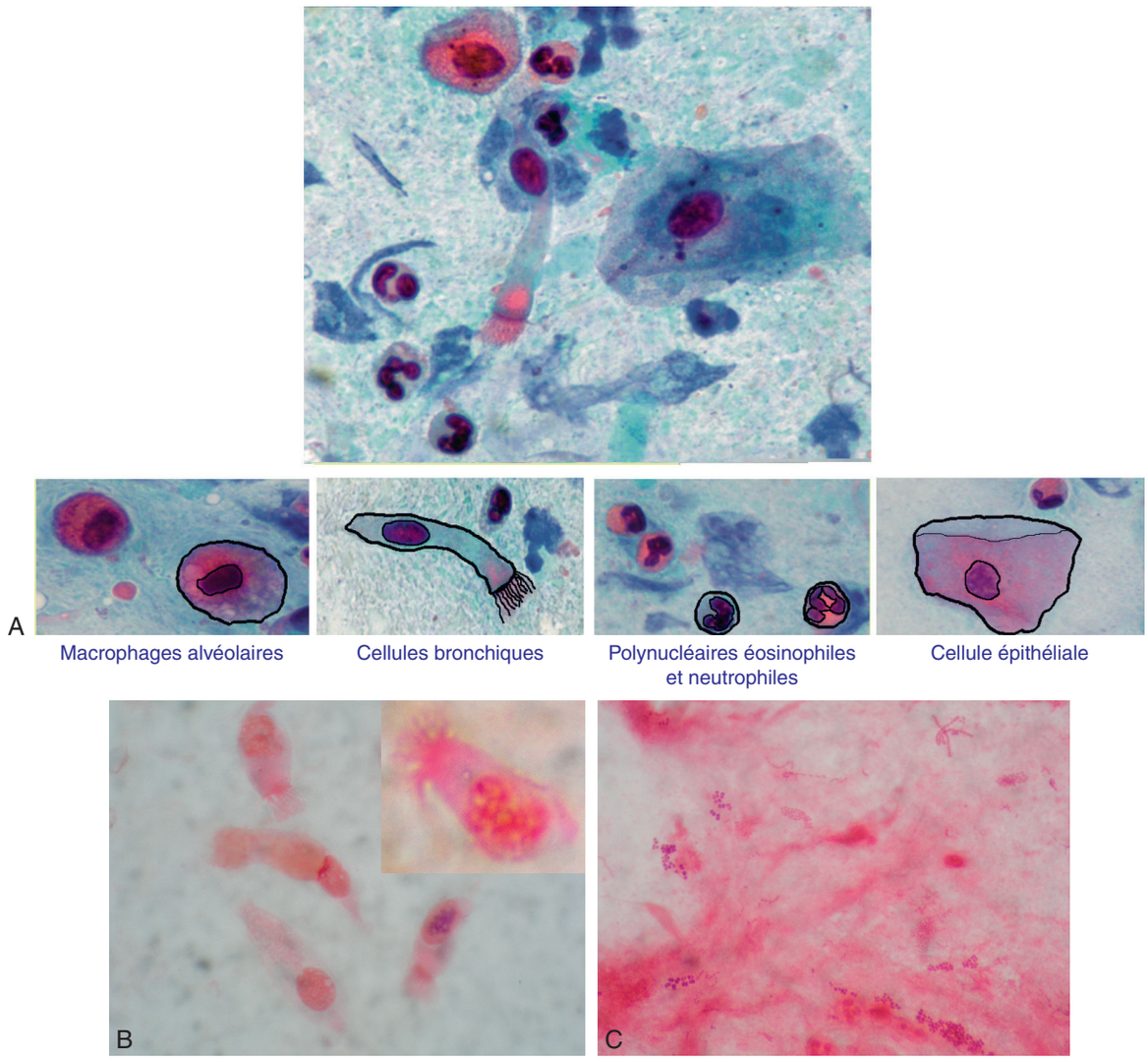



**Fig. 19.3.** – *Examen cytobactériologique d'une aspiration bronchique.*
A) Coloration de Papanicolaou. B) Coloration de Gram : cellules bronchiques. C) Coloration de Gram : contamination par une flore oropharyngée.

## Diagnostic bactériologique indirect

Il est parfois nécessaire de recourir à la sérologie (diagnostic indirect) pour le diagnostic des infections à mycoplasmes, à *Chlamydophila,* à *Coxiella* et à *Legionella*. L'interprétation de ces sérologies figure dans les différents chapitres de bactériologie systématique. Les résultats des sérologies sont cependant rétrospectifs et ne constituent pas toujours une preuve diagnostique indiscutable.

## Cas particuliers de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive qui porte sur le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) codant une protéine impliquée dans les échanges ioniques des cellules épithéliales. Les conséquences de ces mutations sont une perturbation de ces échanges qui entraîne une déshydratation des sécrétions bronchiques et une augmentation de

**TABLEAU 19-3**

**Indications, principales modalités de prélèvements et caractéristiques techniques (seuil de détection, recherches spécifiques) des différentes méthodes d'explorations des infections bronchopulmonaires.**

| *Prélèvements** | *Expectorations* | *Fibroaspiration* | *LBA* | *Mini-LBA* | *KTDP* | *BDP* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Terrain, indications | Pneumopathie communautaire, BPCO | Atélectasie | Soins intensifs, ID | Soins intensifs | Pneumopathie chronique nosocomiale | Pneumopathie chronique nosocomiale | Malade |
| Intubé-ventilé | – | ± | + | + | + | ± | |
| Nécessité d'un fibroscope | – | + | + | + | – | + | Prélèvement |
| Sérum physiologique injecté | – | ± | 3 × 50 ml | 3 × 20 ml | 1 ml | – | |
| Type récipient | Pilulier, tube à fond conique | Pilulier, tube à fond conique | Pilulier, tube à fond conique | Pilulier, tube à fond conique | Pilulier, tube à fond conique | Tube contenant 1 ml de sérum physiologique | |
| Transport | ≤2 h | ≤2 h | Immédiat | Immédiat | Immédiat | Immédiat | |
| Conservation | Température ambiante | Température ambiante | – | – | – | – | |
| Volume des sécrétions | 1–10 ml | 1–10 ml | 150 ml | 2–10 ml | 500 µl | 10 µl | |
| Contamination oropharynx | + | + | + | + | – | – | |
| Étude cytologique | Critères de Bartlett (voir tableau 19.2) | Critères de Bartlett (voir tableau 19.2) | + | + | + | + | Bactériologie |
| Seuil de positivité | $\geq 10^7$ UFC/ml | $\geq 10^6$ UFC/ml | $\geq 10^4$** UFC/ml | $\geq 10^3$ UFC/ml | $\geq 10^3$ UFC/ml | $\geq 10^3$ UFC/ml | |
| Recherches spécifiques | Mycobactéries, légionnelles, *Nocardia,* mycoplasme, *Chlamydophila* | Mycobactéries, légionnelles, *Nocardia,* mycoplasme, *Chlamydophila* | Parasites, champignons, levures, mycoplasme, *Chlamydophila*, légionnelles | Parasites, champignons, levures, mycoplasme, *Chlamydophila*, légionnelles | Parasites, champignons, levures, mycoplasme, *Chlamydophila*, légionnelles | Parasites, légionnelles | |

* Sauf AET : aspiration endotrachéale.
** Sauf *Nocardia*, mycobactérie, légionnelle, *Actinomyces*.
LBA : liquide de lavage bronchoalvéolaire ; KTDP : cathéter distal protégé ; BDP : brossage distal protégé ; BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive.

**TABLEAU 19-4**

**Rôle pathogène et identification des principales bactéries isolées des expectorations de sujet atteint de mucoviscidose.**

| *Bactérie* | *Population cible prédominante** | *Prévalence* | *Rôle pathogène* | *Seuil de détection* | *Identification* |
|---|---|---|---|---|---|
| *Pseudomonas aeruginosa* | Enf, Ado, Adu | +++ | Certain | $10^2$ UFC/ml | Phénotypique |
| *Staphylococcus aureus* | Enf, Ado, Adu | +++ | Certain | $10^2$ UFC/ml | Phénotypique |
| *Streptococcus pneumoniae* | Enf, Adu | + | Inconnu | $10^7$ UFC/ml | Phénotypique |
| *Hæmophilus influenzae* | Enf | ++ | Probable | $10^7$ UFC/ml | Phénotypique |
| *Burkholderia cepacia* | Ado, Adu | + | Certain | $10^2$ UFC/ml | Moléculaire |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | Ado, Adu | + | Possible | ND | Phénotypique |
| *Achromabacter xylosoxidans* | Ado, Adu | + | Peu probable | ND | Phénotypique |
| *Burkolderia gladioli,* | Ado, Adu | ± | Peu probable | ND | Moléculaire |
| *Pandorea* spp. | Ado, Adu | ± | Possible | ND | Moléculaire |
| *Ralstonia* spp., *Inquilinus* spp. | Ado, Adu | ± | Peu probable | ND | Moléculaire |
| Entérobactéries | Enf, Ado, Adu | + | Inconnu | $10^7$ UFC/ml | Phénotypique |
| Mycobactéries | Ado, Adu | + | Certain | ND | Moléculaire |

* Ado : adolescent; Adu : adulte; Enf : enfant; ND : non documenté.

leur viscosité. Ces modifications entraînent une réaction inflammatoire et favorisent la colonisation et l'installation d'infections bactériennes précoces devenant rapidement chroniques. À un stade précoce, les principales bactéries en cause sont *H. influenzae*, *S. aureus* et parfois *S. pneumoniae.* Puis une colonisation par *P. aeruginosa* survient et va jouer un rôle majeur dans l'évolution de la maladie au niveau respiratoire. D'autres agents peuvent également être associés à une évolution péjorative au décours de la maladie, notamment des champignons, *Mycobacterium abscessus* (mycobactéries à croissance rapide), mais surtout *Burkholderia cepacia* (tableau 19.4).

Les résultats bactériologiques des prélèvements respiratoires sont importants dans la mise en route et l'adaptation des traitements au cours de la maladie. Le prélèvement se fait de préférence au décours d'une séance de kinésithérapie, de façon à ramener des sécrétions du poumon profond. Les premiers crachats doivent être éliminés, puis intervient un rinçage de la bouche à l'eau stérile avant d'effectuer le prélèvement pour éviter la contamination salivaire. Chez le petit enfant, cet examen se fait par une aspiration nasopharyngée stérile ou par un écouvillonnage du fond de la gorge. Un examen cytobactériologique des crachats (ECBC) doit être effectué tous les 3 mois de façon systématique, ou plus souvent en fonction de l'état clinique.

L'examen direct doit être réalisé comme pour toute expectoration. Les critères de rejet du prélèvement en fonction de la cytologie ne doivent pas être appliqués. Cependant, la qualité déficiente du prélèvement doit être mentionnée sur le compte-rendu.

Après homogénéisation à quantités égales des sécrétions et d'une solution de fluidificateur (solution à 10 % Digesteur®, Eurobio) et incubation (15 minutes à la température ambiante), l'ensemencement est réalisé à partir de dilutions permettant la quantification des bactéries de $10^2$ à $10^6$ UFC/ml.

- Ensemencer à l'anse calibrée de 10 µl à partir du prélèvement pur (1 colonie = $10^2$ UFC/ml) un milieu sélectif pour *B. cepacia* (BCSA, OFPBL, PC : 30 °C), un milieu sélectif pour *P. aeruginosa* (30 °C), une gélose permettant la croissance des bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.) et une gélose sélective pour *S. aureus* (37 °C) (Chapman, gélose chromogène).
- Ensemencer à l'anse calibrée de 10 µl à partir par exemple de deux dilutions successives au 1/100e (100 µl de prélèvement dans 10 ml d'eau distillée) du prélèvement pur (1 colonie = $10^4$ UFC/ml et 1 colonie = $10^6$ UFC/ml respectivement), une gélose sélective *Haemophilus* (37 °C, 5 % $CO_2$), une gélose au sang sélective bactérie à Gram positif (37 °C, 5 % $CO_2$) permettant la croissance de *S. pneumoniae* et *S. aureus*, une gélose permettant la croissance des bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.) et des géloses Sabouraud sélectives.

Les milieux sont observés à 24 et à 48 heures puis à 5 jours voire à 10 jours (visualisation des colonies naines). Une dissociation avec la présence de colonies naines de *S. aureus* doit être prise en compte et faire l'objet d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques des différents morphotypes. Le caractère muqueux ou non de chaque morphotype de *P. aeruginosa* doit être précisé dans les résultats et faire également l'objet d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques. La recherche de mycobactéries à croissance rapide peut être réalisée à intervalles réguliers

(1 an), surtout s'il existe une dégradation de l'état pulmonaire, mais ne doit pas être effectuée systématiquement à chaque recueil. Les seuils et méthodes préconisées pour la recherche de chaque agent pathogène sont précisés dans le tableau 19.4.

## Conclusion

Les limites d'une documentation bactériologique des infections respiratoires basses à partir de prélèvements obtenus facilement mais souvent d'origine salivaire et contaminés par une flore commensale (expectorations) imposent l'utilisation de moyens plus invasifs (aspiration, brossage, etc.) dans les situations graves, les manifestations chroniques ou après un échec thérapeutique. Outre la présence de bactéries commensales, la difficulté d'interprétation des résultats est également compliquée par la présence de bactéries potentiellement pathogènes en situation de portage (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*). Les prélèvements accompagnés de renseignements cliniques doivent être de qualité et adaptés aux recherches spécifiques demandées.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Allouch PY, Bajolet O, Bingen E, Chabanon G, Flandrois JP, Marty N, et al. Recommandations pour l'analyse bactériologique des prélèvements d'expectorations chez les patients atteints de mucoviscidose. Bull Soc Fr Microbiol 1997 ; 12 : 308–9.

Conférence de consensus de l'ANAES. Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. 2002.

Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. Cystic fibrosis microbiology. [Appleman MD, Ed., Cumitech 43] Washington, DC : ASM Press ; 2006.

Reverdy ME, Girardo P, Berchiche C. Prélèvements en bactériologie clinique. In : Freney J, Renaud F, Leclerc R, Riegel P, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007. p. 741–54.

Sharp SE, Robinson A, Saubolle M, Santa-Cruz M, Caroll K, Baselki-Caren V. [Sharp SE, Ed., Cumitech 7B] Lower respiratory tract infections. Washington, DC : ASM Press ; 2004.

Société française de microbiologie. Diagnostic microbiologique des infections broncho-pulmonaires. In : REMIC, Référentiel en microbiologie médicale. 2010. p. 93–8.

Société française de microbiologie. Diagnostic microbiologique des sécrétions broncho-pulmonaires chez un patient mucoviscidosique. In : REMIC Référentiel en microbiologie médicale. 2010. p. 99–103.

CHAPITRE

20

# Analyse cytobactériologique des pus

M.-C. Ploy, F. Denis

## Introduction

Les prélèvements appelés « pus » englobent toutes les suppurations, qu'elles soient superficielles (escarre, ulcère, furoncle, etc.) ou profondes (ostéomyélite, spondylodiscite, d'origine digestive, etc.). À côté de ces suppurations primitives, on distingue aussi les suppurations secondaires postchirurgicales ou post-traumatiques.

Ces prélèvements de pus sont très fréquents et constituent une grosse part de l'activité d'un laboratoire de bactériologie.

Dans ce chapitre, la recherche de mycobactéries n'est pas abordée ; le cas de *Mycobacterium tuberculosis* et des mycobactéries atypiques sera développé dans le chapitre spécifique, de même que la recherche de *Neisseria meningitidis* dans les lésions purpuriques.

## Rappel anatomoclinique

Les prélèvements de pus sont très divers dans leur localisation anatomique.

Ces prélèvements arrivent au laboratoire sous plusieurs aspects : écouvillonnages (furoncles, escarres, morsures), biopsies (cutanées, tissulaires), pièces opératoires, liquides prélevés de préférence à la seringue (liquide péritonéal, etc.).

## Pathogenèse

Les localisations purulentes sont variées et la nature des agents infectieux impliqués sera aussi très diverse.

On distingue trois classes :

- classe I : les prélèvements proviennent de localisations normalement stériles (cerveau, adénopathie, bile, os, etc.) et, dans ce cas, si les prélèvements ont été effectués dans de bonnes conditions d'asepsie, les bactéries isolées sont directement impliquées dans le processus infectieux ;
- classes II et III : les prélèvements peuvent être effectués soit au niveau de zones profondes communiquant avec des flores commensales qui peuvent contaminer le prélèvement (c'est le cas des prélèvements d'origine digestive) – ce sont les prélèvements de classe II –; soit dans des zones superficielles, et ils seront donc contaminés directement par la flore commensale, surtout s'ils sont effectués par écouvillonnage (c'est le cas des prélèvements cutanés à type d'escarre, de brûlures, de morsures, de plaies, etc.) – ce sont les prélèvements de classe III.

Les bactéries recherchées seront différentes selon la localisation de la suppuration, le mode de prélèvement (seringue, biopsie, écouvillon) et le mode de transport (surtout pour la recherche d'anaérobies).

## Diagnostic bactériologique direct

### Prélèvements

De manière générale, il est préférable de limiter ou minimiser les prélèvements par écouvillonnage qui seront plus facilement contaminés, plus sensibles à la dessiccation et non adaptés à la recherche de bactéries anaérobies. Leur seront préférés : les biopsies, les pièces opératoires et les prélèvements à la seringue. Les biopsies doivent être placées dans un récipient stérile. Lors des prélèvements superficiels (prélèvements de plaies, brûlures, ulcérations, escarres, lésions cutanées, etc.), un nettoyage et une antisepsie de la peau, ou de la partie superficielle, seront nécessaires avant prélèvement. Chaque fois que c'est possible, on essayera d'aspirer à l'aiguille fine le liquide, la sérosité, le pus présent au niveau de la lésion ou d'effectuer une biopsie de la lésion. Afin d'éviter le dessèchement du prélèvement dans la seringue, il est possible d'aspirer ensuite 1 ml de sérum physiologique stérile. Il est aussi possible d'injecter du sérum physiologique en faible quantité dans la lésion et de réaspirer ensuite tout ce qui est possible.

En cas de suspicion de cellulite, fasciite (fig. 20.1 et 20.2), l'un des prélèvements les plus productifs est l'écouvillonnage du fond de la biopsie, réalisé aussitôt après l'acte. De même, la biopsie tissulaire est la méthode à privilégier pour les prélèvements de pied diabétique.

Lorsque les prélèvements sont réalisés à la seringue, après remplissage avec le liquide ou le pus, il faut chasser l'air avant d'acheminer la seringue au laboratoire sans l'aiguille, après l'avoir obstruée avec un bouchon stérile.

Certains pus, notamment en cas de chirurgie digestive ou orthopédique, peuvent être directement ensemencés dans des flacons pour hémocultures au bloc opératoire.

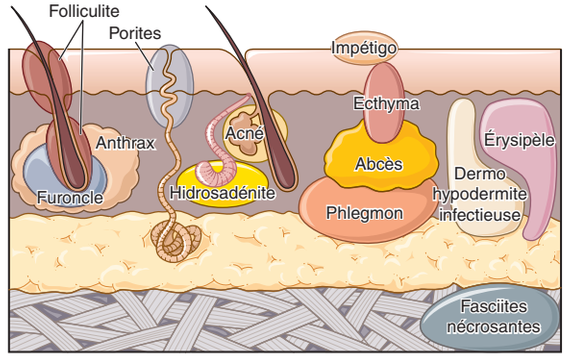



**Fig. 20.1.** – *Localisation anatomique des infections de la peau.*

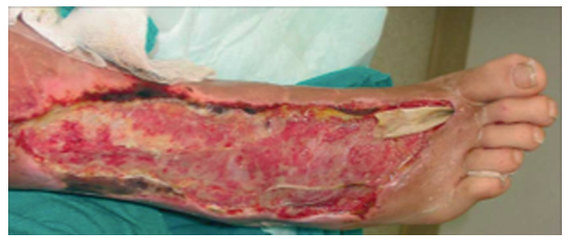


**Fig. 20.2.** – *Fasciite nécrosante (www.microbes-edu.org).*

Outre les prélèvements locaux, il ne faut pas oublier de pratiquer des hémocultures car beaucoup d'infections graves s'accompagnent de bactériémies.

## Transport et stockage

Les prélèvements de pus doivent arriver rapidement au laboratoire (< 2 heures à température ambiante), car très souvent il sera nécessaire de rechercher les bactéries anaérobies. Les prélèvements doivent arriver au laboratoire en sac hermétique, accompagnés d'une feuille de renseignements cliniques. En cas de suspicion d'infection à mycobactéries ou à *Actinomyces*, il est nécessaire de préciser que ces bactéries doivent être recherchées afin d'effectuer un ensemencement sur milieux de culture spécifiques. Des milieux de transport peuvent être utilisés. Dans certains cas, il sera intéressant de conserver une partie du prélèvement à –80 °C pour recherche de bactéries spécifiques par biologie moléculaire (notamment pour la recherche de bactéries intracellulaires difficiles à cultiver).

## Démarches du diagnostic direct sur le produit pathologique

### Traitement de l'échantillon

Les pièces opératoires, les biopsies, les tissus seront découpés et broyés stérilement sous PSM II car ces prélèvements précieux ne peuvent être renouvelés.

L'examen macroscopique du prélèvement peut être important (recherche de grains, etc.).

### Examen direct

Une coloration de Gram sera effectuée sur un frottis du produit pathologique pour les localisations profondes. On évaluera la quantité de polynucléaires, de cellules et, dans le cas de prélèvements contaminés par une flore commensale, on évaluera l'abondance de la flore.

### Milieux de culture

Du fait de la diversité des bactéries potentiellement impliquées dans les prélèvements de pus, des milieux de culture enrichis seront nécessaires ainsi que des milieux sélectifs, notamment pour les prélèvements contaminés par une flore commensale.

Seront ensemencés au moins :

- une gélose au sang incubée en aérobiose ;
- une gélose chocolat incubée sous $CO_2$ pour les bactéries de culture difficile ;
- une gélose au sang incubée en anaérobiose, sauf pour les prélèvements réalisés sur écouvillon ;
- un milieu liquide permettant la recherche d'anaérobies (Schaedler, Rosenow, etc.).

Peuvent être ajoutées :

- une gélose au sang sélective type ANC incubée sous $CO_2$ ;
- une gélose simple incubée en aérobiose pour la culture de bactéries à Gram négatif type CLED, BCP, etc.

Des flacons d'hémocultures peuvent être ensemencés avec les prélèvements liquides, soit au lit du malade, soit au bloc opératoire, soit au laboratoire.

Les milieux de culture seront gardés au moins 48 heures en aérobiose et 5 jours pour des localisations profondes ou pour recherche de bactéries de culture difficile. Les milieux de culture placés en anaérobiose seront gardés au moins 5, voire 10 jours.

### Interprétation

Étant donné la diversité des localisations, tout prélèvement de « pus » doit être correctement identifié avec la localisation précise et des renseignements cliniques indispensables pour aider le bactériologiste dans sa démarche diagnostique.

L'interprétation est très variable en fonction de la localisation anatomique du prélèvement (tableaux 20.1 à 20.6 ; fig. 20.1).

#### Morsures ou griffures animales ou humaines

On recherchera les *Pasteurella*, des bactéries anaérobies, *Eikenella corrodens* (morsure humaine), *Capnocytophaga*, *Bartonella*, *Streptobacillus moniliformis* (morsure de rongeur), des bactéries de croissance plus facile pouvant

**TABLEAU 20-1**

**Microbiologie des infections de la peau.**

| *Tissus non nécrosés* | | | *Tissus nécrosés* | |
|---|---|---|---|---|
| | *Germes* | | | *Germes* |
| *Tableau* | *Les plus fréquents* | *Moins fréquents* | *Tableau* | *Usuels* |
| Impétigo | *S. pyogenes*<br>*S. aureus* | | Gangrène gazeuse | *Clostridium perfringens, C. septicum* (etc.) |
| Érysipèle | *S. pyogenes* | *S. aureus* | Fasciite nécrosante | Mélange aérobies-anaérobies<br>*S. pyogenes* |
| Ecthyma | *S. aureus*<br>*S. pyogenes* | *P. aeruginosa* | Progressif | *Streptococcus* spp.<br>+ *S. aureus* (voire *Proteus* spp.) |
| Cellulite | *S. aureus*<br>*S. pyogenes* | *H. influenzae*<br>*P. multocida*<br>*Enterobacteriaceae*<br>*Aeromonas* spp. | Cellulite anaérobie | *C. perfringens*<br>Mélanges aéro-anaérobies |
| Abcès cutanés | *S. aureus* | | | |
| Furoncles | *S. aureus* | | | |
| Folliculites | *S. aureus* | *P. aeruginosa* | | |

**TABLEAU 20-2**

**Infections associées à des morsures.**

| *Nature de la morsure* | *Germes usuels* |
|---|---|
| Chiens | *Pasteurella multocida*<br>*Streptococcus* spp.<br>*Staphylococcus aureus*<br>*Capnocytophaga canimorsus*<br>*Eikenella corrodens*<br>Anaérobies |
| Chats | *Pasteurella multocida*<br>*Streptococcus* spp.<br>Anaérobies |
| Humains | *Staphylococcus aureus*<br>*Eikenella corrodens*<br>*Haemophilus influenzae*<br>Anaérobies |

**TABLEAU 20-3**

**Principales espèces microbiennes ostéoarticulaires.**

| *Ostéomyélite* | *Arthrites* | *Infections sur prothèse* |
|---|---|---|
| *S. aureus*<br>*Staphylococcus* coagulase –<br>*Streptococcus* spp.<br>*Enterobacteriaceae*<br>*P. aeruginosa*<br>*Salmonella* sp. : drépanocytaires<br>*S. pneumoniae* : drépanocytaires<br>*S. aureus* : drépanocytaires<br>*P. multocida* : postmorsure<br>*Eikenella corrodens* : postmorsure<br>*Streptococcus* spp. : postmorsure | Enfant :<br>*S. aureus*<br>*Streptococcus* spp. (B)<br>*H. influenzae*<br>Adulte :<br>*S. aureus*<br>*Streptococcus* spp.<br>*N. gonorrhoeae*<br>Bacilles à Gram –<br>*P. aeruginosa* (drogués)<br>*B. burgdorferi* | *S. aureus*<br>*Staphylococcus* coagulase –<br>Bacilles à Gram –<br>*Enterococcus et Streptococcus* spp. |

aussi être impliquées (staphylocoques, streptocoques, corynebactéries).

### Plaies contaminées par de la terre

Rechercher les bactéries anaérobies, surtout *Clostridium* et *Bacillus*.

### Brûlures

Les bactéries les plus importantes en pathologie sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

### Infections du site opératoire

Les bactéries les plus fréquemment isolées sont les staphylocoques, bacilles à Gram négatif, les entérocoques, *Pseudomonas aeruginosa.*

### Escarres, ulcérations

Ces prélèvements seront contaminés par une flore polymicrobienne (staphylocoques, corynébactéries, entérobactéries).

**TABLEAU 20-4**

**Agents des péritonites de l'enfant et de l'adulte.**

| *Péritonites* | *Germes* | *Enfants* | *Adultes* |
|---|---|---|---|
| Spontanées | Les plus fréquents | *S. pneumoniae*<br>*S. pyogenes* | *E. coli*<br>*S. pneumoniae* |
| Primitives | Moins fréquents | *E. coli* | *Klebsiella* spp.<br>Anaérobies |
| | | Enfants et adultes | |
| Secondaires | Les plus fréquents | *Bacteroides fragilis*<br>*Peptostreptococcus* spp.<br>*Clostridium* spp.<br>*Bilophila wadsworthia*<br>*E. coli*<br>*Proteus* spp.<br>*Klebsiella* spp.<br>*Streptococcus* spp. | |
| Tertiaires | Moins fréquents | *P. aeruginosa*<br>*Enterococcus* spp.<br>*Candida* spp. | |

**TABLEAU 20-5**

**Étiologie des abcès hépatiques.**

| *Germes* | *Enfants* | *Adultes* |
|---|---|---|
| Les plus fréquents | *E. coli*<br>*Proteus* spp.<br>*Klebsiella* spp.<br>*Enterobacter* spp.<br>*Streptococcus* spp.<br>*S. aureus* | *E. coli*<br>*Proteus* spp.<br>*Klebsiella* spp.<br>*Enterobacter* spp.<br>*Streptococcus* spp. |
| Moins fréquents | | *Entamoeba histolytica* |

**TABLEAU 20-6**

**Infections du pied diabétique.**

| *Aspects* | *Germes usuels* |
|---|---|
| Modéré | *Staphylococcus aureus*<br>*Streptococcus* β-hémolytiques |
| Sévère, menaçant le membre | *Staphylococcus aureus*<br>*Streptococcus* spp.<br>*Enterococcus* spp.<br>*Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>Autres |

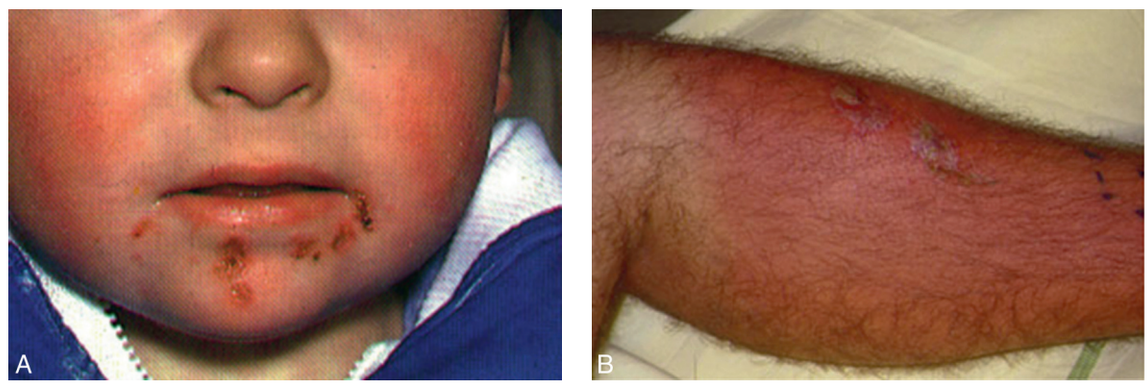



**Fig. 20.3.** – *Impétigo (A) et érysipèle (B) (www.microbes-edu.org).*

Des bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, streptocoques β-hémolytiques, *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être cliniquement significatives si elles sont présentes en grande quantité.

## Impétigo, érysipèle, furoncles, cellulites

*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* sont les bactéries les plus fréquemment impliquées (fig. 20.3).

## Lésions granulomateuses

La recherche de mycobactéries, de *Bartonella* et de *Nocardia* doit être réalisée en plus des bactéries de culture plus facile et des anaérobies.

## Adénopathies

La recherche de mycobactéries, de *Francisella* et de *Bartonella* doit être réalisée en plus de la recherche de bactéries de culture plus facile et des anaérobies.

### Ostéites

Les milieux de culture doivent être gardés 10 jours. Peuvent être isolées de nombreuses espèces bactériennes. La culture peut être parfois polybactérienne, notamment dans le cas des infections sur prothèse et alors tous les germes isolés doivent être pris en considération même s'il s'agit de staphylocoques à coagulase négative. Si le prélèvement a été bien fait, toutes les bactéries isolées sont cliniquement significatives. Il ne faut pas oublier la recherche d'anaérobies. La recherche de mycobactéries peut aussi parfois être justifiée en fonction du contexte.

### Abcès cérébraux

Il faut penser à rechercher les mycobactéries, *Nocardia* et *Actinomyces*. En post-traumatique, de nombreuses espèces bactériennes peuvent être isolées.

### Pus d'origine abdominale

Les causes de suppurations et les localisations peuvent être très diverses. Certains prélèvements peuvent être contaminés par de la flore digestive (liquides péritonéaux, abcès fistulisés, etc.). Les entérobactéries, entérocoques et anaérobies sont les plus fréquemment isolés. Les staphylocoques peuvent aussi être impliqués.

### Péritonites primitives et infections des voies biliaires

Les péritonites primitives et infections des voies biliaires sont le plus souvent monomicrobiennes (*Escherichia coli* et les streptocoques arrivent en premier, mais on peut aussi isoler des anaérobies ou du pneumocoque).

Les péritonites secondaires à un foyer infectieux intra- ou extra-abdominal sont le plus souvent polymicrobiennes.

**ENCADRÉ**

Si plus de trois espèces bactériennes sont isolées, la pertinence de l'identification et de l'antibiogramme systématique est faible. En effet, dans ce cas, il s'agit probablement d'une infection polymicrobienne impliquant des bactéries de la flore digestive dont certaines seront difficiles à cultiver (certains anaérobies). Un traitement probabiliste sera alors plus adapté.

### *Recherche de constituants bactériens*

La recherche de génome bactérien pourra être utile notamment pour les bactéries à croissance difficile (*Bartonella, Francisella tularensis*, etc.). Cette recherche se fera le plus souvent par PCR à l'aide d'amorces spécifiques pour rechercher précisément certaines bactéries. Il est possible aussi de rechercher tout génome bactérien en réalisant une PCR ARN 16S sur le produit pathologique. Dans ce cas, les prélèvements doivent avoir été effectués avec beaucoup de précautions pour éviter des contaminations par des bactéries de la flore résidente ou de l'environnement. Des études récentes font état de résultats très encourageants de techniques PCR appliquées aux liquides articulaires.

## Place du diagnostic indirect

Dans certains cas, des bactéries pathogènes peuvent entraîner des lésions cutanées plus ou moins purulentes, mais pour lesquelles la recherche de bactéries par culture ne sera que rarement productive car ces bactéries sont difficilement cultivables :

- maladie de Lyme due à *Borrelia burgdorferi* : dans le développement de cette pathologie, on peut voir des localisations cutanées (acrodermatites nécrosantes). La recherche de *Borrelia* par culture est extrêmement difficile et la recherche du génome par PCR réservée à des laboratoires spécialisés (Centre National de Référence). La sérologie peut apporter une aide au clinicien dans le diagnostic, avec une phase de dépistage et une phase de confirmation par *immuno-blot* ;
- maladie des griffes du chat due à *Bartonella* : la recherche par PCR est possible mais la sérologie sera aussi informative ;
- tularémie (*Francisella tularensis*) : la recherche du génome par PCR est possible sur les biopsies. La sérologie, facilement réalisable, pourra aussi être d'une grande utilité devant des facteurs de risque d'infection à *Francisella* ;
- syphilis : la recherche de tréponèmes par microscopie à fond noir est le seul examen direct possible pour le diagnostic de syphilis. Cependant, le patient n'est pas toujours vu à la phase de chancre ou de ganglion satellite ponctionnable et la sérologie est très utile dans le diagnostic de la maladie.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Andremont A. Écosystème bactérien du tube digestif. Rapports avec le traitement des péritonites. Med Mal Infect 1995 ; 25 : 38–41.

Bonilla H, Kepley R, Pawla KJ, et al. Rapid diagnosis of septic arthritis using 16S rDNA PCR : comparison of 3 methods. Diagn Microbiol Infect Dis 2011 ; 69 : 390–5.

Boulouis HJ. Les infections par morsures de chiens ou de chats : agents bactériens et stratégies thérapeutiques. Antibiotiques 2004 ; 6 : 103–7.

Denis F, Martin C, Ploy MC. L'érysipèle : données microbiologiques et pathologiques. Med Mal Infect 2000 ; 30 : 296–305.

Dubreuil L. Étiologie bactérienne des péritonites. Lettre Infect 1997 ; 12 : 15–23.

Guibert M. La bactériologie des péritonites. Med Mal Infect 1995 ; 25 : 42–53.

Piemont Y, Rieder C, Mahoudeau I, et al. Les prélèvements en bactériologie. Lettre Infect 2000 ; 2 : 54–60.

REMIC. Examen bactériologique des suppurations closes et des séreuses. Examens bactériologiques d'un pied diabétique infecté. Examen microbiologique des lésions et suppurations cutanées. Les examens microbiologiques chez un brûlé. SFM Ed ; 2010. p. 147–88.

CHAPITRE

# 21 Analyse bactériologique des matériels

M.-C. Ploy

## Introduction

De nombreux dispositifs peuvent faire l'objet d'une analyse bactériologique :

- cathéter périphérique, central, artériel, de dialyse, etc. ;
- chambre implantable ;
- drain ;
- lame, crin ;
- pacemaker ;
- Swan-Ganz ;
- électrodes ;
- matériel de chirurgie orthopédique (clou, vis, plaque, ciment, etc.) ;
- matériel de dérivation ;
- fil ;
- sonde urétérale ;
- dispositif intra-utérin ;
- matériel ophtalmologique (lentilles, etc.) ;
- etc.

Les prothèses valvulaires sont traitées dans le chapitre « Endocardites ».

## Rappel anatomoclinique

Certains matériels vont pouvoir être contaminés par de la flore commensale, le plus souvent cutanée car ils ont une localisation plus ou moins externe (drain, cathéter, lame, etc.). D'autres utilisés notamment en chirurgie, le plus souvent orthopédique (clou, vis, prothèse) ou cardiaque (pacemaker, Swan-Ganz, électrodes), sont normalement stériles.

## Pathogenèse

À l'exception des dispositifs intravasculaires (cathéters, chambres implantables) et du matériel d'ostéosynthèse en chirurgie orthopédique dans le cadre du diagnostic des infections ostéoarticulaires, l'analyse bactériologique des autres types de matériel, bien que souvent prescrite, n'a pas de réelle pertinence clinique. En effet, les prélèvements peuvent souvent être contaminés par de la flore commensale et le diagnostic d'infection ne peut pas reposer exclusivement sur une culture bactérienne positive du matériel.

Nous traiterons ici principalement des dispositifs intravasculaires et du matériel d'ostéosynthèse. Le cas des dispositifs intra-utérins sera rapidement évoqué.

En ce qui concerne les cathéters, de nombreuses études ont évalué les techniques de diagnostic des infections sur cathéter. Les dispositifs intravasculaires peuvent être colonisés par des bactéries de la peau qui pourront être à l'origine d'une infection localisée ou systémique. Une infection sur cathéter peut aussi être la conséquence d'une contamination par voie endoluminale lors de la manipulation des connexions aux lignes de perfusion, parfois multiples ; l'infection est dans ce cas le plus souvent due à des bactéries manuportées par le personnel soignant.

Dans le cas des cathéters, comme en chirurgie orthopédique, ce sont les staphylocoques, bactéries commensales de la peau, qui seront le plus souvent incriminés (fig. 21.1 et tableau 21.1). Les complications sont plus fréquentes avec *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

De nombreuses souches de staphylocoques possèdent la capacité de produire du biofilm, ce qui leur permet d'adhérer plus facilement à du matériel.

Dans le cas de la chirurgie orthopédique, les infections sur matériel sont aussi fréquemment dues à des corynébactéries ou *Propionibacterium acnes* qui sont également des bactéries de la peau.

D'autres bactéries peuvent aussi être isolées (entérobactéries, *Acinetobacter, Pseudomonas*, entérocoques, etc.). Les *Candida* sont également retrouvées dans les infections sur cathéter (2 à 5 % selon les études).

## Diagnostic bactériologique direct

### Prélèvement

Tout matériel sera prélevé avec précaution et acheminé au laboratoire dans un récipient stérile.

Dans le cas des infections sur **cathéter** ou sur **chambre implantable**, si le matériel suspecté est laissé en place, il est nécessaire de pratiquer en parallèle des hémocultures prélevées sur le cathéter et des hémocultures prélevées

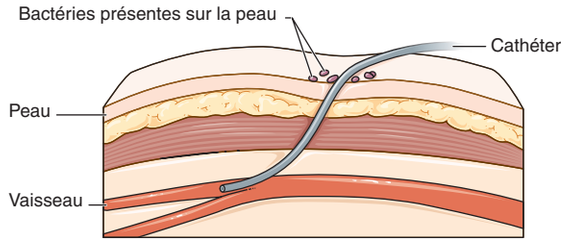



Fig. 21.1. – *Schéma d'introduction d'un cathéter.*

en périphérie. Des systèmes d'hémocultures quantitatives comme le système Isolator® ont été décrits pour diagnostiquer une infection sur cathéter. Une infection sur cathéter est alors considérée comme significative si la numération microbienne dans l'échantillon sanguin prélevé sur cathéter est 5 fois supérieure à celle dans l'échantillon sanguin périphérique. Mais ces systèmes sont coûteux et assez complexes à utiliser en routine. Une autre approche, très utilisée en routine, est possible si les hémocultures sont analysées par un automate. En effet, il a été montré, qu'en cas d'infection sur cathéter, les hémocultures prélevées au même moment et sur cathéter se positivent au moins 2 heures plus tôt que celles prélevées en périphérie, à condition que les deux séries d'hémocultures soient prélevées avec le même volume de sang, acheminées au laboratoire et introduites dans l'automate, en même temps. Le temps de positivité est relié à l'inoculum bactérien dans le sang. Cette technique est surtout intéressante pour les cathétérisations au long cours où c'est surtout la partie endoluminale qui est concernée, alors que lors des premiers jours, c'est la colonisation de surface à partir de la peau qui est prépondérante.

S'il y a ablation du matériel, ce sera la partie distale (4 à 5 cm) qui sera analysée pour les cathéters longs et la totalité de la partie sous-cutanée pour les cathéters courts. Pour les chambres implantables, on pourra analyser le cathéter, un écouvillonnage externe de la chambre, un écouvillonnage de la loge, voire un produit de rinçage de la partie fermée.

L'analyse bactériologique des cathéters et des chambres n'est pas systématiquement utile lors du retrait mais doit être réservée en cas de signes locaux et/ou généraux d'infection.

**ENCADRÉ**

Les techniques d'hémocultures différentielles sur cathéter et en périphérie ont permis de faire le diagnostic d'une infection sur cathéter en le laissant en place, ce qui est important pour des cathétérisations au long cours, comme pour des patients d'oncologie et d'hématologie.

D'autres techniques ont été proposées pour étudier les infections sur cathéter en laissant le cathéter en place, notamment en réalisant un prélèvement sanguin de 50 µl transcathéter. Après traitement chimique et cytocentrifugation, une coloration de Gram, une coloration à l'acridine orange et un examen microscopique sont réalisés sur le culot de centrifugation. Cette méthode a montré de bonnes sensibilité et spécificité.

## Transport, stockage

Tout matériel sera acheminé rapidement au laboratoire dans un pot stérile.

## Démarches du diagnostic direct sur le produit pathologique

Le matériel d'ostéosynthèse sera mis en culture en milieu liquide tel que bouillon de Rosenow, bouillon thioglycolate, etc. Les bouillons seront incubés à 37 °C pendant 48 heures. Si la culture est positive, les bouillons seront repiqués sur gélose au sang et gélose « chocolat » en aérobiose incubées sous $CO_2$ 48 heures, et gélose au sang en anaérobiose incubée 5 jours pour la recherche de *Propionibacterium acnes*.

En ce qui concerne les **cathéters**, ce sera la partie distale (4 à 5 cm) qui sera analysée pour les cathéters longs et la totalité de la partie sous-cutanée pour les cathéters courts. Il existe trois techniques d'ensemencement :

- la technique semi-quantitative de Maki qui consiste à faire rouler le segment de cathéter (5 cm) sur une gélose au sang (fig. 21.2). Après incubation à 37 °C en atmosphère enrichie en $CO_2$, le nombre d'unités formant colonies (UFC) sera déterminé. La colonisation est considérée comme significative si la numération est ≥ 15 UFC ;

**TABLEAU 21-1**

**Micro-organismes associés aux infections sur cathéters (fréquence d'après différentes enquêtes).**

| | |
|---|---|
| Staphylocoques à coagulase négative | 25 à 40 % |
| *Staphylococcus aureus* | 5 à 19 % |
| *Enterococcus* spp. | 3 à 11 % |
| Autres Gram positif | 1 à 7 % |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 2 à 22 % |
| Entérobacteries | 10 à 25 % |
| *Acinetobacter* | 1 à 2 % |
| *Candida* spp. | 1 à 12 % |

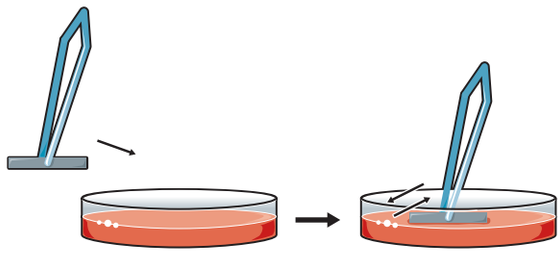



**Fig. 21.2.** – *Technique d'ensemencement des cathéters de Maki.*

- la technique de Cléri qui consiste à désobstruer la lumière du segment de cathéter à analyser avec 1 ml de sérum physiologique stérile. Une aliquote sera ensemencée à l'öse calibrée (10 µl) sur une gélose au sang. Après incubation à 37 °C en atmosphère enrichie en $CO_2$, le nombre d'UFC sera déterminé, 1 colonie correspondant à $10^2$ UFC/ml. La colonisation est considérée comme significative si la numération est $\geq 10^3$ UFC/ml ;
- la technique quantitative de Brun-Buisson qui est dérivée de la méthode de Cléri et qui consiste à recueillir le segment de cathéter à analyser dans 1 ml de sérum physiologique stérile sans désobstruction. Après agitation au vortex, une aliquote sera ensemencée à l'öse calibrée (10 µl) sur une gélose au sang. Après incubation à 37 °C en atmosphère enrichie en $CO_2$, le nombre d'UFC sera déterminé, 1 colonie correspondant à $10^2$ UFC/ml. La colonisation est considérée comme significative si la numération est $\geq 10^3$ UFC/ml. Une sonication du cathéter dans un bouillon est aussi possible avant ensemencement de la gélose au sang.

Des flacons d'hémocultures peuvent être ensemencés, notamment à partir des chambres implantables qui auront été préalablement déchargées dans du sérum physiologique stérile.

Les dispositifs intra-utérins seront déchargés dans du sérum physiologique stérile. Plusieurs milieux seront ensemencés à la recherche de tout germe, sans oublier la recherche de gonocoque, *Mycoplasma, Ureaplasma*, *Chlamydia* et *Actinomyces*.

Seront ensemencés au moins :
- une gélose au sang incubée en aérobiose ;
- une gélose chocolat incubée sous $CO_2$ pour les bactéries de culture difficile ;
- une gélose au sang incubée en anaérobiose ;
- un milieu liquide permettant la recherche d'anaérobies (Schaedler, Rosenow, etc.).

Peuvent être ajoutés :
- une gélose au sang sélective type ANC incubée sous $CO_2$ ;
- une gélose simple incubée en aérobiose pour la culture de bactéries à Gram négatif type CLED, BCP, etc.

## Interprétation

Étant donné la diversité des localisations, tout prélèvement doit être correctement identifié en précisant le siège, l'heure de prélèvement et des renseignements cliniques indispensables pour aider le bactériologiste dans sa démarche diagnostique.

En cas d'infection sur dispositif intravasculaire, la décision de retrait du matériel dépend des micro-organismes en cause (quasi systématiquement en cas de *Candida* spp., plus discuté en cas de *S. aureus* et *Pseudomonas*), de la présentation clinique et du risque de complication (si le patient porte une prothèse articulaire ou endovasculaire).

Pour le matériel d'ostéosynthèse, l'interprétation des cultures doit se faire de façon concomitante avec les résultats des cultures des prélèvements peropératoires (biopsies, liquides articulaires). Il est souhaitable de conserver les souches pendant un an au moins dans le cadre médico-légal d'infection sur matériel.

**ENCADRÉ**

En cas de matériel d'ostéosynthèse, il est possible d'isoler plusieurs bactéries d'espèces différentes qui seront toutes significatives.
Pour les cathéters, une culture polybactérienne n'est souvent pas significative et correspond plus à une contamination par de la flore commensale.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia : a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. Lancet 1999 ; 354 : 1071–7.

Blot F, Nitenberg G, Brun-Buisson C. New tools in diagnosing catheter-related infections. Support Care Cancer 2000 ; 8 : 287–92.

Fan ST, Teoh-Chan CH, Lau KF. Evaluation of central venous catheter sepsis by differential quantitative blood culture. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989 ; 8 : 142–4.

Groupe Rémic de la Société française de microbiologie. Diagnostic des infections microbiennes liées à un dispositif intra-vasculaire. In : Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie). Société Française de Microbiologie ; 2010.

Kite P, Dobbins BM, Wilcox MH, McMahon MJ. Rapid diagnosis of central-venous-catheter-related bloodstream infection without catheter removal. Lancet 1999 ; 354 : 1504–7.

Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter-related infection. N Engl J Med 1977 ; 296 : 1305–9.

Mourvillier B, Timsit JF. Prise en charge des infections liées aux cathéters veineux centraux. Antibiotiques 2003 ; 5 : 69–76.

Richet H. Épidémiologie bactérienne des infections liées aux cathéters en réanimation. Réan Urg 1994 ; 3 : 331–5.

CHAPITRE

22

# Liquides d'épanchement

M.-C. Ploy, C. Martin

L'analyse de liquides normalement stériles est primordiale dans la précocité de la prise en charge thérapeutique du patient.

## Introduction

Les liquides d'épanchement correspondent à une quantité anormale de liquide dans les séreuses.

Cette catégorie regroupe :

- les liquides pleuraux ;
- les liquides d'ascite ;
- les liquides péricardiques ;
- les liquides articulaires ;
- les liquides de dialyse péritonéale.

L'analyse cytobactériologique des liquides péritonéaux ne sera pas envisagée dans ce chapitre, ceux-ci étant étudiés avec les pus.

## Rappels anatomopathologiques

Les liquides d'épanchement peuvent avoir différentes étiologies. Ce sont soit des transsudats purement mécaniques (cirrhose, insuffisance cardiaque, syndrome néphrotique, etc.), soit des exsudats consécutifs à une infection ou à un cancer.

Les patients en dialyse péritonéale sont des patients à haut risque infectieux. Les cathéters de dialyse constituent une porte d'entrée potentielle de bactéries pouvant envahir la cavité péritonéale, très fréquemment des staphylocoques. L'analyse du liquide de dialyse péritonéale permet d'identifier la ou les bactéries en cause.

## Pathogenèse

Les liquides d'épanchement sont des prélèvements précieux à traiter en urgence car l'infection de ces liquides conduit parfois à des pathologies infectieuses graves, difficiles à traiter, pouvant entraîner des morbidités et mortalités élevées.

Les **arthrites septiques** sont des infections sévères qui peuvent avoir des conséquences fonctionnelles importantes jusqu'à être invalidantes. Elles nécessitent un diagnostic d'urgence. Ces infections sont la conséquence de l'extension d'une infection locale (ostéite, infection des parties molles) ou d'un traumatisme (injection, piqûre, etc.), ou encore d'une dissémination bactérienne par voie hématogène à partir d'un foyer primitif (cutané, ORL, respiratoire, urinaire, etc.). Certains facteurs favorisent ces infections, parmi lesquels le diabète, un âge > 80 ans, une polyarthrite chronique, une prothèse.

Les arthrites sont des infections monoarticulaires souvent localisées aux grosses articulations (genou, hanche, cheville, coude, etc.). L'épanchement est constitué d'un liquide purulent avec au moins 80 % de polynucléaires neutrophiles. Les hémocultures peuvent être positives si l'infection articulaire est secondaire à une infection systémique.

Les bactéries responsables d'arthrites purulentes varient selon l'âge et le mécanisme physiopathologique de l'infection :

- chez le nouveau-né et le nourrisson : streptocoque du groupe B, *Haemophilus influenzae, Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ;
- chez l'enfant : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (groupe A), *Kingella kingae*, pneumocoque ;
- chez l'adulte : *Staphylococcus aureus*, pneumocoque, *Streptococcus pyogenes* (groupe A), entérobactéries, entérocoques, streptocoques non groupables, méningocoques et gonocoques.

Après traumatisme, *Pseudomonas aeruginosa*, les bactéries anaérobies et *Borrelia burgdorferi* (morsures de tiques) peuvent être impliqués.

*Mycobacterium tuberculosis* provoque une ostéoarthrite du genou ou de la hanche, le plus souvent paucibacillaire.

Dans les infections sur prothèse, les bactéries les plus fréquemment isolées sont : *S. aureus*, *S. epidermidis*, streptocoques, *Propionibacterium acnes*, entérobactéries, *Pseudomonas*. Elles peuvent être polybactériennes. Les infections sur prothèse peuvent être considérées comme nosocomiales dans un délai d'un an après la pose de prothèse. Dans le cadre des infections ostéoarticulaires, les bactéries sont souvent sous forme de biofilms ou dans un état métabolique particulier avec une morphologie de colonies naines. Cela nécessitera donc des milieux riches et des cultures prolongées.

**ENCADRÉ**

Les arthrites subaiguës ou chroniques à *Brucella*, à champignons ou à mycobactéries atypiques sont plus rares.

Les arthrites septiques sont à distinguer des arthrites réactionnelles postinfectieuses induites par une réponse immunitaire et qui surviennent moins de 4 semaines après une urétrite ou une gastro-entérite voire une méningite. Les arthrites sont rencontrées après des infections cutanéomuqueuses à *Streptococcus pyogenes* (rhumatisme articulaire aigu [RAA]), des infections génitales à *Chlamydia trachomatis* ou des infections intestinales à *Shigella, Salmonella, Yersinia* ou *Campylobacter.*

Les **pleurésies purulentes** sont des infections secondaires de la cavité pleurale, le plus souvent consécutives à une pneumonie aiguë (notamment les pneumopathies d'inhalation) ou à un abcès pulmonaire. Une inoculation directe postchirurgicale est aussi possible (après chirurgie thoracique). Certains facteurs sont favorisants tels que le diabète, l'éthylisme, le cancer du poumon, les facteurs à risque de pneumonies d'inhalation. Une pleurésie correspond à une accumulation de liquide entre les deux feuillets de la plèvre. Les pleurésies soit sont aiguës avec une apparition brutale et de la fièvre, soit évoluent à plus bas bruit avec une altération de l'état général.

Dans 99 % des cas, l'épanchement est unilatéral.

Les épanchements pleuraux par altération de perméabilité des capillaires se résorbent spontanément mais peuvent s'infecter par contiguïté, ou par voie lymphatique ou sanguine. La réaction inflammatoire avec présence de fibrine crée des zones de cloisonnement et d'abcédation qu'il est parfois nécessaire de drainer.

Les bactéries les plus souvent rencontrées chez l'adulte sont les streptocoques oraux, le pneumocoque, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et des bactéries anaérobies.

Chez les enfants, les bactéries les plus fréquemment isolées sont : *S. aureus*, le pneumocoque, *Haemophilus influenzae*, *Steptococcus pyogenes* (groupe A) et les bactéries anaérobies.

Un épanchement pleural est retrouvé dans 20 à 30 % des tuberculoses pulmonaires, avec plus rarement un empyème.

**ENCADRÉ**

Les liquides pleuraux non purulents correspondent le plus souvent à une insuffisance cardiaque, à une réaction inflammatoire ou à un processus néoplasique.

L'**ascite** correspond à un épanchement intrapéritonéal, le plus souvent abondant, alors que la péritonite est souvent limitée par une lame liquidienne.

Le liquide d'ascite est souvent stérile. Cette accumulation de liquide dans le péritoine est retrouvée chez des malades cirrhotiques, insuffisants cardiaques, néphrotiques ou cancéreux. L'infection du liquide d'ascite fait suite à une bactériémie ou à l'introduction de bactérie lors de ponction évacuatrice.

Lorsque le taux de protides dans l'ascite est $< 10$ g/l, l'incidence d'infection du liquide d'ascite est de 20 à 35 % au bout d'un an alors qu'elle n'est que de 3 % à 3 ans lorsque le taux de protides est $> 10$ g/l.

L'infection du liquide d'ascite chez le cirrhotique intervient dans 10 à 30 % des cas, dont l'étiologie la plus fréquente est la translocation bactérienne à partir de la flore digestive ou secondaire à une bactériémie dans le cas d'hémorragies digestives. D'autres étiologies sont plus rares (origine pulmonaire, urinaire).

Les bactéries les plus fréquemment retrouvées sont majoritairement les entérobactéries, puis les entérocoques, le pneumocoque, les staphylocoques et des bactéries anaérobies.

*Mycobacterium tuberculosis* peut aussi être à l'origine d'épanchement d'ascite lors de tuberculose péritonéale.

La **dialyse péritonéale** ambulatoire constitue un facteur de risque d'infection. Les sujets en cours de dialyse font une infection tous les 6 mois environ. Il s'agit d'une urgence.

Le liquide de la poche de dialyse sera analysé dans les mêmes conditions qu'un liquide d'épanchement. Le plus souvent, la bactérie en cause est un staphylocoque fréquemment multirésistant aux antibiotiques à la suite d'une pression de sélection constante chez ces patients en dialyse.

Le **liquide péricardique** correspond à une accumulation de liquide dans la cavité péricardique.

Un taux de protides $\geq 30$ g/l signe un exsudat avec un taux de leucocytes généralement $> 1000/mm^3$.

Les péricardites sont le plus souvent secondaires à une pneumonie et sont favorisées par l'immunodépression. Les espèces bactériennes les plus fréquemment isolées sont : *S. aureus*, pneumocoque, streptocoques oraux, entérobactéries, *Coxiella burnetii* et les anaérobies. *Mycobacterium tuberculosis* peut aussi être responsable d'une péricardite, avec un épanchement liquidien important.

Une synthèse des principaux germes retrouvés dans ces liquides d'épanchements est présentée dans le tableau 22.1.

## Diagnostic bactériologique direct

### Prélèvement

Les liquides de dialyse péritonéale font partie de la classe A (prélèvements dont le résultat peut modifier le pronostic vital ou fonctionnel du patient) selon le référentiel en microbiologie médicale de la Société française de microbiologie (Rémic) et doivent pouvoir être pris en charge au laboratoire 24 heures sur 24, 7 jours sur 7. Pour les liquides articulaires, pleuraux et péricardiques, ils font partie de la classe C ; ce sont des liquides à traiter sans délai, mais il n'y a pas de notion d'urgence vitale pour la prise en charge du patient.

Les liquides d'épanchement sont des prélèvements précieux car ils sont parfois difficiles à prélever et le

**TABLEAU 22-1**

**Principaux germes retrouvés en fonction des différents épanchements.**

| *Tableau clinique* | *Principaux germes en cause* |
|---|---|
| Pleurésies infectieuses | • *Mycobacterium tuberculosis*<br>• Parmi les non-tuberculeux :<br>– aérobies :<br>- streptocoques dont *S. pneumoniae*<br>- staphylocoques<br>- bacilles à Gram négatif<br>– anaérobies :<br>- cocci : *Veillonella, Prevotella, Peptococcus, Peptostreptococcus*<br>- bacilles : *Bacteroides*, *Fusobacterium*<br>- *Actinomyces, Nocardia* |
| Infections abdominales | • Bacilles à Gram négatif :<br>– aérobies :<br>- *Escherichia coli* : 60 %<br>- *Klebsiella* spp. : 20 %<br>– anaérobies :<br>- *Bacteroides*<br>• Cocci à Gram positif : *Enterococcus* |
| Péricardites | • Pneumocoques, *Streptococcus, Staphylococcus aureus,* entérobactéries<br>• Recherches particulières : *Rhodococcus equi, Legionella, Borrelia, Rickettsia, Mycoplasma, Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques, *Bartonella, Coxiella burnetii, Borrelia burgdoferi*<br>• Sans oublier : virus, champignons, parasites |
| Infections ostéoarticulaires | • Nourrisson/enfant : *S. pyogenes* (groupe A), *staphylococcus aureus,* pneumocoque, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae, Kingella kingae*<br>• Adulte : staphylocoques, streptocoques pneumocoques entérocoques, *Neisseria meningitidis gonorrheae, Pseudomonas* spp., Entérobactéries anaérobies<br>• Recherches particulières : *M. tuberculosis* et mycobacteries atypiques, mais aussi *Brucella*, *Borrelia burgdorfer*, *Mycoplasma*, etc. |

volume recueilli peut être faible ; c'est le cas notamment des ponctions de liquide articulaire. Ces liquides sont prélevés par ponction et doivent être réalisés après asepsie rigoureuse pour éviter les contaminations de l'échantillon par les bactéries de la flore cutanée au point de ponction ; de plus, ils doivent être réalisés de préférence avant toute antibiothérapie. Le mode de prélèvement doit permettre la survie des bactéries anaérobies ; le conditionnement en seringue, dont on a chassé l'air, sera donc préférable. Un ensemencement direct dans des flacons d'hémocultures au lit du malade est possible, surtout si le transport au laboratoire risque d'être différé ; mais une partie de l'échantillon doit être acheminée en parallèle pour pratiquer la cytologie et un examen direct. Des renseignements cliniques doivent accompagner la demande d'analyse bactériologique. Les recherches particulières doivent être mentionnées (*Mycoplasma,* mycobactéries, gonocoque, *Nocardia*, etc.).

Il est impératif de prélever en plus chez le patient deux séries d'hémocultures qui peuvent permettre d'établir l'étiologie bactérienne plus rapidement que la culture du liquide d'épanchement.

Dans le cas des arthrites, il peut être intéressant de réaliser des prélèvements complémentaires cutanés, génitaux, de gorge, pulmonaires, qui seront positifs dans 70 à 90 % des cas.

## Transport, stockage

Les prélèvements doivent être acheminés rapidement au laboratoire (< 30 minutes à température ambiante). Dans la mesure du possible, il est préférable de conserver une aliquote du prélèvement à –80 °C pour rechercher des bactéries spécifiques par biologie moléculaire ou recherche directe de génome bactérien par PCR (ARN 16S).

## Démarches du diagnostic direct

### *Traitement de l'échantillon*

Les liquides seront techniqués sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II pour limiter le risque de contamination de ces prélèvements qui ne peuvent pas être renouvelés.

L'examen macroscopique du prélèvement est important : aspect clair, trouble, hémorragique, purulent, etc.

## Cytologie

Une analyse cytologique quantitative en cellule de Malassez sera effectuée afin de numérer les éléments nucléés et les hématies/mm$^3$. Si la cytologie est supérieure à 100 éléments/mm$^3$, une formule leucocytaire sera effectuée après cytocentrifugation et coloration de May-Grünwald-Giemsa. La cytologie constitue un élément du diagnostic mais aussi de suivi de l'infection. Cette analyse cytologique quantitative sera impossible en cas de prélèvement trop purulent ou de coagulum. Dans ce cas, la cytologie sera appréciée lors de l'examen d'une coloration de Gram.

La recherche de cristaux est pertinente pour les liquides articulaires car des cristaux d'urate (goutte) ou de pyrophosphate de calcium (chondrocalcinose articulaire) peuvent être présents dans des liquides inflammatoires.

L'aspect et la cytologie permettant une orientation diagnostique notamment pour les liquides articulaires et pour les liquides pleuraux sont résumés dans les tableaux 22.2 et 22.3. Pour les liquides de dialyse péritonéale, la cytologie est normalement inférieure à 5 leucocytes/mm$^3$ et il y a une forte probabilité d'infection à partir de 100 leucocytes/mm$^3$ dont 50 % de polynucléaires. Pour les liquides d'ascite, la probabilité d'infection est forte à partir de 200 leucocytes/mm$^3$ et le liquide est macroscopiquement trouble.

## Examen direct

Une coloration de Gram sera effectuée après cytocentrifugation. Cette étape est très importante car elle peut indiquer une orientation diagnostique permettant d'instaurer rapidement une antibiothérapie adaptée.

En cas de quantité insuffisante de liquide pour la cytologie quantitative, la coloration de Gram sur un frottis sur lame sera effectuée et permettra une évaluation semi-quantitative des polynucléaires et des hématies ainsi que la recherche de bactéries.

## Milieux de culture

Du fait de la diversité des bactéries potentiellement isolées de ces liquides, des milieux de culture enrichis seront nécessaires.

Seront ensemencés au moins :

- une gélose au sang incubée en aérobiose ;
- une gélose au sang « chocolat » incubée sous $CO_2$ pour les bactéries de culture difficile ;
- une gélose au sang incubée en anaérobiose ;
- deux flacons d'hémoculture aérobie et anaérobie, ou si la quantité est insuffisante, un milieu liquide d'enrichissement permettant la recherche de bactéries anaérobies (Schaedler, Rosenow, etc.).

Les milieux de culture gélosés seront incubés *au moins* 5 jours et les milieux liquides au minimum 15 jours. L'incubation des géloses peut être prolongée en cas de recherche particulière de germes de culture difficile. Les géloses seront observées sous PSM de type II pour éviter toute contamination des milieux de culture qui viendrait compliquer l'interprétation. Il est aussi possible d'ensemencer en double et de garder un lot de géloses non ouvertes jusqu'au terme de l'incubation totale.

Des recherches particulières seront pratiquées en fonction des orientations cliniques (brucellose, etc.) et de la cytologie (recherche de mycobactéries). La recherche de mycobactéries et plus particulièrement de *M. tuberculosis* se fera par mise en culture sur milieux solides (Löwenstein-Jensen), et si possible sur milieux liquides. L'examen direct après coloration de Ziehl-Nielsen est souvent négatif parce que les prélèvements sont le plus souvent paucibacillaires. La sensibilité de la PCR pour *Mycobacterium tuberculosis* est souvent assez élevée (> 70 %) dans ces liquides d'épanchement. La recherche de brucelles nécessite l'incubation d'un flacon d'hémoculture aérobie pendant au moins 3 semaines. La recherche de *N. gonorrhoeae* requiert une gélose au sang cuit + supplément polyvitaminique rendue sélective par l'addition d'un cocktail antibiotique (géloses VCAT, VCN) et une incubation sous 5 % de $CO_2$.

## Interprétation

Toute bactérie isolée sera considérée comme potentiellement pathogène et fera l'objet d'une identification et d'un antibiogramme. En cas de plusieurs prélèvements pour un même patient, les cultures et antibiogrammes seront réalisés à partir de chaque souche isolée de chaque prélèvement. L'interprétation est parfois plus délicate quand les bactéries isolées sont des commensales de la peau (*Staphylococcus, Propionibacterium, Corynebacterium*, etc.) et peuvent être des contaminants du prélèvement, notamment si les conditions de ponction ont été difficiles (liquides articulaires). Dans ce cas, la répétition de l'isolement des mêmes espèces bactériennes sur plusieurs milieux voire à partir de plusieurs sites (liquide + hémoculture par exemple) ou éventuellement dans des prélèvements répétés (réalisables pour les liquides d'ascite et les liquides de dialyse péritonéale) confortera le clinicien sur la pathogénicité de la ou des bactéries isolées. L'interprétation devra prendre en compte la cytologie, l'examen direct et le résultat des cultures (tableaux 22.2 et 22.3).

Les souches bactériennes isolées doivent absolument être conservées.

## Recherche de constituants bactériens

La recherche de génome bactérien est utile dans ces liquides normalement stériles, notamment pour les bactéries à croissance difficile. Cette recherche se fera par PCR à l'aide d'amorces spécifiques pour rechercher

précisément certaines espèces bactériennes. Il est possible également de rechercher tout génome bactérien en réalisant une PCR ARN 16S. Comme pour tout diagnostic par biologie moléculaire, les prélèvements doivent avoir été effectués avec une asepsie rigoureuse, et avoir été manipulés au laboratoire avec beaucoup de précaution et sous PSM de type II pour éviter toute contamination externe.

En cas de suspicion de maladie de Lyme, la recherche par PCR du génome de *Borrelia burgdorferi*, habituellement, n'est pas pratiquée en routine. Les prélèvements sont alors à adresser au Centre national de référence.

**TABLEAU 22-2**

**Interprétation des liquides articulaires.**

| | *Normal* | *Septique* | *Inflammatoire non bactérien* | *Tuberculose* |
|---|---|---|---|---|
| Aspects | Jaune clair | Trouble | ± trouble | Trouble |
| Coagulation spontanée | – | + | + | + |
| Cristaux | – | – | ± | – |
| Leucocytes (/mm³) | < 200 | > 2000 à 50 000 | 2000 à 50 000 | Environ 5000 |
| Polynucléaires (%) | < 25 | > 80 | Environ 50 | 50 |
| Examen direct | – | + | – | + (Ziehl) |
| Protéine (g/l) | < 20 | > 50 | > 50 | > 50 |

**TABLEAU 22-3**

**Interprétation des liquides pleuraux.**

| *Aspect* | *Clair citrin* | *Clair citrin* | *Louche* | *Purulent* | *Hémorragique* |
|---|---|---|---|---|---|
| Leucocytes par mm³ | < 500 | > 500 | > 500 | > 2000 souvent > 10 000 | – |
| Lymphocytes | + | +++ (> 70 %) | ± | Rares | + |
| Neutrophiles | + | Rares | +++ | +++++ (> 90 %) | + |
| Examen direct | – | – | – | +++ | ± |
| Cultures | Négatives | BK | Quelquefois positives | Positives | ± BK : ± |
| Protéines (g/l) | < 30 | > 30 | > 30 | > 50 | > 30 |
| Interprétation | Transsudat | Exsudat Tuberculose | Exsudat Pleurésie parapneumonique (réaction pleurale secondaire à une infection pulmonaire) | Exsudat Empyème | Exsudat |

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Grencher T, Jeanne G. Biologie des liquides d'épanchement. Grenoble : bioMérieux ; 2006.

Groupe Rémic de la Société française de microbiologie. Examen bactériologique des suppurations closes et des séreuses – Diagnostic microbiologique des infections osseuses et articulaires – Continuité des soins en microbiologie. In : Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie). Société Française de Microbiologie ; 2010.

CHAPITRE

# 23 Prélèvements de la sphère oropharyngée

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen

Les infections de la sphère ORL regroupent les atteintes des voies aériennes supérieures, c'est-à-dire le nez, la gorge et les oreilles.

## Prélèvements pharyngés

### Contexte clinique

L'oropharynx est colonisé par de nombreuses populations bactériennes commensales voisines de celles de la bouche ou du nez. La présence des formations lymphoïdes des amygdales et du pharynx (végétations), constituant l'anneau de Waldeyer, augmente les moyens de défense locaux antibactériens.

L'angine est une infection douloureuse et fébrile des amygdales voire de l'ensemble du pharynx. La majorité des angines est d'origine virale.

L'angine peut être isolée ou peut accompagner une pathologie dont elle constitue l'un des symptômes, souvent le premier (grippe, rougeole, oreillons, mononucléose infectieuse, scarlatine, rhumatisme articulaire aigu, etc.).

On distingue trois types d'angines à germes spécifiques :

- l'angine érythémateuse ou érythémato-pultacée due aux streptocoques β-hémolytiques (le plus fréquent étant le streptocoque du groupe A) ;
- l'angine pseudomembraneuse due au bacille de la diphtérie (*Corynebacterium diphtheriae*), très rare dans nos régions ;
- l'angine ulcéronécrotique de Vincent due à l'association fusospirillaire.

Le streptocoque β-hémolytique du groupe A (SGA) est le premier agent bactérien en cause dans l'angine, mais l'angine streptococcique ne représente que 25 à 40 % des angines de l'enfant et 10 à 25 % des angines de l'adulte. Son pic d'incidence se situe entre 5 et 15 ans. Les angines à SGA évoluent le plus souvent favorablement en 3 à 4 jours, même en l'absence de traitement antibiotique. Cependant, elles peuvent donner lieu à des complications potentiellement graves (syndromes poststreptococciques : rhumatisme articulaire aigu [RAA]), glomérulonéphrite aiguë (GNA), et complications septiques locorégionales dont la prévention justifie la mise en œuvre d'une antibiothérapie.

La culture du prélèvement pharyngé est en pratique peu réalisée en France ; son résultat est obtenu dans un délai de 1 à 2 jours. Les tests de diagnostic rapide (TDR), réalisables par le praticien, sont recommandés (fig. 23.1). Ces tests ont une spécificité de 95 % et, pour les tests les plus récents, une sensibilité avoisinant 90 %. Les résultats sont disponibles en 5 minutes environ.

Il est ainsi recommandé, devant une angine érythémateuse ou érythémato-pultacée, de pratiquer un TDR chez tous les enfants à partir de 3 ans et chez les adultes. Chez le nourrisson et l'enfant de moins de 3 ans, la pratique de TDR est habituellement inutile, les angines observées à cet âge étant généralement d'origine virale, et le streptocoque est plus rarement en cause. De plus, il n'y a pas de RAA décrit avant l'âge de 3 ans.

- Un TDR positif, confirme l'étiologie à SGA, et justifie la prescription d'antibiotiques.
- Un TDR négatif chez un sujet sans facteur de risque de RAA ne justifie pas de contrôle supplémentaire systématique par culture, ni de traitement antibiotique.

Certaines situations rares (exceptionnelles en métropole) évoquent un contexte à risque de RAA :

- antécédents personnels de RAA ;
- âge compris entre 5 et 25 ans associé à la notion de séjours en régions d'endémie de RAA (Afrique, DOM-TOM) ou éventuellement à certains facteurs environnementaux (conditions sociales, sanitaires et économiques, promiscuité, collectivité fermée) ou à des antécédents d'épisodes multiples d'angine à SGA.

Dans un contexte à risque de RAA, un TDR négatif doit être contrôlé par une mise en culture ; si la culture est positive, le traitement antibiotique sera entrepris.

Le prélèvement de gorge reste indiqué pour les patients allergiques aux β-lactamines et susceptibles d'être traités par les macrolides afin de vérifier la sensibilité de la souche à ces antibiotiques.

D'autres contextes peuvent justifier le recours à un prélèvement de gorge : angine récidivante, angine ulcéronécrotique, angine à fausses membranes, candidose oropharyngée, bilan initial d'une maladie sexuellement transmissible (MST).

Dans un certain nombre d'autres situations, le prélèvement de gorge est sans intérêt :

- phlegmon de l'amygdale, puisqu'il s'agit d'une collection fermée ;
- épiglottite principalement due à *Haemophilus influenzae* (diagnostic par hémocultures), au cours de laquelle le prélèvement de gorge est à proscrire parce que dangereux. Depuis la vaccination vis-à-vis de *Haemophilus influenzae* b, cette pathologie a presque disparu ;

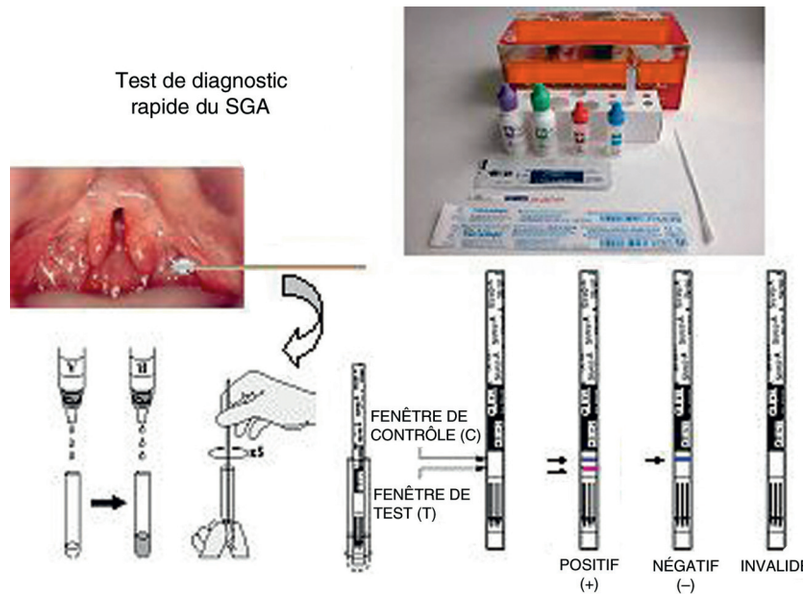



Fig. 23.1. – *Réalisation d'un TDR.*

- syndrome de Lemierre, infection exceptionnelle due à *Fusobacterium necrophorum* dont le diagnostic étiologique est effectué par hémoculture ou par ponction pleurale.

## Prélèvements de gorge

L'examen doit être pratiqué en éliminant au maximum les contaminations salivaires. Il faut tout d'abord abaisser la langue (non tirée) pour bien voir l'oropharynx et les amygdales, puis frotter l'écouvillon sur la surface de chaque amygdale, sur la muqueuse pharyngée et sur toute surface d'aspect pathologique. L'écouvillon est ensuite replacé dans un tube stérile ou, mieux, dans un tube contenant un milieu conservateur (type Portagerm®). En outre, pour la recherche directe du bacille de la diphtérie ou de l'association fusospirillaire, un second écouvillon servira à faire des étalements immédiats sur lames.

## Recherche des streptocoques du groupe A

Cette recherche est facile à réaliser. Après avoir déchargé l'écouvillon dans 0,5 ml d'eau distillée stérile, une gélose au sang frais est ensemencée et mise en incubation à 37 °C de préférence en atmosphère anaérobie ou sous $CO_2$. L'anaérobiose permet une meilleure mise en évidence de la β-hémolyse.

Après 24 heures, l'identification des streptocoques commence par l'observation de la taille des colonies (très petites) entourées d'un halo d'hémolyse totale dite β, significative de la présence d'hémolysine (streptolysine) qui est un facteur de virulence de la bactérie. L'hémolyse permet de classer les streptocoques en streptocoques non hémolytiques, α-hémolytiques et β-hémolytiques.

La coloration de Gram sur les colonies montre des cocci à Gram positif, en chaînettes (fig. 23.2).

Après avoir vérifié l'absence de catalase (en prenant une parcelle de la surface de la colonie), on effectue un sérogroupage selon la méthode de Lancefield. Le typage du polyoside C (après extraction enzymatique ou chimique et agglutination avec des particules de latex recouvertes d'anticorps de groupe dirigés contre le polyoside C) permet de classer les streptocoques β-hémolytiques en groupes A, B, C, G qui sont les plus pathogènes (fig.23.3).

Tous les streptocoques du groupe A sont sensibles à la pénicilline. La réalisation de l'antibiogramme est indispensable en raison de l'augmentation de la prévalence de la résistance aux macrolides en France, de l'ordre de 16 à 31 %. Cette résistance aux macrolides in vitro peut être à l'origine d'échecs d'éradication.

L'antibiogramme est réalisé sur milieu de Mueller-Hinton au sang incubé 24 heures sous $CO_2$, conditions qui peuvent altérer l'activité des macrolides, en raison de l'acidification du milieu liée au $CO_2$ En effet, l'acidité des

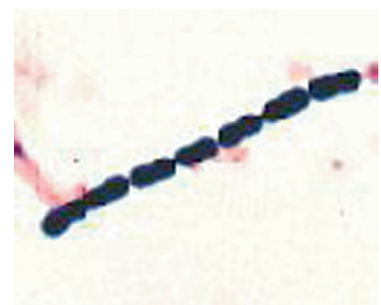


Fig. 23.2. – *Cocci à Gram positif, en chaînettes.*

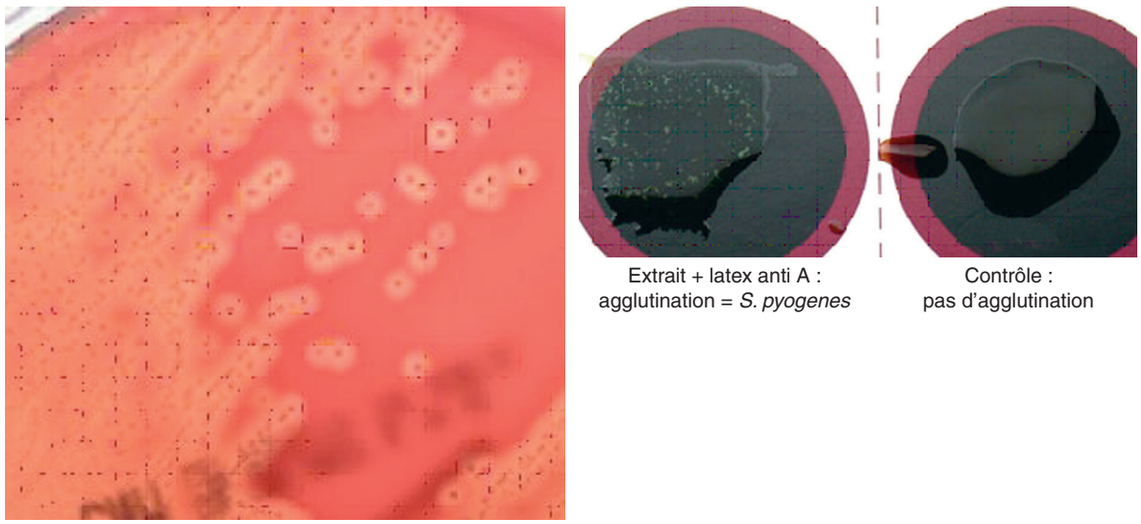



**Fig. 23.3.** – *À partir de colonies β hémolytique, technique de sérogroupage : 1 goutte d'anticorps anti-A, 1 goutte de la colonie de streptocoque traitée par l'enzyme d'extraction → agglutination → streptocoque A, B, C, etc.).*

milieux a un effet important. À pH 6, les macrolides sont 4 à 16 fois moins actifs qu'à pH 7. Cet effet est particulièrement marqué pour l'azithromycine (CMI × de 16 à 32 fois) puis, par ordre décroissant, pour l'érythromycine (× 16 fois), la clarithromycine (× 16 fois), la roxithromycine (× 8 fois) et la josamycine (× 4 fois). Les macrolides, à l'exception de la josamycine, sont 2 à 8 fois plus actifs à pH 8. Cet effet pH est apparu dépendant du pKa du groupe basique des macrolides (8,6 pour l'érythromycine, 8,4 pour l'azithromycine et 9,2 pour la roxithromycine) permettant qu'à pH 8 le macrolide non ionisé traverse plus facilement la membrane cytoplasmique que le macrolide ionisé à pH 6. Cela explique en grande partie l'effet de l'incubation sous $CO_2$ qui conduit à une acidification de milieux et à une diminution de l'activité des macrolides quelle que soit la méthode utilisée. L'augmentation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des macrolides est alors de 2 à 32 fois avec la même hiérarchie que celle rapportée plus haut. Cet effet existe aussi pour la télithromycine.

L'addition de sang aux milieux de culture n'affecte que peu l'activité des macrolides, entraînant plutôt une diminution des CMI d'une dilution du fait d'une légère alcalinisation des milieux. L'addition de sérum de cheval ou de poulain a un effet similaire (diminution de 4 à 8 fois de la CMI de l'érythromycine en présence de 50 % de sérum de cheval).

L'effet inoculum est modéré avec une augmentation de 2 fois des CMI des macrolides pour une augmentation de 2 log 10 du nombre de bactéries par ml.

En pratique, aussi bien pour la détermination des CMI que pour l'étude en routine de la sensibilité aux macrolides, l'incubation sous $CO_2$ est à éviter. Le Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM) (www.sfm.asso.fr) recommande une incubation sous air ambiant pour les streptocoques et pneumocoques. L'incubation sous atmosphère enrichie en $CO_2$ ne se pratique que pour les souches ne cultivant pas sans ces conditions.

## Recherche de l'association fusospirillaire

Cette recherche est motivée par la suspicion d'une angine de Vincent (ulcéronécrotique).

Le prélèvement est étalé sur lame, coloré au Gram, au bleu de méthylène ou à la fuschine diluée. On observe un foisonnement de formes fusiformes et de spirochètes. La culture n'est pas réalisée (fig. 23.4).

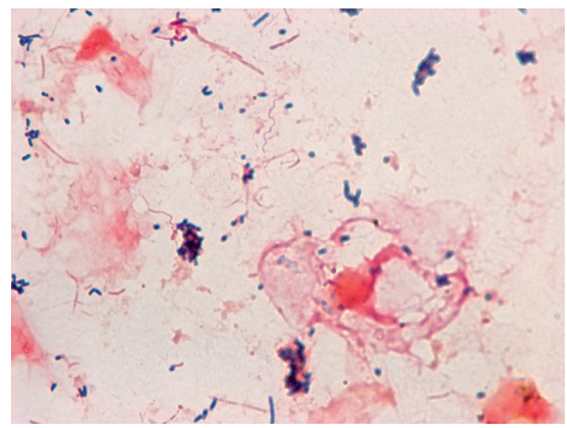


**Fig. 23.4.** – *Frottis d'un prélèvement de gorge montrant une association fusospirillaire (angine de Vincent).*

### Recherches particulières

Des recherches particulières ne sont effectuées que si elles sont cliniquement motivées.

- *Angine avec rash cutané :* la mise en évidence d'*Arcanobacterium haemolyticum* (bacille à Gram positif corynéforme) peut se faire sur la gélose au sang. Il faut prolonger l'incubation de 24 à 48 heures supplémentaires pour détecter une zone d'hémolyse β, franche mais de petite taille, autour de petites colonies dont l'aspect évoque celui d'un streptocoque.
- *Phlegmon de l'amygdale et abcès pharyngés :* examen cytobactériologique du produit de la ponction évacuatrice avec recherche de *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. aureus*, anaérobies (*Fusobacterium* spp., *B. fragilis*, *Peptostreptococcus* spp.). La mise en culture en anaérobiose est obligatoire. On recommande de faire simultanément des hémocultures.
- *Méningocoque :* la recherche ne se fait qu'à titre épidémiologique, et utilise les milieux sélectifs des *Neisseria*.
- *N. gonorrhoeae :* ils peuvent être cause de pharyngites ; le prélèvement sera mis en milieu de transport (si nécessaire) et traité tout comme un pus urétral – gélose chocolat enrichie en mélange polyvitaminique additionnée d'un mélange inhibiteur (type VCAT) et incubée sous 10 % de $CO_2$.
- *C. diphtheriae* : milieu de Loeffler ou milieu de Tinsdale modifié.

## Prélèvements auriculaires

### Contextes cliniques

#### Otites moyennes aiguës (OMA) de l'enfant et de l'adulte

L'OMA purulente correspond à la surinfection bactérienne de l'oreille moyenne, avec présence d'un épanchement purulent ou mucopurulent dans la caisse du tympan.

La paracentèse reste indiquée dans les cas suivants :

- en première intention, systématiquement, chez le nourrisson de moins de 3 mois ;
- en deuxième intention en cas de persistance d'une fièvre importante, de douleurs violentes ou de troubles digestifs majeurs ;
- en cas d'échec de l'antibiothérapie.

La paracentèse doit alors systématiquement s'accompagner d'un examen cytobactériologique du prélèvement, en raison de l'évolution actuelle des résistances aux antibiotiques des principales bactéries en cause.

Dans le cas d'une otorrhée spontanée après rupture de la membrane tympanique au cours d'une OMA, l'écoulement purulent doit faire l'objet d'une étude cytobactériologique après désinfection du conduit auditif externe.

L'association d'une conjonctivite à une OMA évoque le syndrome otite-conjonctivite dont l'étiologie bactérienne retrouve *H. influenzae* dans 70 % des cas.

#### Otites chroniques de l'adulte

En raison de la diversité des bactéries en cause dans ces pathologies, le recours à l'examen cytobactériologique de l'otorrhée mucopurulente est justifié.

#### Otites externes

Il s'agit d'une infection cutanée ou sous-cutanée du conduit auditif externe. Les situations au cours desquelles l'examen cytobactériologique doit s'envisager ne sont pas parfaitement codifiées : échecs du traitement local, lorsqu'un traitement par voie générale est prévu, otite maligne externe. La décision est souvent prise en fonction de l'expérience personnelle du clinicien.

### Épidémiologie des germes

#### Paracentèse ou otorrhée spontanée au cours d'une OMA

- Chez l'enfant de plus de 3 mois et l'adulte : *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Moraxella (Branhamella) catarrhalis, Staphylococcus aureus, Alloiococcus otitidis, Turicella otitidis*.
- Chez le nourrisson de moins de 3 mois : *Pseudomonas aeruginosa*, entérobactéries (*E. coli*, *Proteus mirabilis*), mêmes bactéries que chez les plus de 3 mois.

En France, *H. influenzae* est le premier germe responsable d'otite, suivi de *S. pneumoniae* qui, lui, est le premier germe retrouvé lors d'un échec de traitement de l'otite. La prescription du vaccin pneumococcique conjugué est susceptible de modifier l'épidémiologie des OMA en favorisant l'émergence d'*H. influenzae* ou de certains sérotypes non vaccinaux de *S. pneumoniae.*

#### Otite chronique

On retrouve : *P. aeruginosa*, entérobactéries (*E. coli*, *P. mirabilis*), *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, anaérobies.

#### Otite externe

On retrouve : *P. aeruginosa*, entérobactéries (*E. coli, P. mirabilis*), *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, anaérobies, *Candida* spp., *Aspergillus* spp.

### Prélèvement

#### Pus de paracentèse

Le prélèvement est effectué par l'ORL, après nettoyage du conduit auditif externe puis incision du tympan, à l'aide d'un cathlon monté sur seringue ou d'écouvillons fins (alginate ou Dacron®) montés sur tige métallique. Si l'acheminement du prélèvement au laboratoire et/ou son analyse ne peuvent être immédiats, il est préférable d'utiliser deux écouvillons dont l'un est immédiatement placé en milieu de transport (type Stuart ou Amies) et l'autre utilisé pour réaliser un étalement sur lame.

### *Otites chroniques*

Le prélèvement est en général effectué à l'aide de deux écouvillons fins (alginate ou Dacron® montés sur tige métallique), l'un servant à réaliser extemporanément un étalement sur lame, l'autre étant destiné à la mise en culture. Si celle-ci doit être différée de plus de 2 heures, l'utilisation d'un milieu de transport est nécessaire (voir ci-dessus). Dans le cas d'une otite chronique, l'utilisation d'un milieu de transport pour bactéries anaérobies s'impose si la mise en culture n'est pas immédiate.

### *Otites externes*

On élimine les débris et croûtes présents dans le conduit auditif à l'aide d'un premier écouvillon en coton humide, puis deux écouvillonnages successifs sont réalisés, l'un pour l'étalement sur lame et l'autre pour la mise en culture.

## Examen direct

L'examen microscopique après coloration de Gram peut fournir, notamment dans le cas d'un pus de paracentèse, un diagnostic d'orientation intéressant à communiquer rapidement au clinicien.

## Mise en culture

Les milieux sont choisis en fonction du contexte clinique.

### *OMA*

- Gélose au sang incubée sous 10 % de $CO_2$ ou en anaérobiose.
- Gélose au sang cuit ou gélose chocolat enrichie en mélange polyvitaminique incubées en atmosphère renfermant 10 % de $CO_2$.
- Gélose sélective des bacilles à Gram négatif dans le cas des nourrissons de moins de 3 mois ou en fonction d'une orientation particulière à l'examen direct.
- Bouillon de type cœur-cervelle enrichi extemporanément à l'extrait globulaire.

### *Otites chroniques et otites externes*

- Géloses au sang avec et sans mélange inhibiteur, incubées sous 10 % de $CO_2$ ou en anaérobiose.
- Gélose permettant la croissance des anaérobies et incubée en anaérobiose.
- Gélose sélective des bacilles à Gram négatif.
- Milieu de Sabouraud incubé entre 22 et 30 °C.

## Interprétation, antibiogramme

Dans le cas d'un pus prélevé par paracentèse, il n'y a pas a priori de problème d'interprétation. Il en va de même, quelle que soit la nature du prélèvement, lors de l'isolement d'*H. influenzae*, *S. pneumoniae* ou *M. catarrhalis* qui n'appartiennent pas à la flore du conduit auditif externe.

En revanche, dans le cas où le prélèvement est effectué par écouvillonnage, il est plus difficile d'affirmer le rôle pathogène des autres micro-organismes qui peuvent être des commensaux du conduit auditif externe. On aura tendance à attribuer un rôle pathogène potentiel aux micro-organismes prédominants ou isolés de façon itérative.

De pouvoir pathogène récemment reconnu, la présence d'*Alloiococcus otitidis* (cocci à Gram positif se développant en 4 à 5 jours sur milieux au sang) et de *Turicella otitidis* (bacille à Gram positif corynéforme se développant en 48 heures sur milieux au sang) doit être signalée dans les otites moyennes. Les otites plurimicrobiennes ne sont pas rares, en particulier les otites chroniques et les otites externes.

# Prélèvements nasal et rhinopharyngé, pus de sinus

## Contexte clinique et épidémiologie des germes responsables

Chez l'adulte, la sinusite aiguë purulente correspond à une infection d'une ou de plusieurs cavités sinusiennes par des bactéries.

L'examen clinique est souvent limité à l'observation d'une rhinorrhée purulente (antérieure et/ou postérieure, souvent unilatérale) et d'une douleur à la pression en regard de la cavité sinusienne infectée. En effet, la sinusite maxillaire d'origine dentaire est un cas particulier. Les sinusites frontales et les autres localisations plus rares (ethmoïdale, sphénoïdale) ne doivent pas être méconnues du fait d'un risque plus élevé de complications. Des signes cliniques faisant suspecter une sinusite compliquée (syndrome méningé, exophtalmie, œdème palpébral, troubles de la mobilité oculaire, douleurs insomniantes) imposent l'hospitalisation, les prélèvements bactériologiques, l'imagerie et l'antibiothérapie parentérale urgente.

Chez l'enfant, la sinusite aiguë purulente succède le plus souvent à une infection virale, mais la possibilité d'une surinfection bactérienne incite à discuter l'antibiothérapie, surtout dans certaines localisations.

La sinusite maxillaire est la plus fréquente et s'observe le plus souvent chez l'enfant de 3 ans et plus. Il est indispensable de la différencier d'une inflammation sinusienne (rhinosinusite congestive) pouvant accompagner la rhinopharyngite virale ou lui succéder, celle-ci ne nécessitant pas d'antibiothérapie. Les sinusites frontales s'observent surtout chez le grand enfant (> 10 ans) et n'ont pas de spécificité par rapport à celles observées chez l'adulte. Comme chez l'adulte, les complications peuvent être graves (en particulier, les complications ophtalmologiques et neurologiques).

L'ethmoïdite extériorisée aiguë (fièvre associée à un œdème palpébral supéro-interne douloureux) touche le jeune enfant. Elle est rare mais de pronostic grave. Il en est de même pour l'infection purulente du sinus sphénoïdal (céphalées rétro-orbitaires intenses et permanentes)

**TABLEAU 23-1**

**Germes les plus fréquents au niveau des sinus et des fosses nasales dans un contexte infectieux.**

| | |
|---|---|
| Pus de fosses nasales (sinusite, parfois rhinopharyngite) | *H. influenzae*<br>*S. pneumoniae,*<br>*Moraxella (Branhamella) catarrhalis*<br>*S. aureus* |
| Prélèvement de fosses nasales dans le bilan d'une staphylococcie récidivante | *S. aureus* |
| Sinusite aiguë | – Chez l'enfant :<br>*H. influenzae,*<br>*S. pneumoniae*<br>– Chez l'adulte :<br>*H.influenzae,*<br>*S. pneumoniae,*<br>*M. catarrhalis,*<br>*S. aureus,* anaérobies,<br>*Streptococcus pyogenes* (groupe A) |
| Sinusite chronique | Idem sinusite aiguë<br>+ bacilles à Gram négatif aérobies<br>+ anaérobies (*Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp.)<br>+ *Aspergillus* spp. |
| Suspicion de coqueluche | *Bordetella pertussis* |

qui touche le grand enfant. Ces localisations doivent faire l'objet d'une antibiothérapie parentérale en urgence.

Les germes les plus souvent rencontrés figurent dans le tableau 23.1.

## Prélèvement

L'aspiration de pus de sinus au méat moyen est réalisée par l'ORL. Dans les autres cas, le prélèvement est effectué par écouvillonnage.

Un milieu de transport permettant notamment la survie des bactéries anaérobies (type Amies) est à prévoir si la mise en culture ne peut être effectuée dans un délai de moins de 2 heures.

## Examen direct

L'examen microscopique après coloration de Gram peut fournir, notamment dans le cas d'un pus de sinusite, un diagnostic d'orientation intéressant pour le clinicien.

## Mise en culture

### *Pus de sinus ou de fosses nasales*

La procédure est la suivante :

- gélose au sang avec et/ou sans mélange inhibiteur, incubée sous 10 % de $CO_2$ ou en anaérobiose ;
- gélose permettant la croissance des anaérobies et incubée en anaérobiose, notamment dans le cas des pus de sinusite chronique prélevés par aspiration au méat moyen ;
- gélose au sang cuit ou gélose chocolat enrichie en mélange polyvitaminique incubée en atmosphère 10 % de $CO_2$ ;
- gélose sélective des bacilles à Gram négatif, notamment dans le cas des pus de sinusite chronique ;
- bouillon de type cœur-cervelle enrichi extemporanément à l'extrait globulaire ;
- milieu de Sabouraud incubé entre 22 ° et 30 °C à conserver 15 jours au maximum.

### *Bilan d'une staphylococcie récidivante*

La mise en culture requiert une gélose ordinaire ou une gélose sélective de type Chapman à la recherche de *S. aureus.* La recherche de facteurs de virulence pourra ensuite être réalisée par amplification génique.

### *Recherche de* B. pertussis

La coqueluche représente la première cause de mortalité infectieuse communautaire chez le nourrisson entre 10 jours de vie et 2 mois, et la troisième cause de mortalité infectieuse communautaire tous âges confondus (13 %) après le méningocoque (34 %) et le peumocoque (28 %).

L'aspiration nasopharyngée constitue le meilleur prélèvement en cas de suspicion de coqueluche :

- pour une culture sur Gélose de Bordet-Gengou préparée extemporanément et incubée sous 10 % de $CO_2$. Cette méthode présente une sensibilité de 50 à 60 % dans la 1re semaine de toux, de 0 % après 3 à 4 semaines de toux et de 0 % après 5 jours d'antibiothérapie adaptée. La culture est lente (3 à 7 jours). Elle est très importante sur le plan épidémiologique. Attention : *B. pertussis* est un germe extrêmement fragile qui nécessite un acheminement immédiat du prélèvement (urgent) ;
- pour une recherche par amplification génique de gènes spécifiques de *B. pertussis* après extractions des acides nucléiques à partir d'une aspiration nasopharyngée, dont les avantages sont :
  - conservation possible du prélèvement à 4 °C ou –20°C (analyse différée) ;
  - sensibilité > 90 % ;
  - positivité sous traitement.

## Interprétation et antibiogramme

Les prélèvements sont souvent plurimicrobiens, rendant l'interprétation difficile.

Dans le cas d'un pus de sinusite prélevé par aspiration au méat moyen, il n'y a pas a priori de problème d'interprétation, bien qu'il puisse exister un certain degré de contamination du prélèvement par les bactéries des fosses nasales.

Dans les autres cas, il peut être difficile, pour les espèces pathogènes opportunistes qui appartiennent à la flore

commensale du rhinopharynx, de leur attribuer un rôle pathogène certain. L'interprétation du résultat sera faite en fonction du contexte clinique et en fonction de la quantité de bactéries isolées.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Antibiothérapie par voie générale en pratique courante en oto-rhino-laryngologie et en pneumologie – Recommandations de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. octobre 2005.

Référentiel en microbiologie médicale, Diagnostic microbiologique des infections ORL, p. 129–134. SFM, édition ; 2010.

CHAPITRE

24

# Infections oculaires

F. Denis, M.-C. Ploy, M. Mounier

## Introduction

La bactériologie des infections de l'œil a évolué durant ces dernières années grâce à l'amélioration des techniques d'isolement et d'identification des agents pathogènes potentiels par des méthodes traditionnelles, mais aussi grâce à de nouvelles techniques recherchant antigènes ou génome. Les techniques de biologie moléculaire, antérieurement utilisées sur d'autres prélèvements, sont également applicables aux prélèvements oculaires et sont susceptibles d'améliorer les performances du diagnostic.

Il est essentiel de connaître les bactéries impliquées dans les différentes infections oculaires afin d'adapter les méthodes de recherche en fonction de leurs particularités : fragilité, exigences de culture, caractéristiques antigéniques et génomiques, etc.

Les liquides endoculaires (humeur aqueuse et vitré, etc.) sont stériles, contrairement à la surface de l'œil qui possède une flore résidente commensale qu'il ne sera pas toujours facile de distinguer de la flore « pathogène ».

## Rappel anatomoclinique

On oppose, en fonction de la localisation anatomique (fig. 24.1), les infections superficielles dont les plus courantes sont représentées par les conjonctivites le plus souvent bénignes, et les infections intraoculaires, les endophtalmies qui peuvent être gravissimes.

Mais, selon la localisation et l'aspect clinique, de nombreuses autres infections d'étiologie bactérienne peuvent être retrouvées au niveau de l'œil telles que les blépharites, les canaliculites, les cellulites, les dacryoadénites, les dacryocystites, les érysipèles, etc.

### Principales bactéries responsables d'infections oculaires superficielles

Certaines espèces bactériennes sont retrouvées plus fréquemment que d'autres, avec des variations, selon l'âge des patients.

En période néonatale, *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* occupent une place dominante. L'infection gonococcique est rare en France grâce aux instillations prophylactiques systématiques ; l'infection à *C. trachomatis* est non négligeable, variant de 1 à 12 % selon les centres.

Chez le nourrisson et l'enfant, *Haemophilus influenzae* occupe une place importante, surtout avant l'âge de 3 ans, mais *Streptococcus pyogenes* et *S. pneumoniae*, de même que *Branhamella catarrhalis* peuvent aussi être rencontrés.

Chez l'adulte, *Staphylococcus aureus*, *Branhamella catarrhalis*, *S. pneumoniae* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées ; les autres streptocoques, les entérobactéries et les *Moraxella*, *Acinetobacter* et *Haemophilus* sont isolés plus rarement.

Dans les kératites, *S. aureus* et *S. epidermidis* sont les principaux agents (27 %), les autres bactéries à Gram positif – cocci : streptocoques (14,5 %) ou bacilles : corynébactéries ou autres (10 %) – occupent aussi une place importante. Parmi les bactéries à Gram négatif, *Neisseria* et *Branhamella* occupent une place restreinte (0,5 %), presque à égalité avec *Haemophilus*, la plus grande part revenant aux entérobactéries (12 %) et surtout aux *Pseudomonas* (29 %). La place de *C. trachomatis* est aussi sous-estimée dans les kératites ; cette espèce serait responsable d'au moins 4 % des kératites bactériennes.

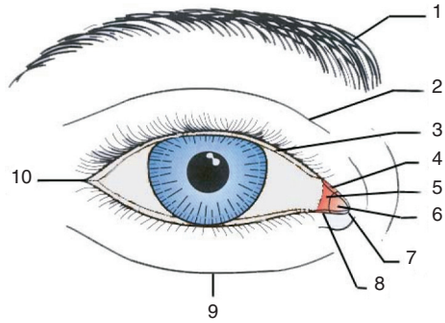
Certaines étiologies ont été longtemps occultées ; ainsi, des tuberculoses oculaires (uvéites notamment) seraient retrouvées dans 0,6 à 10,5 % des tuberculoses.

La nature des espèces bactériennes en cause varie selon que le patient est ou non porteur de lentilles, le port de lentilles favorisant l'infection par les bacilles à Gram négatif (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*).

Rappelons que le trachome dû à *C. trachomatis* (sérovars A, B, Ba et C) est responsable de conjonctivites trachomateuses qui évoluent en quatre stades allant de la conjonctivite folliculaire avec surinfection bactérienne fréquente à l'ulcère cornéen et l'uvéite. Cette maladie endémique sévit en zone intertropicale et est rarement évoquée sous nos latitudes. Les souches de *C. trachomatis* retrouvées en France dans les conjonctivites ou kératites appartiennent aux sérovars D, E, F, G, H, I, J et K.

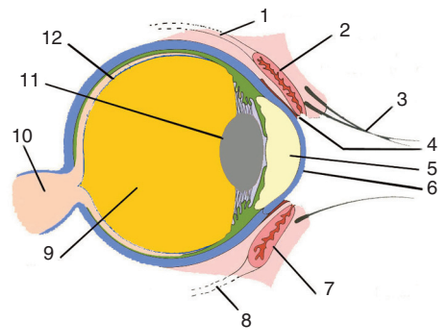
### Agents des endophtalmies bactériennes

On distingue les endophtalmies postopératoires, les endophtalmies exogènes opératoires et post-traumatiques avec ou sans corps étranger et les endophtalmies endogènes. Les infections postopératoires sont heureusement rares. Les publications récentes font état de taux d'infection allant de 0,28 à 0,5 %. L'incidence de l'infection oculaire est de l'ordre de 0,32 % après chirurgie réglée et de 2,8 % après plaie du globe oculaire. La répartition des germes révèle la place importante des bactéries à Gram positif et de *S. epidermidis* tout particulièrement ;




Aspect externe des paupières

1 : sourcil
2 : sillon palpébral supérieur
3 : bord libre de la paupière supérieure
4 : papille lacrymale supérieure
5 : pli semi-lunaire
6 : caroncule lacrymale
7 : angle interne
8 : papille lacrymale inférieure
9 : sillon palpébral inférieur
10 : angle latéral




Aspect anatomique de l'œil

1 : septum orbital
2 : plateau tarsal supérieur contenant les glandes de Mebomius (infection de ces glandes = chalazion)
3 : cils (infection des glandes adjacentes = orgelet)
4 : conjonctive
5 : humeur aqueuse
6 : cornée
7 : plateau tarsal inférieur
8 : septum orbital
9 : humeur vitrée
10 : nerf optique
11 : cristallin
12 : rétine

**Fig. 24.1.** – *Rappel anatomique concernant l'œil.*

de même, une progression de la fréquence des infections à steptocoques-entérocoques est signalée. Dans les endophtalmies postchirurgicales, *Pseudomonas aeruginosa* occupe une place importante.

## Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique est essentiellement un diagnostic direct, reposant classiquement sur la mise en évidence des bactéries par examen direct et culture mais aussi par mise en évidence de constituants bactériens spécifiques (génomes, antigènes).

Le diagnostic indirect sérologique a beaucoup moins d'intérêt, les infections bactériennes induisant rarement une réponse immune importante et les sérologies étant assez peu spécifiques.

### Infections superficielles

#### *Prélèvements*

Les prélèvements doivent être effectués avant tout traitement local ou général (antiseptique ou antibiotique) et avant toute toilette oculaire depuis plusieurs heures. Dans le cas de patient recevant un tel traitement, celui-ci doit être suspendu depuis au moins 24 heures. Les prélèvements de conjonctive ou de cornée peuvent être effectués :

- soit avec un coton monté très serré, stérile, en présentation unitaire ;
- soit avec une spatule en platine de Kimura préalablement stérilisée, puis refroidie avant l'usage.

Dans le cas de prélèvements pour conjonctivite, un frottement doux de la conjonctive inférieure est effectué en partant de l'angle externe pour aboutir à l'angle interne de l'œil où l'on récupère la sécrétion.

Dans le but de diagnostiquer une infection à *Chlamydia*, il est indispensable de recueillir de nombreuses cellules, car il s'agit d'une bactérie à développement intracellulaire. Les conjonctives sont raclées prudemment soit avec des écouvillons en plastique imprégnés d'alginate, soit avec du matériel ophtalmologique. La qualité du prélèvement conditionne celle des résultats.

Les prélèvements doivent être acheminés rapidement au laboratoire (moins de 2 heures) pour mise en culture, même si des frottis ont été réalisés sur place au lit du malade ; ils ne doivent pas arriver desséchés au laboratoire ; il ne faut pas non plus les noyer en plaçant l'écouvillon dans un volume important de sérum physiologique. Le recours à des milieux de transport généraux (Portagerm®, eSwab®

etc.) ou spécifiques pour *C. trachomatis* est nécessaire si le prélèvement n'est pas réalisé au laboratoire. De même, il faut recourir à des milieux de transports spécifiques si on veut réaliser différents tests immuno-enzymatiques à la recherche d'antigènes bactériens et pour certaines techniques de biologie moléculaire.

## Diagnostic direct

L'examen cytobactériologique du frottis avec coloration au May-Grünwald-Giemsa permet de caractériser les éléments cellulaires présents : polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles, lymphocytes, monocytes, cellules épithéliales. Il constitue un élément d'orientation étiologique non négligeable. La coloration de Gram permet de préciser l'absence ou la présence de bactéries et d'évoquer tel ou tel genre bactérien, *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Corynebacterium*, etc.

La mise en culture nécessite l'emploi en routine de milieux riches (trypticase-soja, Mueller-Hinton, gélose au sang, etc.) et de milieux pour bactéries exigeantes (gélose «chocolat» additionnée de facteurs de croissance) qui seront incubés à 37 °C en atmosphère enrichie en $CO_2$. Des milieux solides et liquides pour la recherche de bactéries anaérobies seront aussi utilisés. Les milieux seront observés pendant 3 à 5 jours. Une quantification des germes présents au niveau conjonctival permet, selon Cagle, d'évaluer l'imputabilité des différentes espèces (tableau 24.1).

Même si ces critères sont critiquables, ils sont souvent utilisés.

L'identification repose sur la morphologie des germes et sur leur galerie d'identification (caractères respiratoires, exigences nutritionnelles, métaboliques glucidiques, protéiques, etc.), l'antibiogramme complétant l'identification.

Dans le cas particulier de *C. trachomatis,* on ne peut pas utiliser, comme pour les autres bactéries, des milieux synthétiques ; leur culture nécessite l'inoculation de cultures cellulaires MacCoy, HeLa 229, etc. La sensibilité de la culture cellulaire a été améliorée en bloquant la prolifération cellulaire par un traitement à la cycloheximide, par une étape de centrifugation du prélèvement favorisant l'entrée des bactéries dans les cellules et par l'utilisation d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux fluorescents ou marqués à la peroxydase révélant des inclusions caractéristiques après 2 à 3 jours de cultures. Cependant, ces techniques ont été délaissées au profit de la PCR plus sensible.

On peut tenter d'identifier les bactéries directement à partir du produit pathologique par des méthodes immunologiques :

- soit en visualisant de manière spécifique les corps bactériens ou leurs inclusions révélés par des anticorps en immunofluorescence ou par immunoperoxydase ; cela peut s'appliquer à *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae* capsulés, *S. pneumoniae* et certains streptocoques (groupes A, B, C, etc.) en visualisant les corps bactériens, et à *C. trachomatis* (visualisation des corps réticulés, corps élémentaires, en utilisant des anticorps soit polyclonaux, soit monoclonaux, détectant tous les sérotypes de *C. trachomatis*) ;
- soit en utilisant d'autres techniques permettant de révéler la présence d'antigènes solubles (ou extractibles) à l'aide de techniques immuno-enzymatiques (ELISA).

Les recherches de génome par hybridation (sondes chaudes ou froides) manquent de sensibilité. En revanche, les techniques d'amplification génique se sont beaucoup développées et sont très sensibles. Actuellement, il existe des trousses permettant la recherche de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae* sur produits génitaux ; pour cette recherche génomique, il faut respecter les recommandations (matériel de prélèvement, etc.) du fabricant. Les premiers résultats obtenus avec ces trousses utilisées pour rechercher ces germes sur des prélèvements oculaires révèlent une supériorité des techniques de PCR, sur les recherches d'antigènes ou sur les cultures.

Cela a été vérifié pour *C. trachomatis* dans un contexte de trachome, mais aussi dans des contextes de conjonctivites non trachomateuses. Des tests de PCR quantitative ont aussi été développés avec succès pour *C. trachomatis*.

**TABLEAU 24-1**

**Critères quantitatifs permettant de retenir l'implication d'espèces bactériennes dans l'étiologie de conjonctivites (d'après Cagle).**

| |
|---|
| *Groupe I : seuil = 1 UFC*/ml (nombre de colonies > 0)* |
| *Streptococcus pyogenes*<br>*Streptococcus pneumoniae*<br>*Neisseria* spp.<br>*Moraxella* spp.<br>*Haemophilus* spp.<br>*Acinetobacter* spp.<br>*Pseudomonas* spp.<br>*Achromobacter* spp.<br>*Enterobacteriaceae*<br>*Proteus/Morganella*<br>*Citrobacter* spp.<br>*Escherichia*<br>*Klebsiella*<br>*Serratia* |
| Groupe II : seuil = 10 UFC/ml<br>(nombre de colonies ≥ 10) |
| *Staphylococcus* aureus<br>Autres *Streptococcus* spp.<br>*Enterococcus* spp.<br>*Moraxella catarrhalis* |
| Groupe III : seuil = 100 UFC/ml<br>(nombre de colonies ≥ $10^2$) |
| *Staphylococcus epidermidis* ou autres *Staphylococcus*<br>à coagulase négative<br>*Micrococcus* spp.<br>*Bacillus* spp. |
| Groupe IV : seuil = 1000 UFC/ml<br>(nombre de colonies ≥ $10^3$) |
| *Corynebacterium* spp. (diphtéroïdes) |

* UFC : unité formant colonie.

Des PCR utilisant des amorces spécifiques, d'autres germes peuvent aussi être utilisées. Ainsi, les PCR spécifiques utilisées fréquemment sur les LCR, dans le cas de méningites, peuvent être appliquées aux prélèvements oculaires. Peuvent être recherchés les génomes de *S. pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae*. On a utilisé des PCR « nichées » pour rechercher des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et également *Mycobacterium tuberculosis*. Enfin, l'utilisation d'une PCR « universelle » détectant l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S a aussi été appliquée dans le cas d'infections oculaires. Ainsi, tout génome bactérien est potentiellement amplifiable, mais les prélèvements ne doivent pas être contaminés par des bactéries de la flore commensale.

### *Diagnostic indirect*

Le diagnostic indirect a peu d'intérêt. Il peut essentiellement être utilisé pour compléter, chez les enfants et les adultes, le diagnostic des infections à *Chlamydia*. Les nouveau-nés reçoivent les anticorps passifs d'origine maternelle (IgG), ce qui complique le diagnostic, sauf s'ils possèdent des anticorps anti-*Chlamydia* dans la fraction IgM, ce qui signe une synthèse d'anticorps propre à l'enfant.

En cas d'uvéite, la sérologie peut trouver sa place à la recherche d'une maladie de Lyme, d'une rickettsiose ou d'une bartonellose.

En conclusion, le diagnostic bactériologique d'infection oculaire superficielle repose sur le recours à la bactériologie traditionnelle, mais également de plus en plus tant dans les infections superficielles que dans les endophtalmies à la recherche de génomes bactériens. Ces dernières approches rendent accessible le diagnostic d'infection à *Chlamydia*, même pour un laboratoire non spécialisé.

Enfin, dans un contexte d'infection oculaire superficielle, une recherche de virus, de parasites (amibes) et de champignons doit être systématiquement associée au diagnostic bactériologique.

## Endophtalmies

La confirmation du diagnostic d'endophtalmie ne peut être obtenue que par la mise en culture de prélèvements d'humeur aqueuse et/ou de vitré.

### *Prélèvements*

La technique de prélèvement de l'humeur aqueuse a été décrite par Forster en 1974 : incision cornéenne périphérique non perforante, puis introduction d'une aiguille fine en prenant bien soin de ne pas léser l'endothélium et le cristallin, recueil de 0,1 à 0,2 ml d'humeur aqueuse qui est immédiatement ensemencé sur différents milieux de culture (fig. 24.2).

Chez l'aphake (sujet n'ayant plus de cristallin), l'incision cornéenne est élargie et une deuxième aiguille est poussée dans le vitré qui est alors aspiré (0,2 à 0,3 ml peut ainsi être récupéré). Chez les patients phakes (sujets ayant gardé leur cristallin), le vitré est aspiré (fig. 24.3) après réalisation d'une perforation sclérale à 3,5 mm du limbe (selon certains auteurs, cette technique devrait aussi s'appliquer à l'aphake car la voie d'abord antérieure favoriserait la contamination du vitré). Si le prélèvement est insuffisant ou si une vitrectomie thérapeutique est prévue, l'orifice scléral est agrandi pour permettre l'introduction d'un vitréotome. Il est évident qu'il s'agit de prélèvements précieux qui doivent être acheminés rapidement au laboratoire (moins de 15 minutes).

Les prélèvements vitréens (fig. 24.3), dilués par la solution d'irrigation, doivent être filtrés avant d'ensemencer les différents milieux de culture.

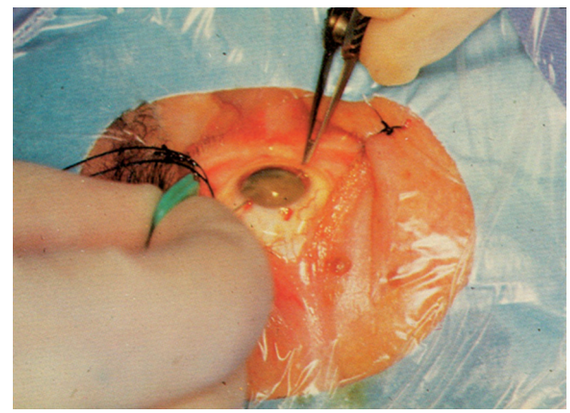


**Fig. 24.2.** – *Prélèvement de l'humeur aqueuse au début d'une intervention de la cataracte à l'aide d'une épicrânienne.*

**Fig. 24.3.** – *Prélèvement du vitré lors d'une vitrectomie pour cataracte traumatique et endophtalmie.*

À noter que lorsqu'une infection fongique est suspectée, les prélèvements doivent être réalisés au niveau des exsudats et des foyers inflammatoires car des études histologiques ont démontré qu'ils contenaient des champignons.

Lorsqu'une vitrectomie est pratiquée, il est nécessaire de filtrer la totalité du liquide vitréen sur membrane Millipore®.

L'examen de l'œil est parfois très évocateur d'une endophtalmie (fig. 24.4) avec pus et examen direct positif.

L'étude microbiologique des prélèvements comporte en fait deux étapes : l'examen direct sur lame et la réalisation de cultures.

### *Diagnostic direct*

L'examen direct après coloration de Gram, de Giemsa ou de Grocott permet d'affirmer la présence de germes et, s'ils sont présents (en petit nombre), cet examen peut permettre une orientation diagnostique. Il a comme avantage d'être rapide mais présente deux inconvénients : s'il montre des germes, il ne précise pas toujours l'espèce en cause et, s'il n'en montre pas, il ne permet pas d'éliminer une infection endoculaire (faux négatif).

Les cultures sont pratiquées sur milieux solides riches (gélose au sang, gélose « chocolat » enrichie en facteurs de croissance, etc.), ensemencées à 37 °C en atmosphère enrichie en $CO_2$ et sur milieux liquides (thioglycolate, bouillon cœur-cervelle, etc.). L'incubation de 5 à 8 jours peut être prolongée en cas de suspicion d'anaérobies ou de certains germes. Certains auteurs préconisent de garder les bouillons de Schaedler incubés à 37 °C et de Sabouraud à 30 °C jusqu'à 21 jours. La recherche de bactéries anaérobies doit être effectuée systématiquement sur milieux solides et de préférence aussi sur milieux liquides (Schaedler, etc.). De plus, une culture à température ambiante sur milieu spécifique (Sabouraud) est recommandée, notamment pour la recherche des champignons. Pour qu'une culture soit considérée comme positive, il faut qu'un micro-organisme se développe sur deux ou plusieurs milieux, ou de manière semi-confluente sur un ou plusieurs milieux solides au niveau du point d'inoculation. Une culture équivoque se définit par la croissance d'un micro-organisme sur un milieu liquide ou une faible croissance sur un milieu solide uniquement. Il faut savoir que la réalisation de prélèvements ne permet de mettre en évidence un agent infectieux que dans un cas sur deux.

Pour Forster, l'aspiration du vitré donne de meilleurs résultats que la ponction de la chambre antérieure. Mais un prélèvement négatif au niveau de la chambre antérieure ne permet pas d'éliminer une infection endoculaire et il faut pratiquer systématiquement un prélèvement vitréen devant une suspicion d'endophtalmie.

Malgré tout, un grand nombre de prélèvements donnent lieu à une culture négative ; il faut alors discuter la réalité de l'infection oculaire et éliminer une inflammation oculaire ; celle-ci étant écartée, la possibilité d'une endophtalmie bactérienne, voire fongique, ne peut être exclue.

Compte tenu de la fréquence des endophtalmies aiguës ou chroniques dont les prélèvements restent stériles, et vu la gravité de ces infections, il est nécessaire d'envisager la recherche de tout génome bactérien par amplification génique d'ADN codant l'ARN 16S et de pratiquer des PCR spécifiques à la recherche des espèces les plus fréquentes dans les infections intraoculaires.

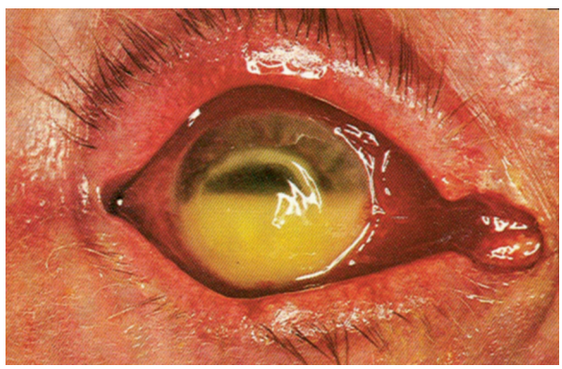


**Fig. 24.4.** – *Endophtalmie à* Staphylococcus aureus *suite à un corps étranger intraoculaire.*

## Conclusion

Les techniques de diagnostic bactériologique des infections oculaires se situent à un virage ; nous sommes à la veille du saut de la bactériologie pasteurienne au diagnostic tout moléculaire, et la bactériologie des infections oculaires devrait bénéficier de ces progrès mais, pendant encore quelques années, il y aura cohabitation des cultures traditionnelles et des outils de biologie moléculaire. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que, quelle que soit l'approche diagnostique, la qualité des résultats dépend de la qualité du prélèvement et que, pour obtenir de meilleurs résultats, la collaboration clinicien–biologiste est indispensable.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Adenis JP, Denis F, Bron A, et al. Infections et inflammations du segment antérieur de l'œil. Éditions médicales MSD ; 1989.

Adenis JP, Denis F, Colin J, et al. L'endophtalmie. Pénétration intra-oculaire des agents antimicrobiens. Paris : Ellipses ; 1988.

Cagle GD, Abshire RL. Quantitative ocular bacteriology : a method for the numeration and identification of bacteria from the skin-lash margin and conjonctiva. Invest Ophthalmol Vis Sci 1981 ; 20 : 751–7.

Carrol NM, Jaeger EEM, Choudhury S, et al. Detection and discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. J Clin Microbiol 2000 ; 36 : 1753–7.

Denis F, Ploy MC, Rogez S, et al. Infections oculaires bactériennes : méthodes de diagnostic actuelles et prospectives. Ann Biol Clin 1999 ; 57 : 401–8.

Forster RK. Etiology and diagnosis of bacterial postoperative endophtalmitis. Ophtalmology 1978 ; 85 : 320–6.

Leibowitz HM. The red eye. New Engl J Med 2000 ; 343 : 345–51.

Liotet S, Morin Y. Guide pratique des examens de laboratoire en ophtalmologie. Paris : Masson ; 1988.

Mabey D, Solomon Anthony W. Application of molecular tools in the control of blinding trachoma. Am J Trop Med Hyg 2003 ; 69 : 11–7.

Ortega-Larrocea G, Bobadilla-Del-Valle M, Ponce-de-Leon A, et al. Nested polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* DNA detection in aqueous and vitreous patients with uveitis. Arch Med Res 2003 ; 34 : 116–9.

Remic. Examen microbiologique d'un prélèvement oculaire. SFM ; 2010. p. 135–45.

Schabereiter-Gurtner C, Maca S, Rolleke S, et al. 16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001 ; 42 : 1164–71.

Solomon AW, Holland MJ, Burton MJ, et al. Strategies for control of trachoma : observational study with quantitative PCR. Lancet 2003 ; 362 : 198–204.

Thompson MJ, Albert DM. Ocular tuberculosis. Arch Ophtalmol 2005 ; 123 : 844–9.

Wilhemus KR, Liesegang TJ, Osato MS, Jones JB. Laboratory diagnosis of ocular infections. Cumitech 13 A Washington : ASM Press ; 2005.

CHAPITRE

# 25 Prélèvements génitaux chez l'homme

L. Mereghetti, P. Lanotte, R. Quentin

## Introduction

Les pathologies génitales infectieuses sont relativement courantes chez l'homme. Trois entités nosologiques doivent être distinguées : les ulcérations génitales, les urétrites et les infections plus profondes (prostatites, épididymites, etc.) (fig. 25.1).

Les ulcérations génitales et les urétrites sont le plus souvent liées à une contamination vénérienne.

## Ulcérations génitales

### Rappel anatomoclinique et pathogenèse

Chez l'homme, les ulcérations génitales sont situées sur le gland, le sillon balanoprépucial ou plus rarement sur la verge. Elles n'ont pas toutes une étiologie bactérienne (les herpès simplex sont une cause fréquente d'ulcération, beaucoup plus rarement sont en cause la varicelle, la mononucléose infectieuse ou les infections à cytomégalovirus [CMV] chez l'immunodéprimé). La présence d'une ulcération génitale doit faire rechercher de principe des ulcérations sur une autre localisation anatomique (bouche, anus). Il faut également rechercher les autres pathogènes transmissibles par voie vénérienne et inclure dans le bilan les sérologies virales (VIH, VHB, VHC). Enfin, il est important de faire consulter la (ou les) partenaire(s).

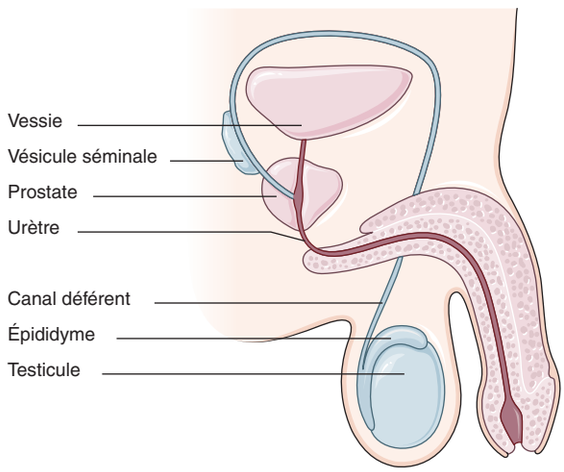



**Fig. 25.1.** – *Représentation schématique de l'appareil génital masculin.*

Quatre bactéries, transmises par voie sexuelle, peuvent être à l'origine d'ulcérations génitales (tableau 25.1).

- Le chancre syphilitique (dû à *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*) correspond à la phase de syphilis primaire. Il apparaît environ 3 semaines après le contact sexuel contaminant. Classiquement, il s'agit d'une lésion érosive, le plus souvent unique, circulaire, de 5 à 10 mm de diamètre, non douloureuse, dure, à fond propre et à bords réguliers. Elle est spontanément résolutive en 4 à 6 semaines. Le chancre peut s'accompagner d'une ou de plusieurs adénopathie(s) satellite(s) en région inguinale, également indolore(s). Dans un quart des cas, le chancre n'a pas un aspect typique (chancres géants, chancres multiples, chancres douloureux, etc.). La culture de *Treponema pallidum* étant impossible, le diagnostic biologique de syphilis primaire repose sur la mise en évidence du tréponème en microscopie optique à fond noir et sur la sérologie.
- La lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas-Favre est une maladie rare en Europe, alors qu'elle est très répandue dans les régions tropicales et subtropicales. Elle est cependant en augmentation dans la population des homosexuels masculins (forme anorectale). Elle est due aux sérovars L1, L2 et L3 de *Chlamydia trachomatis*. La symptomatologie apparaît entre 1 et 3 semaines après le contact sexuel contaminant. Elle débute par l'apparition de petites ulcérations non douloureuses, qui correspondent aux lésions primaires, rapidement et spontanément résolutives. Ultérieurement apparaît une lymphadénite inguinale douloureuse, pouvant fistuliser à la peau en « pomme d'arrosoir », qui correspond à la phase secondaire de la maladie. Le diagnostic biologique de lymphogranulomatose vénérienne repose sur la mise en évidence de *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire, par immunofluorescence et par PCR.
- Le chancre mou est une maladie rare en Europe, alors qu'elle sévit dans les régions tropicales. Il est dû à *Haemophilus ducreyi*. La symptomatologie apparaît environ 1 semaine après le contact sexuel contaminant. Classiquement, il s'agit d'une lésion érosive multiple, inflammatoire, douloureuse, non indurée, avec des bords présentant un aspect mucopurulent. L'ulcération s'accompagne d'une adénopathie, inconstante, tendue et douloureuse, contenant du pus franc. Le diagnostic

TABLEAU 25-1

**Principales étiologies bactériennes responsables d'ulcérations génitales.**

| | *Durée d'incubation* | *Caractéristiques de l'ulcération* | *Adénopathie* |
|---|---|---|---|
| Syphilis | 3 semaines | Unique, circulaire indolore, dure, propre, à bords réguliers | Unique ou multiple |
| Lymphogranulomatose vénérienne | 1 à 3 semaines | Multiple, indolore | Lymphadénite → fistulisation |
| Chancre mou | 1 semaine | Multiple, douloureuse, molle, sale, inflammatoire | Adénopathie |
| Donovanose | 4 à 8 semaines | Papule/nodule, indolore, bourgeonnante, à bords surélevés | Diffusion sous-cutanée |

biologique de chancre mou repose sur la mise en évidence d'*Haemophilus ducreyi* sur les prélèvements par examen direct et par culture.

- La donovanose est une maladie très rare en Europe, alors qu'elle est endémique dans certaines régions du globe (Nouvelle-Guinée, Australie, Afrique du Sud, Inde, Brésil, etc.). Elle est due à *Klebsiella granulomatis* (anciennement *Calymmatobacterium granulomatis*). La symptomatologie apparaît entre 1 et 2 mois après le contact sexuel contaminant. Classiquement, il s'agit d'une lésion papulaire ou nodulaire indolore, évoluant rapidement en donnant une ulcération bourgeonnante et saignotante, également indolore, à bords surélevés. On n'observe pas d'adénopathie à proprement parler, mais une diffusion sous-cutanée de l'infection. Le diagnostic biologique de donovanose repose sur la mise en évidence de *Klebsiella granulomatis* par microscopie et par PCR.

## Diagnostic bactériologique direct (fig. 25.2)

### *Prélèvements*

Le prélèvement du chancre ou de l'ulcération doit être impérativement réalisé au laboratoire, afin d'observer rapidement le frottis au microscope, avec ou sans coloration. La ponction ganglionnaire devrait également être réalisée au laboratoire.

Après nettoyage de la lésion à l'eau stérile, le prélèvement à la recherche des tréponèmes est pratiqué avec une curette, un vaccinostyle ou tout instrument non traumatisant permettant le raclage de la lésion et le recueil de la sérosité après pression du chancre. Il est important de ne pas faire saigner la lésion ; de même, il ne faut pas utiliser d'écouvillon qui « épongerait » la sérosité. En revanche, il peut être intéressant de refaire un frottis à partir d'un nouveau prélèvement réalisé quelques minutes après le premier prélèvement ; en effet, la sérosité continue de sourdre après le premier raclage, et le second prélèvement est plus riche en tréponèmes. Il est également possible de réaliser une ponction ganglionnaire ; le liquide de ponction sera examiné selon les mêmes modalités que la sérosité du chancre.

Le prélèvement à la recherche de *Chlamydia trachomatis* doit permettre le recueil de la sérosité après grattage de l'ulcération. La ponction du ganglion peut également être intéressante.

Le prélèvement du chancre mou se fait après grattage de la lésion à la curette. La ponction du bubon est également contributive.

Compte tenu de l'évolution rapide des ulcérations génitales, la mise en évidence de *Klebsiella granulomatis* se fait essentiellement par ponction du granulome inguinal.

### *Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique*

#### Examen direct

La recherche de tréponème se fait à partir de la sérosité, qui est immédiatement placée entre lame et lamelle (éventuellement avec quelques gouttes de sérum physiologique), et observée au microscope à fond noir, à un grossissement · 400. Le tréponème possède une morphologie hélicoïdale, et présente trois types de mouvements : mouvements de rotation autour de son axe, mouvements flexueux reptiliens et progression en vrille.

*Haemophilus ducreyi* est un bacille à Gram négatif, court voire coccobacillaire, de coloration bipolaire, mais prenant mal la coloration de Gram. En revanche, il présente un aspect caractéristique en courtes ou longues chaînettes de petits bacilles, typiquement en « chaîne de vélo », par coloration au bleu de méthylène ou au May-Grünwald-Giemsa.

Au cours de la donovanose, les corps de Donovan intracellulaires peuvent être visualisés par coloration de May-Grünwald-Giemsa.

#### Cultures

##### *Milieux de culture*

L'isolement d'*Haemophilus ducreyi* est difficile. La culture se fait sur milieux gélosés riches, type chocolat Polyvitex® additionné de 5 à 10 % de sérum de veau fœtal ou milieu Columbia enrichi de sang de lapin, à partir des prélèvements obtenus par grattage de l'ulcération ou par ponction du bubon. L'incubation des milieux est réalisée en atmosphère enrichie en 5 à 10 % de $CO_2$, au moins

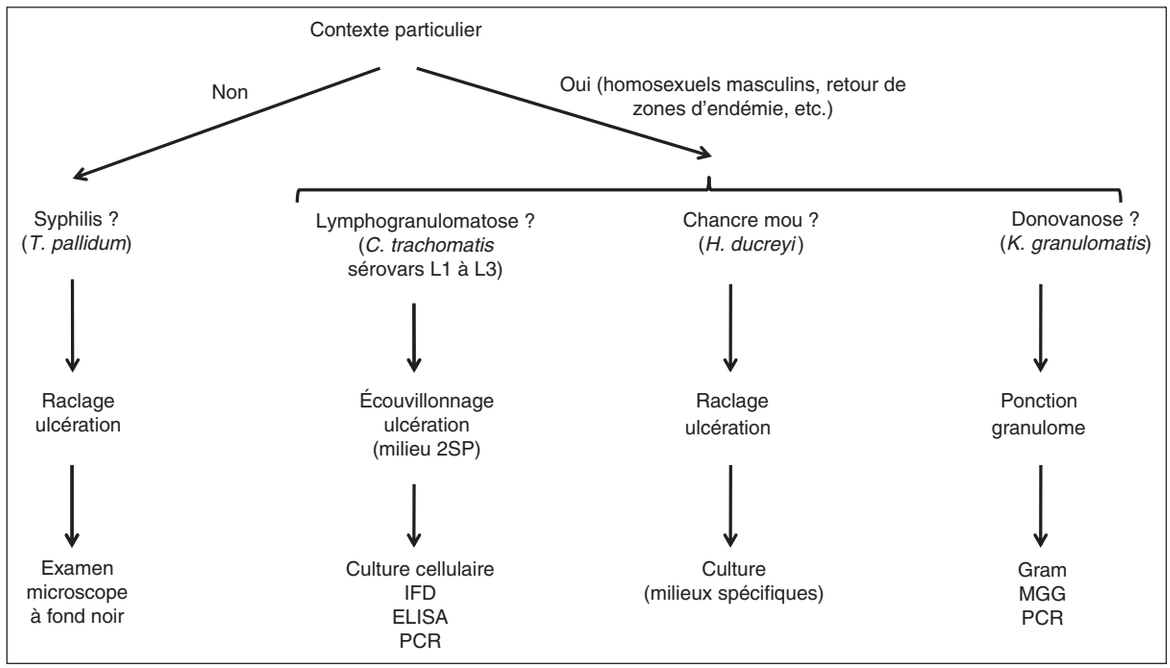



**Fig. 25.2.** – *Conduite à tenir en cas d'ulcération génitale chez l'homme.*

48 heures et jusqu'à 10 jours (dans ce cas, il est utile d'utiliser un milieu rendu sélectif par addition de 5 µg/ml de vancomycine). La température idéale d'incubation est de 33 à 35 °C.

Pour la recherche de *Chlamydia trachomatis*, la culture sur milieux gélosés est impossible. L'examen de référence est la culture cellulaire sur cellules HeLa 229 ou MacCoy, présentant une excellente spécificité, une sensibilité de 80 à 90 %, mais reste réservée à quelques laboratoires spécialisés.

### *Identification*

L'identification d'*Haemophilus ducreyi* est difficile en raison de la pauvreté des caractères biochimiques positifs, et aucune galerie ne permet le diagnostic d'espèce. Le diagnostic est donc présomptif sur la base de l'aspect morphologique du chancre, sur l'aspect typique des bacilles par la coloration au bleu de méthylène, et sur la morphologie de colonies (petites, brillantes, grisâtres, avec une collerette transparente à bords rugueux, se prenant mal avec l'öse). Les colonies sont colorées au bleu de méthylène, permettant d'observer l'aspect typique en « chaîne de vélo ».

## *Recherche de constituants bactériens*

### Antigènes

Deux techniques permettent la détection de *Chlamydia trachomatis* à partir de prélèvements urétraux.

- L'immunofluorescence directe permet la mise en évidence des corps élémentaires à partir de frottis ou d'étalements. Elle dépend de la qualité et du type d'anticorps utilisé, ainsi que de l'expérience de l'opérateur. Elle est spécifique et rapide (environ 1 heure), mais présente une sensibilité moyenne.
- Les réactions immuno-enzymatiques sont des techniques automatisées, sensibles et très spécifiques, relativement rapides (environ 4 heures) ; elles sont utilisables sur les prélèvements urétraux mais pas sur les urines.

### Recherche génomique

Différentes techniques sont actuellement commercialisées et utilisables pour *Chlamydia trachomatis*. Elles sont très sensibles et très spécifiques, rapides (environ 4 heures), mais relativement onéreuses. Comme pour toute PCR, il est important de s'entourer de précautions : contrôles positif et négatif, recherche d'inhibiteur par utilisation de standard interne. Il faut également éviter de contrôler trop précocement après traitement, la réaction pouvant être positive alors que l'antibiothérapie a été efficace.

En revanche, la mise en évidence de *Klebsiella granulomatis* par PCR relève d'une technique « maison » développée en interne par chaque laboratoire.

## Diagnostic bactériologique indirect

La sérologie est la méthode la plus courante pour le diagnostic de syphilis. Il existe deux types de réactions : les réactions non tréponémiques (utilisant des antigènes non spécifiques du tréponème permettant la détection des anticorps anticardiolipides) et des réactions tréponémiques utilisant des antigènes spécifiques du tréponème.

Selon la nomenclature des actes de biologie médicale, le sérum doit être testé à la fois par une technique utilisant une réaction non tréponémique (type RPR [*rapid plasma reagin*] ou VDRL [*veneral disease research laboratory*]) et par une technique utilisant une réaction tréponémique (type TPHA [*Treponema pallidum hemagglutination assay*], ELISA [*enzyme linked immunosorbent assay*] ou FTA-abs [*fluorescent treponemal antibody absorbed*]). Le FTA-abs se positive concomitamment au chancre ou peu après ; le TPHA se positive environ 1 semaine après l'apparition du chancre ; et le VDRL entre 2 et 3 semaines après l'apparition du chancre. Le test d'immobilisation des tréponèmes (test de Nelson et Mayer) n'étant plus pratiqué en France à l'heure actuelle, le test d'immunoempreinte (*Western-blot*) est considéré comme le test de confirmation pour le diagnostic de syphilis.

# Urétrites

## Rappel anatomoclinique et pathogenèse

L'urétrite est une inflammation de l'urètre, le plus souvent d'origine infectieuse, et transmise lors de contact sexuel. Dans plus de la moitié des cas, elle se manifeste par un écoulement urétral clair ou purulent ; dans les autres cas, on observe une dysurie, une pollakiurie ou des brûlures mictionnelles. Comme pour toute infection sexuellement transmise, il faut rechercher les autres pathogènes transmissibles par voie vénérienne et inclure dans le bilan les sérologies virales (VIH, VHB, VHC). Enfin, il est important de faire consulter la (ou les) partenaire(s).

Il est classique de distinguer les urétrites gonococciques, dues à *Neisseria gonorrhoeae*, et les urétrites non gonococciques dues à *Chlamydia trachomatis*, à certains mycoplasmes génitaux (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma* spp.), et à *Trichomonas vaginalis*.

- *Neisseria gonorrhoeae* est responsable d'urétrite aiguë symptomatique, survenant 2 à 5 jours après le contact contaminant. L'urétrite se manifeste par un écoulement purulent dans 90 % des cas ; plus rarement, la symptomatologie peut être fruste.
- *Chlamydia trachomatis* (sérotypes D à K) est le principal agent des urétrites non gonococciques. La symptomatologie apparaît en moyenne dans les 10 à 20 jours suivant le contact contaminant. Dans la moitié des cas, l'urétrite est symptomatique, soit à type d'écoulement clair, soit à type de dysurie, pollakiurie ou brûlures mictionnelles ; plus rarement, il existe un écoulement purulent ; parfois, l'infection est asymptomatique.
- *Mycoplasma genitalium* serait responsable d'environ 15 à 25 % des urétrites non gonococciques, et serait surtout impliqué dans les urétrites récidivantes et les urétrites chroniques, en particulier chez les homosexuels. L'écoulement est souvent présent, plus volontiers mucopurulent.
- *Ureaplasma* spp. est également responsable d'urétrite, mais son implication est plus discutée, en raison d'un portage génital féminin et masculin totalement asymptomatique.
- L'association *Mycoplasma hominis*–urétrite masculine, que l'urétrite soit aiguë ou chronique, n'a pas été clairement démontrée.
- *Trichomonas vaginalis* est un protozoaire flagellé responsable de 5 à 15 % des urétrites non gonococciques.
- Les autres germes sont plus rarement à l'origine d'urétrites : *Haemophilus* spp., streptocoques, entérobactéries, etc.

## Diagnostic bactériologique direct (fig. 25.3)

### *Prélèvement*

Le prélèvement urétral doit être réalisé le matin avant toute toilette, chez un patient confortablement installé (position semi-allongée). En cas d'écoulement, recueillir la goutte sur une lame porte-objet pour examen direct. Dans tous les cas, prélever avec des écouvillons « fins » et avec douceur, afin de limiter le caractère inconfortable du prélèvement. Un premier écouvillon en coton est introduit sur 1 cm pour la recherche des germes standard et la réalisation de l'examen direct (en cas d'utilisation d'un milieu de transport pour le gonocoque, réaliser un écouvillon supplémentaire pour l'examen direct). Le deuxième écouvillon, en alginate, doit être introduit sur 2 à 3 cm, en effectuant un raclage léger permettant le recueil des cellules pour la recherche de mycoplasmes. Le troisième écouvillon, également en alginate avec tige en plastique, est introduit sur 2 à 3 cm et utilisé pour la recherche de *Chlamydia trachomatis* ; il doit être placé en milieu de transport type saccharose phosphate (2SP), MicroTest Culture Transport System (M4-RT) ou Universal Transport Medium (UTM-RT) permettant ultérieurement l'identification de la bactérie quelle que soit la méthode utilisée (fig. 25.4).

La recherche de *Chlamydia trachomatis* peut également être réalisée sur un prélèvement de premier jet urines par recueil du premier jet à partir des urines de la nuit (ou par recueil du premier jet au moins 2 heures après la dernière miction).

### *Transport et stockage*

Idéalement, le prélèvement urétral doit être réalisé au laboratoire. Si ce n'est pas le cas, les échantillons doivent être acheminés le plus rapidement possible au laboratoire. Des milieux de transport peuvent être utilisés : pour *Neisseria gonorrhoeae*, 2SP ; pour *Chlamydia trachomatis*, 2SP ; ou pour mycoplasmes génitaux, A3, etc.

Le premier jet urinaire peut être conservé à +4 °C.

### *Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique*

#### Cultures

##### *Traitement de l'échantillon*

Les échantillons doivent être techniqués le plus rapidement possible en raison de la fragilité de certains germes.

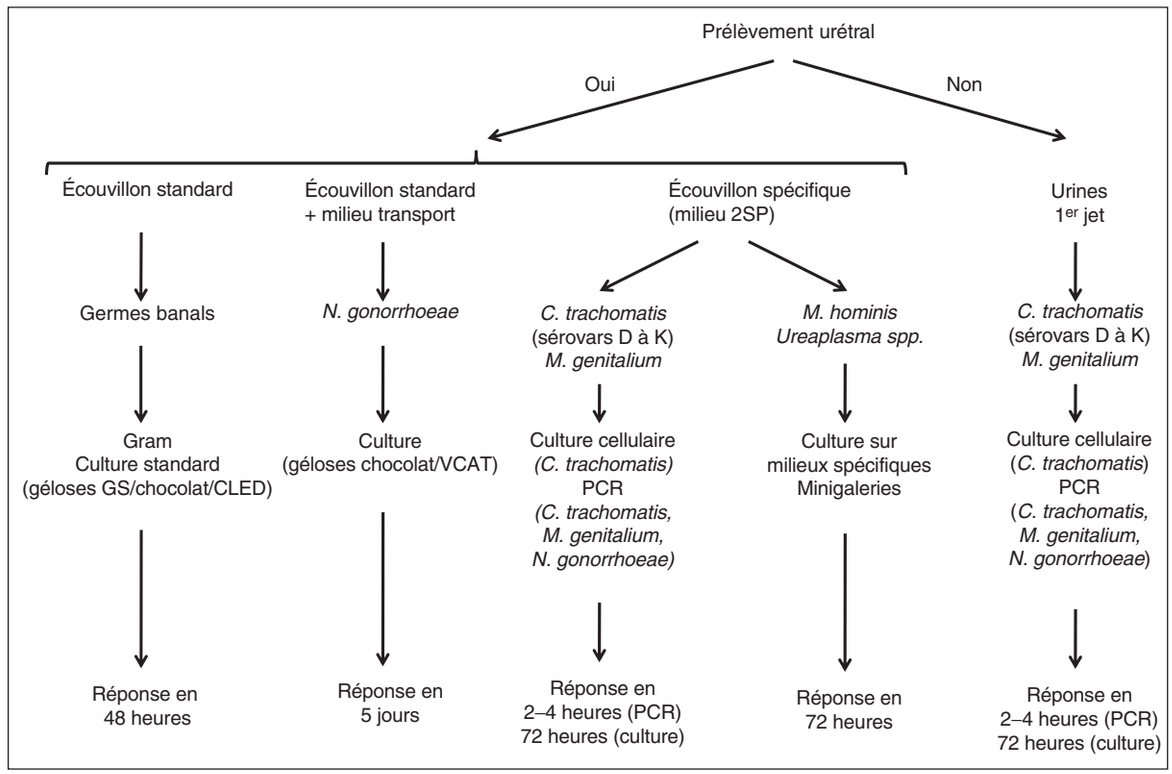



**Fig. 25.3.** – *Conduite à tenir en cas d'urétrite chez l'homme.*

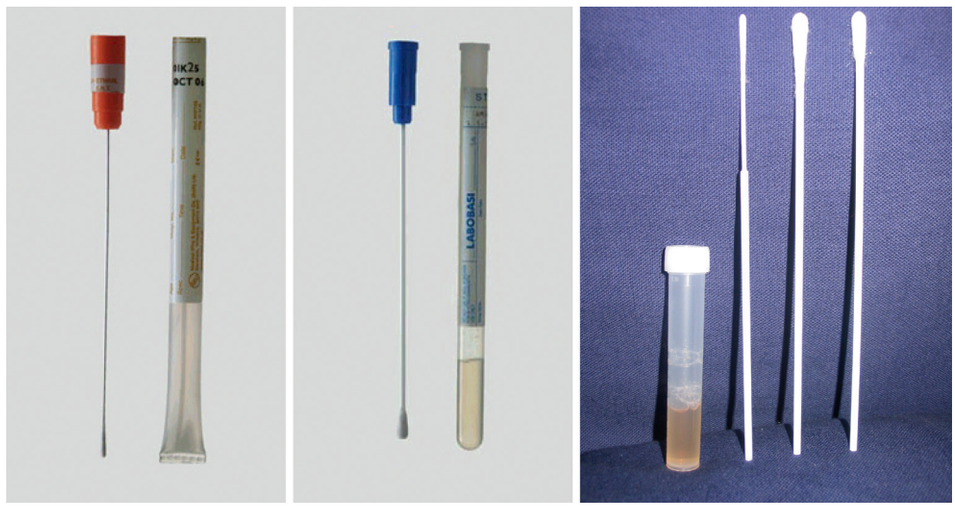


**Fig. 25.4.** – *Écouvillon fin pour prélèvement urétral chez l'homme (à gauche); écouvillon avec milieu de transport standard (au milieu); et écouvillons avec milieu de transport 2SP pour* Chlamydia *et mycoplasmes génitaux (à droite).*

### *Examens microscopiques*

L'examen microscopique à l'état frais, entre lame et lamelle, permet de visualiser plus facilement la présence de *Trichomonas vaginalis* en raison de ses mouvements, ou de levures.

L'examen microscopique par coloration de Gram permet de visualiser des diplocoques à Gram négatif en grains de café intra- et extracellulaires, souvent rares sur le frottis, évocateurs de *Neisseria gonorrhoeae*.

### Milieux de culture

Pour la recherche de bactéries communes, ensemencer une gélose au sang (base Columbia ou trypticase-soja, enrichie de 5 % de sang de cheval ou de mouton) et une gélose type chocolat Polyvitex® ; une gélose lactosée type CLED peut être ajoutée, inhibant la mobilité des *Proteus*. Incuber les géloses 48 heures au minimum.

Pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, ensemencer une gélose au chocolat Polyvitex® (déjà faite pour les germes communs) et une gélose chocolat avec agents inhibiteurs type VCN, VCF ou VCAT en atmosphère enrichie de 5 à 10 % de $CO_2$. Incuber les géloses 5 jours.

Pour les mycoplasmes génitaux, ensemencer sur milieux enrichis en sérum et extrait de levures. Il existe de milieux solides (type gélose A7) et des milieux liquides (minigalerie type Mycofast® Evolution) qui permettent à la fois l'identification, la numération et l'antibiogramme du mycoplasme (fig. 25.5). Les géloses sont incubées 48 à 72 heures et les minigaleries 24 à 48 heures. Il est à noter que ces milieux permettent la croissance d'*Ureaplasma* spp. et de *Mycoplasma hominis*, mais pas de *Mycoplasma genitalium*.

Pour la recherche de *Chlamydia trachomatis*, la culture sur milieux gélosés est impossible. L'examen de référence est la culture cellulaire sur cellules HeLa 229 ou MacCoy, présentant une excellente spécificité, une sensibilité de 80 à 90 %, mais elle reste réservée à quelques laboratoires spécialisés.

**Fig. 25.5.** – *Milieux liquide et gélosé utilisés pour l'identification, la quantification et la détermination de la sensibilité aux antibiotiques de* Mycoplasma hominis *et d'*Ureaplasma *spp.*

### Identification

Les colonies de *Neisseria gonorrhoeae* sont de couleur grisâtre, à bords irréguliers, plus ou moins brillantes, mesurant de 0,5 à 1 mm de diamètre. *Neisseria gonorrhoeae* possède une réaction de catalase positive et d'oxydase positive. Elle acidifie le glucose, mais pas le maltose, le fructose, ni le saccharose. L'ONPG est négatif, de même que le γGT ; il n'y a pas de nitrate réductase. En pratique, les galeries biochimiques de type Api NH® (bioMérieux), Vitek NH® (bioMérieux), BBL Crystal® (Becton Dickinson) ou Neisseria 4H® (Bio-Rad) permettent l'identification de cette bactérie.

Sur milieux gélosés, la morphologie des mycoplasmes génitaux observée au microscope (objectif 40) est caractéristique : colonies avec partie centrale plus dense et périphérie plus claire (image en « œuf au plat ») évocatrices de *Mycoplasma hominis* ; colonies denses de façon homogène (image en « oursin ») évocatrices d'*Ureaplasma* spp. L'identification des mycoplasmes génitaux par minigaleries repose sur leur résistance naturelle vis-à-vis de certains antibiotiques (tableau 25.2). Ces minigaleries permettent également de numérer *Ureaplasma* spp. ($10^3$, $10^4$ ou $\geq 10^5$ unités de changement de couleur par ml [UCC/ml]) et *Mycoplasma hominis* ($\geq 10^4$ UCC/ml). S'il y a discordance entre les résultats observés sur minigaleries et sur milieux gélosés, par exemple minigalerie positive et gélose négative, repiquer les cupules positives de la minigalerie sur milieux gélosés afin de vérifier la morphologie des colonies.

### Résultats et interprétation

La présence d'une culture polybactérienne, quantitativement peu ou moyennement abondante, est en faveur d'une colonisation urétrale. La présence d'une culture pure ou avec nette prédominance d'une seule espèce (*Escherichia coli*, autre entérobactérie, *Pseudomonas*, etc.) est en faveur d'un processus infectieux, surtout si la culture est abondante.

La présence de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* signe l'infection, qu'elle soit symptomatique ou non.

En revanche, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma* spp. sont des commensaux des voies génitales, ce qui rend plus difficile l'appréciation de leur pathogénicité. L'aspect quantitatif est donc important à prendre en considération ;

**TABLEAU 25-2**

**Identification des mycoplasmes génitaux sur la base de leur résistance naturelle aux antibiotiques.**

| | *Triméthoprime–sulfaméthoxazole* | *Lincomycine* | *Érythromycine* |
|---|---|---|---|
| *Ureaplasma urealyticum* | R | R | S |
| *Mycoplasma hominis* | R | S | R |

ainsi, pour *Ureaplasma* spp., le seuil de positivité est de $10^4$ UCC/ml pour un prélèvement urétral, et de $10^3$ UCC/ml pour un premier jet d'urines.

#### *Antibiotiques à tester*

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est réalisée selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Concernant plus spécifiquement *Neisseria gonorrhoeae*, la présence de la β-lactamase doit être recherchée par une technique chromogénique (sur disque de céfinase) ; la β-lactamase confère la résistance aux amino-, carboxy- et acyluréido-pénicillines ; l'association à un inhibiteur de β-lactamase restaure l'activité de ces pénicillines. Une baisse de sensibilité vis-à-vis de la pénicilline et/ou des céphalosporines de troisième génération a également été décrite. En pratique, réaliser un antibiogramme sur milieu gélosé type chocolat Polyvitex® avec un inoculum de 1 MacFarland ($10^8$ bactéries/ml), en testant la sensibilité à la pénicilline G (ou l'amoxicilline), à la ceftriaxone, au céfixime, à la ciprofloxacine (ou l'ofloxacine), à la spectinomycine, à la tétracycline et à l'azithromycine, soit par la technique E-test® (en particulier pour les β-lactamines et les quinolones pour lesquelles il peut exister une baisse de sensibilité), soit par la technique des disques.

La détermination de la sensibilité des mycoplasmes peut être réalisée en milieu liquide en utilisant les minigaleries. Suivant les kits utilisés, différentes molécules peuvent être testées (doxycycline, roxithromycine, azithromycine, josamycine, pristinamycine, ciprofloxacine et ofloxacine).

### Recherche de constituants bactériens

#### *Antigènes*

Deux techniques permettent la détection de *Chlamydia trachomatis* à partir de prélèvements urétraux.

- L'immunofluorescence directe permet la mise en évidence des corps élémentaires à partir de frottis ou d'étalements. Elle dépend de la qualité et du type d'anticorps utilisé ainsi que de l'expérience de l'opérateur. Elle est spécifique et rapide (environ 1 heure), mais présente une sensibilité moyenne.
- Les réactions immuno-enzymatiques sont des techniques automatisées, sensibles et très spécifiques, relativement rapides (environ 4 heures) ; elles sont utilisables sur les prélèvements urétraux mais pas sur les urines.

#### *Recherche génomique*

Différentes techniques sont actuellement commercialisées et utilisables pour *Chlamydia trachomatis*. Elles sont très sensibles et très spécifiques, rapides (environ 4 heures), mais relativement onéreuses. Comme pour toute PCR, il est important de s'entourer de précautions : contrôles positif et négatif, recherche d'inhibiteur par utilisation de standard interne. Il faut également éviter de contrôler trop précocement après traitement, la réaction pouvant être positive alors que l'antibiotique a été efficace.

La recherche de *Neisseria gonorrhoeae* peut également être réalisée par PCR. Certains kits commercialisés incluent la détection simultanée de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*.

### Diagnostic bactériologique indirect

La sérologie n'a aucun intérêt pour le diagnostic des urétrites à *Chlamydia trachomatis* chez l'homme.

## Prostatites, épididymites et orchiépididymites

### Rappel anatomoclinique et pathogenèse

La prostatite correspond à l'inflammation de la glande prostatique, qui peut se présenter sous quatre formes : la prostatite aiguë bactérienne, la prostatite chronique bactérienne, la prostatite chronique non bactérienne et la prostatite asymptomatique. Seules les deux premières formes ont leur place dans ce chapitre, en sachant qu'elles ne représenteraient que 10 % de l'ensemble des prostatites. Le principal mode de contamination est la voie canalaire, soit par voie descendante à partir de la vessie, soit par voie ascendante à partir de l'urètre. Les manœuvres instrumentales (sondage vésical, endoscopie, biopsie, chirurgie, etc.) sont des facteurs favorisant l'infection.

Les étiologies bactériennes varient en fonction du caractère nosocomial et/ou iatrogène de la prostatite : *Escherichia coli* est la première cause ; les autres entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* sont plus rarement en cause, de même que les entérocoques et les mycoplasmes génitaux (*Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium*).

L'épididymite est l'inflammation de l'épididyme, qui s'étend parfois au testicule, constituant alors l'orchiépididymite (l'orchite seule est rare et se voit principalement au cours des oreillons). Le mode de contamination est la voie canalaire ascendante. Les germes en cause sont ceux déjà cités dans le cadre des urétrites (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma* spp.) et des prostatites (*Escherichia coli*, autres entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*), ainsi que quelques germes plus rarement impliqués (*Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus*, etc.).

### Diagnostic bactériologique direct

#### *Prélèvements*

Plusieurs prélèvements peuvent être réalisés, selon la symptomatologie :

- le prélèvement urétral, comme indiqué dans le cas de l'urétrite (voir ci-dessus) ;
- le recueil du premier jet, qui peut être une alternative au prélèvement urétral pour la recherche de *Chlamydia* ;

- le recueil des sécrétions prostatiques après massage prostatique. En pratique, après vidange vésicale, réaliser un massage de la prostate par toucher rectal, et recueillir les éventuelles sécrétions s'écoulant par l'urètre. S'il n'y a pas de sécrétions visibles, demander au patient d'uriner et recueillir la miction ;
- la spermoculture, pouvant également être contributive.

Enfin, dans le cas de la constitution d'un abcès, le recours à la chirurgie est fréquent. Il est important de demander au chirurgien d'adresser au laboratoire un échantillon de pus.

### *Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique*

Pour la recherche de bactéries communes, de *Neisseria gonorrhoeae*, des mycoplasmes génitaux et de *Chlamydia trachomatis*, voir ci-dessus le paragraphe « Urétrites ».

## Rôle du laboratoire dans la surveillance de l'infection

Les maladies sexuellement transmises ne sont pas à déclaration obligatoire. Il est donc important, en raison de leur recrudescence, de disposer d'informations épidémiologiques actualisées, tant sur le plan du nombre de cas que de l'évolution de la résistance aux antibiotiques. C'est pourquoi les laboratoires publics et privés peuvent participer, sur la base du volontariat, à différents réseaux de surveillance nationaux pilotés par l'Institut national de veille sanitaire (InVS) en collaboration avec les Centres nationaux de référence (CNR) correspondants. Il s'agit du Réseau national des gonocoques (RENAGO), du Réseau national des *Chlamydiae* (RENACHLA) et du Réseau de surveillance de la syphilis.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Bébéar C, de Barbeyrac B, Pereyre S, Bébéar CM. Mycoplasmes. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007.

Clyti E, Pradinaud R. Donovanose. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris) Maladies infectieuses, 8-020-A-10. 2004 ; 5p.

de Barbeyrac B, Bébéar C, Bébéar C. Chlamydia. In : Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007.

Dominique S, Delmas V, Horpitean V, Boccon-Gibod L. Infections génitales masculines. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris) Maladies infectieuses, 8-003-I-20 2004.

REMIC – Référentiel en microbiologie médicale. Société française de microbiologie ; 2010.


**ADRESSES UTILES**

**Centre national de référence des *Chlamydiae***
Dr Bertille de Barbeyrac
Faculté de Médecine Hyacinte Vincent – Laboratoire de bactériologie
146, rue Léo-Saignat
33076 Bordeaux cedex
Tél. : 05 56 79 56 67 – Fax : 05 56 79 56 11
E-mail : bertille.de.barbeyrac@u-bordeaux2.fr

**Centre national de référence des Gonocoques**
Dr Patrice Sednaoui
Institut Alfred Fournier
25, boulevard Saint-Jacques
75014 Paris
Tél. : 01 40 78 26 70 – Fax : 01 40 78 26 27
E-mail : patrice.sednaoui@institutfournier.org

**Centre national de référence de la Syphilis**
Pr Nicolas Dupin
Hopital Cochin – Service de dermatologie – Pavillon Tarnier
89, rue d'Assas
75006 Paris
Tél. : 01 58 41 18 19 – Fax : 01 58 41 18 49

CHAPITRE

# 26 Prélèvements génitaux chez la femme

R. Quentin, P. Lanotte, L. Mereghetti

## Introduction

Les nombreux antibiogrammes réalisés par excès sur des bactéries commensales vaginales conduisent à des dépenses de santé inutiles et à des traitements inadaptés finalement préjudiciables à l'état de santé des patientes. En effet, ces antibiothérapies ne soulagent pas les patientes, et induisent des pathologies vulvovaginales et des troubles digestifs parfois majeurs. En outre, elles favorisent l'émergence dans les flores vaginales, comme dans les autres flores naturelles, de bactéries résistantes aux antibiotiques, en particulier actuellement des entérobactéries productrices de β-lactamase à spectre étendu (BLSE).

Pour analyser correctement les prélèvements génitaux chez la femme, les conditions suivantes doivent être réalisées :

- collaborer avec le médecin ou le gynécologue prescripteur pour obtenir des informations : âge et état de grossesse ;
- rédiger des procédures de prélèvements pour obtenir une qualité d'échantillon irréprochable ;
- avoir une parfaite connaissance de l'écologie microbienne normale du vagin ;
- connaître la nature des pathologies infectieuses des voies génitales féminines et les critères d'interprétation rigoureux et limités à ces pathologies.

## Rappel anatomoclinique

Chez la femme, le vagin, l'utérus (col + corps) et le conduit tubaire constituent un canal continu de la vulve à la cavité péritonéale (fig. 26.1). L'appareil génital féminin est composé de deux secteurs anatomiques qui diffèrent notablement quant à la microbiologie de leurs cavités. Le premier secteur comporte la vulve, le vestibule, le vagin et l'exocol. Il est largement colonisé par les flores commensales. Inversement, le second secteur, composé de l'endocol, de la cavité utérine, de la cavité tubaire et de la cavité péritonéale, est stérile. Ces deux secteurs sont séparés par le col de l'utérus (tiers inférieur de l'utérus) qui peut être considéré comme un véritable « verrou microbiologique » très efficace contre l'ascension des bactéries cervicovaginales. L'effet mécanique « chasse d'eau » de la glaire cervicale et des liquides biologiques qui s'écoulent de l'utérus vers le vagin, la sécrétion locale d'enzymes antibactériennes et l'extravasation et la production locale d'immunoglobulines constituent une barrière infranchissable par les bactéries commensales vaginales. Seuls trois agents sexuellement transmis, *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* et probablement *Mycoplasma genitalium*, possèdent des propriétés de virulence qui leur confèrent la capacité de franchir la barrière cervicale.

Le vagin est tapissé d'un épithélium malpighien non kératinisé qui comporte :

- une couche basale de cellules cubiques riche en mitoses ;
- une couche parabasale de cellules polyédriques ;
- une couche intermédiaire de cellules qui tendent à s'aplatir ;
- une couche superficielle de cellules aplaties (pavimenteuses) dont les noyaux deviennent pycnotiques jusqu'à la surface de l'épithélium. Ces cellules desquament abondamment dans le vagin.

Le milieu vaginal est composé d'une phase liquide, riche en eau et en substances d'origine plasmatique, et des constituants de la glaire cervicale. Les éléments solides et figurés du milieu vaginal sont des cellules vaginales superficielles exfoliées en grand nombre, des leucocytes en nombre modéré résultant surtout de la réponse inflammatoire d'un ectropion plus ou moins étendu, et des bactéries. La concentration bactérienne varie de $10^5$ à $10^{12}$ bactéries par gramme de sécrétion vaginale selon la nature de la flore.

La flore bactérienne dominante est composée d'une diversité de lactobacilles. Les espèces les plus souvent retrouvées sont *Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus jensenii* et *Lactobacillus iners*, mais de très nombreuses espèces différentes continuent à être décrites. La concentration usuelle des lactobacilles en l'absence de pathologie est située entre $10^5$ et $10^8$ bactéries par gramme de sécrétions vaginales. À l'examen d'un frottis des sécrétions vaginales grossièrement étalées sur une lame colorée par la coloration de Gram, on observe le plus souvent entre 10 et 100 lactobacilles par champ microscopique, avec des extrêmes situées de 1 à 1000 bactéries par champ microscopique. Parallèlement à cette flore dominante, la flore vaginale minoritaire comporte une grande diversité d'espèces dont certaines n'ont pas encore été nommées. Régulièrement, depuis l'avènement de la biologie moléculaire, les travaux sur l'écologie microbienne du vagin permettent la mise en évidence de ces espèces nouvelles – exemple récent, les espèces du genre *Atopobium*– qui enrichissent une liste déjà longue de bactéries commensales vaginales et dont la plupart ne sont pas – ou difficilement – identifiables par les méthodes

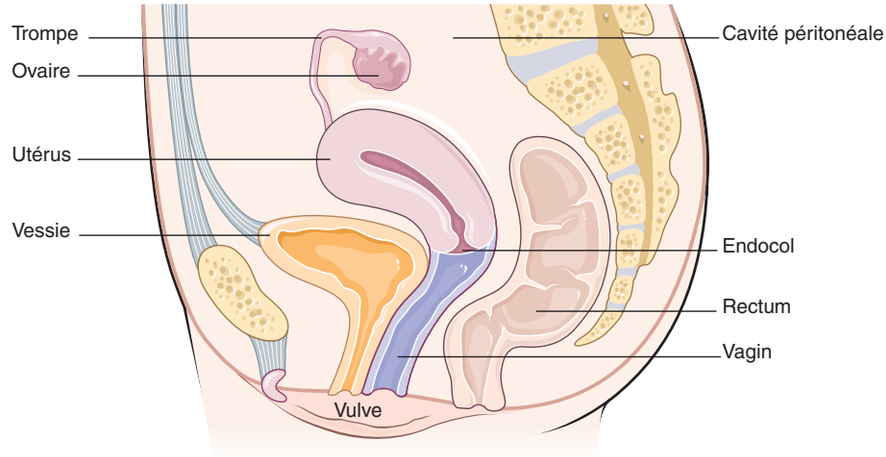



**Fig. 26.1.** – *Anatomie et microbiologie de l'appareil génital féminin.*
La vulve, le vestibule, le vagin et l'exocol sont colonisés par $10^5$ à $10^8$ bactéries par gramme de sécrétions génitales. Les lactobacilles sont divers et constituent la flore dominante. D'autres bactéries habituellement commensales de la flore digestive et de l'oropharynx colonisent physiologiquement le milieu vaginal et l'exocol. La cavité utérine et tubaire et le péritoine pelvien sont stériles.

de bactériologie classique après 48 heures de culture. Néanmoins, parmi elles, certaines espèces commensales doivent être connues et détectées en raison de leur intérêt médical. En effet, elles sont régulièrement impliquées dans des pathologies du tractus génital ou compliquent les situations gynécologiques ou obstétricales à risque infectieux. Issue des flores naturelles digestives et des flores oropharyngées de l'homme (tableau 26.1), cette

**TABLEAU 26-1**

**La flore vaginale normale est très diverse. Elle est constituée de $10^5$ à $10^8$ bactéries par gramme de sécrétions vaginales. Les bactéries d'intérêt médical peuvent être groupées en trois populations de bactéries définies en fonction de leur origine écologique.**

Groupe I – La flore bactérienne de portage habituel (flore dominante) est spécifiquement adaptée à la cavité vaginale : elle est essentiellement constituée de lactobacilles (flore de Doderlein) de 1 à 4 espèces/femme. Classiquement observables à la coloration de Gram sous la forme de gros bacilles à Gram positif, certaines espèces ont une apparence de bacilles à Gram positif plus fins voire coccoïdes en courtes chaînettes faisant penser à tort à des corynébactéries et des streptocoques.

Groupe II – La flore bactérienne issue de la flore digestive colonise souvent les voies génitales maternelles. Elle est observée chez 2 à 80 % des femmes selon les bactéries impliquées. Elle est constituée des éléments suivants :
– *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus*
– enterobactéries (*Escherichia coli* +++), mais aussi *Proteus, Morganella, Providencia, Klebsiella, Enterobacter* et *Serratia* en particulier chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies
– bacilles à Gram négatif aérobies strictes chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies ou ayant été colonisées par des produits contaminés : *Pseudomonas, Acinetobacter*, etc.
– staphylocoques coagulase + et –
– bactéries anaérobies (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Mobiluncus*, etc.)
– *Gardnerella vaginalis*
– *Atopobium vaginae*
– mycoplasmes, en particulier *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum*,
– streptocoques *viridans (S. acidominimus, S. intermedius, S. morbillorum*)
– *Candida albicans*

Groupe III : Des hôtes usuels de la flore oropharyngée colonisent plus exceptionnellement la cavité vaginale. Cela est observé chez 0,1 à 2 % des femmes selon les bactéries en cause. Toutes les bactéries oropharyngées peuvent être isolées de la cavité vaginale, mais le plus souvent il s'agit de :
– *Haemophilus influenzae* et *parainfluenzae*
– *Streptococcus pyogenes*
– *Streptococcus pneumoniae*
– méningocoque et autres *Neisseria, Branhamella, Capnocytophaga*

flore polymorphe et en constante évolution est peu développée à l'état physiologique et généralement pas visible à la coloration de Gram ($\leq 10^4$ bactéries par gramme de sécrétion vaginale), bien que repérable sur les milieux de culture. La nature et la composition en lactobacilles (1 à 4 espèces) varient dans le temps. En outre, les bactéries issues des autres écosystèmes humains peuvent trouver des conditions locales favorables très diverses. Cette diversité des tableaux microbiologiques est observable à la coloration de Gram, moyen le plus simple et le plus efficace en pratique médicale pour observer l'écologie microbienne du milieu vaginal.

Les conclusions pratiques sont les suivantes. La flore normale cervicovaginale est abondante et variée. Dans les prélèvements vaginaux, il est donc usuel d'observer un polymorphisme. La présence de bactéries pathogènes spécifiques (*Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* et probablement *Mycoplasma genitalium*) est toujours anormale. En revanche, la présence de pathogènes opportunistes (groupes II et III, tableau 26.1) doit être interprétée en fonction de la situation clinique des patientes, de la nature des bactéries et de leur rôle connu dans certains processus infectieux. Le haut appareil est stérile ; par conséquent, tout prélèvement fait à ce niveau sera facile à interpréter. Néanmoins, la richesse de la flore vaginale expose à un risque majeur de contamination de ces prélèvements utéro-annexiels lors de leur exécution par voie basse.

## Pathogenèse

### Pathologies infectieuses cervicovaginales

L'examen bactériologique de routine des sécrétions vaginales a pour but d'effectuer le diagnostic de quatre pathologies : mycoses, infections à *Trichomonas vaginalis*, vaginoses bactériennes et vaginites bactériennes.

#### *Mycose*

Les mycoses résultent le plus souvent de perturbations du milieu vaginal qui autorisent une prolifération de levures dont le portage naturel vaginal est de 15 à 20 % dans la population générale. Ces perturbations sont le plus souvent des facteurs liés à l'hôte (diabète, hygiène, sexualité, antibiothérapie, contraception inadaptée, perturbations hormonales, sida et autres pathologies sous-jacentes immunoperturbatrices, facteurs génétiques et psychiques, etc.). Souvent, les raisons des récidives de la pathologie sont non identifiables. Sans doute des facteurs liés à la levure jouent-ils un rôle. Les agents en cause les plus fréquents sont *Candida albicans* (85 à 90 % des cas), *Torulopsis glabrata* (femme enceinte), *Candida tropicalis* et parfois *Candida balanitis.* Quelle que soit l'espèce, la prolifération fongique libère en grande quantité dans le milieu des protéines allergisantes. Cela explique la symptomatologie d'allergie (érythème cutané de type « eczéma » avec prurit, hyperdesquamation cellulaire, œdème, etc.) et l'absence de réponse inflammatoire de l'hôte (frottis vaginal non inflammatoire : peu de leucocytes dans les sécrétions vaginales).

#### *Vulvovaginite à* Trichomonas vaginalis

Il s'agit d'une infection transmise sexuellement (ITS) par transmission de *T. vaginalis*. C'est le seul agent infectieux capable d'entraîner une inflammation d'origine infectieuse de la muqueuse vaginale chez la femme en période d'activité ovarienne ayant une trophicité vaginale normale (frottis vaginal inflammatoire : leucocytes en grand nombre dans les sécrétions vaginales).

#### *Vaginoses bactériennes*

Des syndromes et des tableaux microbiologiques comparables à ce que l'on appelle actuellement « vaginoses bactériennes » ont été publiés dès la fin du XIX$^{e}$ siècle et au début du XX$^{e}$ siècle. Il s'agit de perturbation de l'écologie microbienne du milieu vaginal qui induit une prolifération bactérienne polymorphe ($>10^8$/g de sécrétions vaginales) de bactéries usuellement présentes dans le vagin (tableau 26.2). Le nombre de bactéries est 100 à 100 000 fois plus élevé que ce que l'on observe lorsque la flore vaginale est normale.

De nombreux facteurs liés à l'hôte, en partie non identifiés, sont à l'origine des vaginoses. Parmi eux, on peut citer une augmentation du risque observé chez les patientes de niveau socioéconomique bas, chez les tabagiques, chez les femmes qui prennent 4 bains ou plus par semaine (OR = 2,7), chez les patientes qui pratiquent la

**TABLEAU 26-2**

**Principales bactéries de la flore vaginale normale retrouvées en grande quantité dans les tableaux de vaginose bactérienne et prévalence*,**.**

| *Bactéries* | *Flore normale* | *Vaginoses* |
|---|---|---|
| *Prevotella* | 40 % | 91 % |
| *Peptostreptococcus* | 60 % | 80 % |
| *G. vaginalis* | 11–69 % | 90 % |
| *M. curtisii* et *mulieris* | < 6 % | 14–96 % |
| *M. hominis* | 0–22 % | 24–75 % |
| *U. urealyticum* | 50 % | 50 % |
| *M. genitalium* | 10 % | < 10 % |
| *Atopobium vaginae* | 0–8 % | 40–70 % |

Mais aussi : *Streptococcus acidominus, S. intermedius, S. morbillorum, Atopobium rimae, Bifidobacterium urinalis, Leptotrichia amnionii, Sneathia sanguinegens*, etc.

* Pour une patiente donnée, ni la présence, ni la nature du germe ne permettent le diagnostic de vaginose. Le normal et le pathologique se différencient uniquement par l'abondance des bactéries observées.
** Prolifération > $10^8$/g, soit 100 à 100 000 fois la concentration normale avec une diminution des lactobacilles.

douche vaginale < 2 mois (OR = 3,6), lorsqu'il existe une ITS associée. Inversement, le risque est diminué chez les patientes qui prennent une contraception orale (OR = 0,5), des vitamines/suppléments nutritionnels (OR = 0,4) ; c'est dire l'impact probable de l'hygiène de vie.

Les flores de vaginose s'accompagnent d'une diminution réelle ou relative des lactobacilles et d'une production de métabolites bactériens allergisants ou irritants (putrescine, cadavérine, acide α-amino-n-butyrique, triméthylamine, succinates, butyrates, propionates, etc.). Comme au cours de la mycose, la symptomatologie est la conséquence d'une réaction allergique. Il n'y a pas de réponse inflammatoire de l'hôte (frottis vaginal non inflammatoire : peu de leucocytes dans les sécrétions vaginales).

### Vaginites bactériennes

Certaines bactéries commensales des muqueuses digestives ou buccopharyngées colonisent régulièrement la flore génitale (groupes II et III, tableau 26.1). Certaines opportunités (muqueuses vaginales immatures chez la fillette, ITS, ectropion étendu du col, trophicité vaginale altérée, notamment après la ménopause, traitements antibiotiques et hormonaux, etc.) et des propriétés invasives de certaines souches bactériennes favorisent la prolifération quasi exclusive d'une seule espèce bactérienne (le plus souvent *S. agalactiae, E. coli, S. aureus*, bactéries du groupe III) et la disparition de la flore du groupe I (tableau 26.1). L'agression des muqueuses se traduit par des lésions inflammatoires (frottis vaginal inflammatoire : leucocytes en grand nombre dans les sécrétions vaginales). La transmission par voie sexuelle de ces bactéries devient alors possible. Il s'agit d'un tableau clinique et microbiologique qui concerne surtout la fillette et la femme en privation hormonale. La réalité des vaginites bactériennes chez la femme en période d'activité génitale ou pendant la grossesse n'est pas prouvée. Il faut différencier effectivement cette entité du « portage génital » qui ne s'accompagne pas d'un tableau infectieux cervicovaginal et qui s'accompagne d'une cytologie vaginale normale.

### Portage vaginal

Le portage vaginal est une problématique quasi exclusive chez la femme enceinte [1] en raison des complications maternelles, fœtales et néonatales graves qui peuvent survenir à la rupture des membranes ou à l'ouverture du col avant terme ou lors de l'accouchement. Ces bactéries peuvent être nommées « bactéries vaginales à haut risque infectieux » (BVHRI) pour la mère et le nouveau-né. Le risque le mieux documenté concerne le portage de *S. agalactiae*, d'*E. coli, Haemophilus* sp., de *S. aureus, S. pneumoniae, S. pyogenes* et *N. meningitidis.*

## Pathologies infectieuses de l'utérus et des trompes

Les pathologies utéro-annexielles se divisent en endocervicites et infections utéro-annexielles (endométrites ± salpingites).

### Endocervicites

Trois espèces bactériennes – *N. gonorrhoeae, C. trachomatis* biovar Trachoma sérovars D, Da, E, F, G, H, I, IA, J et K ET DE ET et *M. genitalium* – sont capables de franchir la barrière cervicale et d'infecter les cryptes glandulaires, entraînant une endocervicite. Acquises par voie sexuelle, elles infectent l'endocol et parallèlement l'urètre.

### Infections utéro-annexielles

Ces infections peuvent succéder à une endocervicite *N. gonorrhoeae, C. trachomatis* et *M. genitalium.* En outre, lorsqu'il existe une situation à risque qui induit une déficience du verrou microbiologique du col, les bactéries vaginales des groupes II et III (tableau 26.1) peuvent gagner la cavité utérine pour s'y multiplier et créer une endométrite ou une pyométrie, voire gagner la cavité tubaire, créant une salpingite, et le péritoine pelvien, induisant une pelvipéritonite. Ces infections utéro-annexielles surviennent lorsque la patiente a une pathologie sous-jacente (malformations utérines, polype accouché par le col, cancer de l'endomètre), ou succèdent à des manœuvres gynécologiques par voie basse (stérilet, hystéroscopie, hystérosalpingographie, etc.), ou dans le postpartum ou le postabortum.

# Diagnostic bactériologique

## Prélèvements

La nature des prélèvements à examiner dépend du diagnostic clinique (tableau 26.3).

Le bactériologiste dispose des instruments suivants : spéculum de différentes tailles, pinces longuettes, écouvillons stériles (en coton, en plastique, en alginate, etc.), compresses stériles, flacon d'antiseptique unidose (chlorhexidine, Bétadine®), eau salée stérile unidose, gants ou doigtiers. La patiente est en position gynécologique.

### Prélèvements vulvaires

On imbibe les écouvillons avec de la solution saline à 0,9 % stérile. À l'aide de ces écouvillons, on prélève en frottant sur les lésions.

### Prélèvements dans le vagin, sur l'exocol et dans l'endocol

L'utilisation d'un spéculum n'est actuellement plus nécessaire dans beaucoup de circonstances cliniques. En effet, le prélèvement vaginal sans spéculum ou l'autoprélèvement vaginal permettent un recueil des sécrétions tout à fait satisfaisant pour une analyse bactériologique de qualité afin d'étayer le diagnostic des pathologies infectieuses vaginales, de rechercher *Neisseria gonorrhoeae,*

**TABLEAU 26-3**

**Nature des prélèvements génitaux à réaliser chez la femme en fonction du diagnostic clinique.**

| *Diagnostic clinique* | *Siège du prélèvement* | *But de l'examen* |
|---|---|---|
| Lésions vulvaires | Prélèvement vulvaire | – Recherche essentiellement de :<br>• levures<br>• staphylocoques<br>• streptocoques |
| Atteinte vaginale et/ou exocervicale ou Dépistage systématique au cours de la grossesse ou pour le dépistage de masse | Prélèvement vaginal et/ou exocervical | – Étayer les diagnostics suivants :<br>• mycose<br>• infection à *T. vaginalis*<br>• vaginose bactérienne<br>• vaginite bactérienne<br>– Pendant la grossesse, le prélèvement vaginal peut être indiqué pour rechercher les BVHRI[a]<br>– Pour le dépistage de masse, l'autoprélèvement vaginal peut être effectué pour :<br>• le dépistage de la vaginose bactérienne<br>• la recherche de *S. agalactiae*<br>• les recherches de *C. trachomatis*, de gonocoque et de *M. genitalium* par TAAN[b] |
| Suspicion d'endocervicite | Prélèvement endocervical et prélèvement vaginal pour TAAN[b] (à coupler avec un prélèvement d'urine ou urétral) | – Recherche de :<br>• gonocoque<br>• *Chlamydiae*<br>• *M. genitalium* |
| Endométrite, pyométrie | – Prélèvement endocervical + vaginal pour les TAAN[b] si suspicion d'ITS[c]<br>– Prélèvement endo-utérin :<br>• stérilet<br>• produits de curetage<br>• produits d'aspiration<br>• biopsie d'endomètre<br>• pus d'évacuation des pyométries | – Recherche de :<br>• si risque d'ITS[c] : idem endocervicite<br>• si circonstances cliniques à risque (stérilet, investigation endo-utérine, postpartum, postabortum) : toutes bactéries des groupes II et III (tableau 26.1)<br>– Biopsie d'endomètre : à la demande, recherche de BK |
| Salpingites et suppurations pelviennes | – Prélèvement endocervical strict + vaginal pour les TAAN[b]<br>– Prélèvement endo-utérin (identique aux précédents)<br>– Prélèvement tubaire<br>– Prélèvements péritonéaux | – Recherche de :<br>• gonocoque<br>• *Chlamydiae*<br>• *M. hominis* et *genitalium, Ureaplasma*<br>• toutes bactéries des groupes II et III (tableau 26.1) |

[a] BVHRI : bactéries vaginales à haut risque infectieux.
[b] TAAN : tests d'amplification de l'acide nucléique.
[c] ITS : infection transmise sexuellement.

*Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium* par les tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN) et pour dépister les BVHRI. En revanche, lorsque le prélèvement d'endocol est justifié (endométrites, salpingites), la mise en place du spéculum est nécessaire.

## Mise en place du spéculum

On choisira la taille du spéculum en fonction de l'âge, de la parité de la femme (par exemple, spéculum 25 × 90 chez la femme nullipare ou la femme âgée ; spéculum 35 × 90 chez la multipare). On maintient les petites lèvres écartées avec deux doigts de la main gauche. En évitant la zone sous-urétrale sensible et le clitoris, on introduit le spéculum en appuyant sur la fourchette, soit perpendiculairement à l'axe de la vulve directement dans le plan de la cavité vaginale, soit parallèlement à l'axe de la vulve en tournant de 90° tout en l'enfonçant pour le ramener dans le plan de la cavité vaginale. Après introduction sur 5 à 6 cm, l'ouverture légère du spéculum permet un contrôle visuel de sa progression vers le sacrum selon un axe de 45° par rapport au plan de la table. Dès visualisation du col, on écarte avec la vis les deux valves qui se placent, l'une dans le cul-de-sac antérieur, l'autre dans le cul-de-sac postérieur, exposant correctement le col. Lorsque le col n'est pas visible, il faut le rechercher ailleurs, plus haut sous la symphyse si l'utérus est rétroversé, ou plus profondément en prenant un spéculum plus long. Lorsque le spéculum est bien en place, il convient d'être bien éclairé pour faire des prélèvements convenables.

### Prélèvements dans le vagin

Les prélèvements vaginaux se font là où la femme se plaint, sur les lésions observées ou là où les sécrétions sont anormales, avec des écouvillons en coton stériles, en ramenant la plus grande quantité possible de sécrétions. Si les lésions sont près du col, il est souhaitable de « moucher » le col avant de prélever pour ne pas charger l'écouvillon de la glaire cervicale qui ne reflète pas bien le milieu vaginal.

En l'absence de lésions patentes de la muqueuse – ce qui est souvent le cas –, il faut charger l'écouvillon d'un maximum de sécrétions soit en prélevant sans spéculum dans le vestibule puis dans la première partie du vagin, soit au retrait du spéculum lorsque les parois antérieure et postérieure du vagin s'appliquent l'une contre l'autre. L'idéal est de réaliser deux écouvillons. Avec l'un des deux, on effectue un étalement grossier sur lame que l'on fixe avec un fixateur cytologique en bombe, puis on adresse la lame dans un porte-lame si le prélèvement doit être transporté.

### Autoprélèvement vaginal

L'autoprélèvement vaginal est bien accepté par les patientes, en particulier lorsqu'elles se déplacent au laboratoire. Une note explicative est remise à la patiente (fig. 26.2). La femme dispose d'un écouvillon en tube stérile. Après avoir enlevé l'écouvillon du tube, en position debout, elle introduit l'écouvillon dans le vagin en écartant les grandes lèvres, puis elle remet l'écouvillon dans le tube. Deux écouvillons peuvent être réalisés : l'un pour l'état frais et la coloration de Gram, l'autre pour les cultures.

### Prélèvements dans l'endocol

Ce prélèvement est rarement réalisé correctement, ce qui rend relatif le résultat des études évaluant ses performances. Il s'agit pourtant du seul prélèvement endo-utérin d'accès facile qui permet d'obtenir des informations au cours des infections utéro-annexielles dues aux bactéries opportunistes d'origine vaginale. Il faut, avant tout, faire un nettoyage soigneux de l'exocol à l'aide d'une pince longuette et d'une compresse imbibée de chlorhexidine ou Bétadine® solution vaginale. Laisser agir une minute puis faire une deuxième application et, après une minute, rincer avec une compresse imbibée de sérum physiologique. Cette désinfection est absolument primordiale pour que le prélèvement d'endocol soit informatif dès lors qu'il s'agit d'étayer le diagnostic d'une infection utéro-annexielle ou d'une chorioamniotite dans les situations à risque (stérilet, postpartum, etc.). En effet, les bactéries responsables de ces infections hautes sont des commensales du vagin ; toute contamination vaginale fausse le résultat. On introduit l'écouvillon stérile jusque dans la cavité fusiforme de l'endocol et, par un frottement léger et prolongé, on ramène de la glaire cervicale et des cellules endocervicales. Il est indiqué de faire plusieurs prélèvements, l'un avec un écouvillon-coton pour la recherche des bactéries d'origine vaginale et de *N. gonorrhoeae* par culture ; l'autre avec un écouvillon en dacron, ou une brosse cytologique, pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium* par les TAAN. Si une recherche de mycoplasmes par culture est nécessaire (infections utero-annexielles), il faut faire un troisième écouvillon.

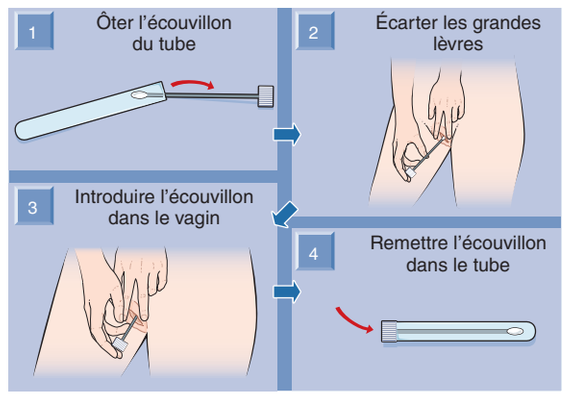



**Fig. 26.2.** – *Autoprélèvement vaginal.*
Il peut être utilisé pour le dépistage de la vaginose bactérienne, ou de *S. agalactiae* ou de *C. trachomatis* (diagnostic par tests d'amplification des acides nucléiques [TAAN]). Ici, la fiche remise aux femmes enceintes dans le Nord-Pas-de-Calais pour le dépistage de la vaginose bactérienne.

### Prélèvements urétraux

En enlevant le spéculum, il arrive qu'une goutte de pus s'écoule du méat urétral. Cette goutte, ou la goutte obtenue par massage rétrosymphysaire, est recueillie sur un écouvillon pour recherche de *N. gonorrhoeae, C. trachomatis* et des mycoplasmes.

S'il existe des signes cliniques ou des facteurs de risque d'ITS, il est toujours indiqué de faire un prélèvement dans le canal urétral en introduisant sur environ 1 cm un petit écouvillon-coton pour la recherche de *N. gonorrhoeae* et de mycoplasmes, puis un petit écouvillon-dacron pour la recherche de *C. trachomatis*. Ce prélèvement peut être associé à, ou remplacé, par un prélèvement d'urine si on utilise des TAAN comme moyens diagnostiques. Dans ce dessein, les urines peuvent être prélevées à tout moment si la patiente n'a pas uriné depuis au moins 2 heures. Il faut lui demander de recueillir les 10 à 20 premiers millilitres de la miction.

## *Autres prélèvements*

### Prélèvements du haut appareil génital

Le gynécologue pourra adresser au laboratoire de bactériologie d'autres prélèvements obtenus par voie basse, tels que stérilet, biopsie d'endomètre, produit de curetage, évacuation de pyométrie, produit de ponction du cul-de-sac de Douglas (culdocentèse). Dans ce cas, il faut se rappeler que l'analyse correcte de ces prélèvements exige une antisepsie correcte (application large d'un antiseptique en deux temps pendant au moins 2 minutes) du col

pour éviter les souillures cervicovaginales. Le gynécologue réalise, en outre, des prélèvements par voie haute par cœlioscopie (prélèvements tubopéritonéaux) ou par laparotomie.

### Prélèvements à l'orifice de la glande de Bartholin

Il convient de désinfecter la région péri-orificielle, puis de recueillir le pus qui s'écoule après une pression douce sur la glande.

### Prélèvements au niveau d'une ulcération génitale

Après repérage de l'ulcération, on prélève d'abord par écouvillonnage (recherche de levures, *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*) puis par grattage avec un vaccinostyle après avoir débarrassé la lésion des tissus nécrosés. Les sérosités qui apparaissent après grattage sont prélevées pour cultures et examen au microscope à fond noir pour le diagnostic de la syphilis. En dehors de la syphilis, il ne faut pas méconnaître la première cause des ulcérations génitales, les virus *Herpes simplex* de type 1 ou 2 (HSV-1 ou HSV-2) qui nécessitent l'utilisation d'un milieu de transport spécifique. D'autres pathologies sont moins fréquentes : ulcérations génitales à *Haemophilus ducreyi* (chancre mou), à *Chlamydia trachomatis* de sérotype L1, L2 ou L3 (lymphogranulomatose vénérienne) et *Klebsiella granulomatis* (donovanose). Pour rechercher *H. ducreyi*, il faut prélever la base de l'ulcère en évitant le pus avec un écouvillon monté avec du coton ou de l'alginate de calcium, ou aspirer les bubons.

## Transport, stockage

Le diagnostic des pathologies infectieuses bactériennes vaginales s'effectue avant tout à l'examen direct. Le prélèvement vaginal ne nécessite pas l'utilisation de milieu de transport s'il peut être transmis rapidement au laboratoire. S'il doit être conservé une douzaine d'heures au maximum au réfrigérateur, il faut éviter sa dessiccation et ne pas hésiter à mettre quelques gouttes d'eau salée à 0,9 % stérile dans le fond du tube. Si un frottis a été réalisé, il faut le transporter dans un porte-lame.

En revanche, les prélèvements réalisés au niveau du haut appareil génital, endocol compris, doivent permettre de mettre en évidence des bactéries fragiles, capnophiles et anaérobies. En conséquence, ces prélèvements doivent être transportés rapidement pour être ensemencés le plus rapidement possible. Sinon, il faut utiliser des milieux de transport de type Portagerm® ou TGVanaer® et se conformer aux conditions de stockage préconisées par le fabricant (température ambiante ou 4 °C). Pour les *Chlamydiae*, il faut utiliser les milieux de transport fournis avec les kits de prélèvement.

Les prélèvements d'ulcérations génitales doivent être effectués au laboratoire pour être examinés extemporanément.

## Éléments non bactériologiques du diagnostic : la cytologie

L'existence d'un « ectropion physiologique » du col chez beaucoup de femme s'accompagne d'une réaction inflammatoire en réponse à l'acidité vaginale qui se traduit par la présence de polynucléaires dans la glaire cervicale sur l'exocol. Il est donc impératif, pour éviter des faux positifs quant à une cytologie inflammatoire, de moucher le col avant tout prélèvement vaginal dans la région du col et avant tout prélèvement endo-utérin par voie basse, endocol compris.

### *Examen cytologique du prélèvement vaginal*

Cet examen s'effectue entre lame et lamelle et après coloration. Pour l'examen à l'état frais, on dépose sur une lame une goutte de sécrétions vaginales mélangées avec quelques gouttes de solution saline et on recouvre d'une lamelle. La préparation est observée à l'objectif à sec. Les colorations de Gram et/ou de Giemsa aident à préciser la cytologie. Cet examen met en évidence les cellules vaginales et les polynucléaires. Il a une valeur primordiale. On peut compter le nombre de cellules épithéliales et de leucocytes par champs microscopiques sur une dizaine de champs et faire la moyenne. Le résultat transmis peut être succinct mais doit informer le clinicien par une conclusion nette sur l'aspect inflammatoire ou non du frottis (fig. 26.3). Un frottis inflammatoire est un frottis sur lequel les polynucléaires constituent l'essentiel de la préparation. Sinon, dès lors que les cellules vaginales des couches superficielles sont visibles, le frottis doit être considéré comme non inflammatoire quel que soit le nombre de polynucléaires. Ceux-ci peuvent être nombreux, par exemple au cours de la grossesse normale ou en deuxième partie de cycle.

### *Examen cytologique effectué sur les prélèvements utero-annexiels, endocol inclus*

Cet examen s'effectue après coloration d'un frottis du produit pathologique par la méthode de Gram ou en utilisant une coloration cytologique (May-Grünwald-Giemsa), ou après coloration par les deux méthodes. Son résultat a une valeur relative. L'abondance des polynucléaires est très en faveur d'un processus infectieux. En revanche, l'absence de ces cellules ne permet pas d'exclure une infection.

## Démarches du diagnostic direct sur le produit pathologique

La démarche générale utilisée en routine est schématisée sur la figure 26.4.

### *Prélèvement vulvaire*

L'examen direct n'apporte que peu de renseignements. Néanmoins, dans les mycoses vulvaires, la présence de levures à l'examen direct signe le diagnostic.

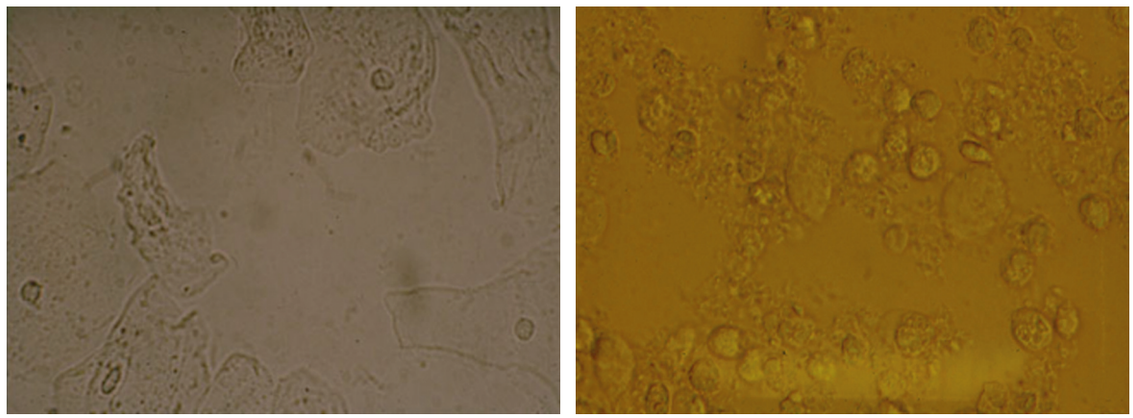


**Fig. 26.3.** – *Examen cytologique d'un prélèvement vaginal à l'état frais.*
Le plus souvent, le frottis est non inflammatoire (à gauche) au cours des pathologies vaginales les plus fréquentes (mycoses et vaginoses). Beaucoup plus rarement, le frottis est inflammatoire (à droite). C'est le cas au cours des infections à *Trichomonas vaginalis* et des rares vaginites bactériennes.

En présence de lésions inflammatoires vulvaires, la mise en culture doit utiliser des milieux qui permettent d'identifier les cultures abondantes de levures (par exemple milieu de Sabouraud sélectif), *S. aureus* (par exemple milieu gélosé de Chapman) et *S. pyogenes* (gélose au sang).

Il existe un cas particulier : chez la petite fille, un ensemencement sur gélose chocolat enrichie, incubée pendant 24 heures sous $CO_2$, permet l'isolement de gonocoques, d'autres *Neisseria*, et des bactéries capnophiles parfois responsables de vulvovaginites. Chez la femme, on préférera, pour ces recherches, des prélèvements vaginaux, endocervicaux, urétraux et urinaires.

### *Prélèvement vaginal*

L'examen d'un prélèvement vaginal nécessite les renseignements cliniques suivants : grossesse ou non, ITS suspectée ou non.

En effet, le prélèvement vaginal a trois objectifs :

- chez la femme symptomatique, rechercher une cause à une pathologie infectieuse vaginale. Dans ce cadre, l'examen bactériologique de routine doit porter le diagnostic de : mycose, infection à *T. vaginalis*, vaginose, et exceptionnellement vaginite bactérienne chez la petite fille essentiellement. L'ensemble de ces pathologies se diagnostique par l'examen direct qui, par conséquent, doit être minutieux et prolongé ;
- chez la femme asymptomatique, rechercher un BVHRI. Cette recherche n'a fait la preuve de son utilité, actuellement, qu'au cours de la grossesse. En dehors de cette circonstance, l'asepsie chirurgicale paraît suffisante pour éviter les infections hautes chez les femmes porteuses asymptomatiques, à condition qu'elle soit réalisée correctement et que l'antiseptique soit appliqué en deux temps et puisse agir suffisamment longtemps avant l'acte invasif. La recherche de BVHRI chez la femme enceinte nécessite la mise en culture car ces bactéries sont rarement visibles à la coloration de Gram, quelle que soit la densité apparente de la culture (densité inférieure à $10^4$ bactéries/gramme). Ces cultures doivent pouvoir mettre en évidence toutes les BVHRI si la femme enceinte est en situation à risque infectieux (rupture prématurée des membranes, menace ou accouchement prématuré) et spécifiquement *S. agalactiae*, s'il s'agit d'une recherche systématique à 35/37 semaines d'aménorrhée au cours d'une grossesse qui évolue normalement (recommandations nationales) ;
- chez la femme suspecte d'ITS ou si on diagnostique une infection à *T. vaginalis*, le prélèvement vaginal peut faire l'objet d'une recherche de *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium* par l'emploi de TAAN. Dans ce cas, il faut parallèlement examiner les urines du premier jet et éventuellement l'endocol.

## Traitement de l'échantillon

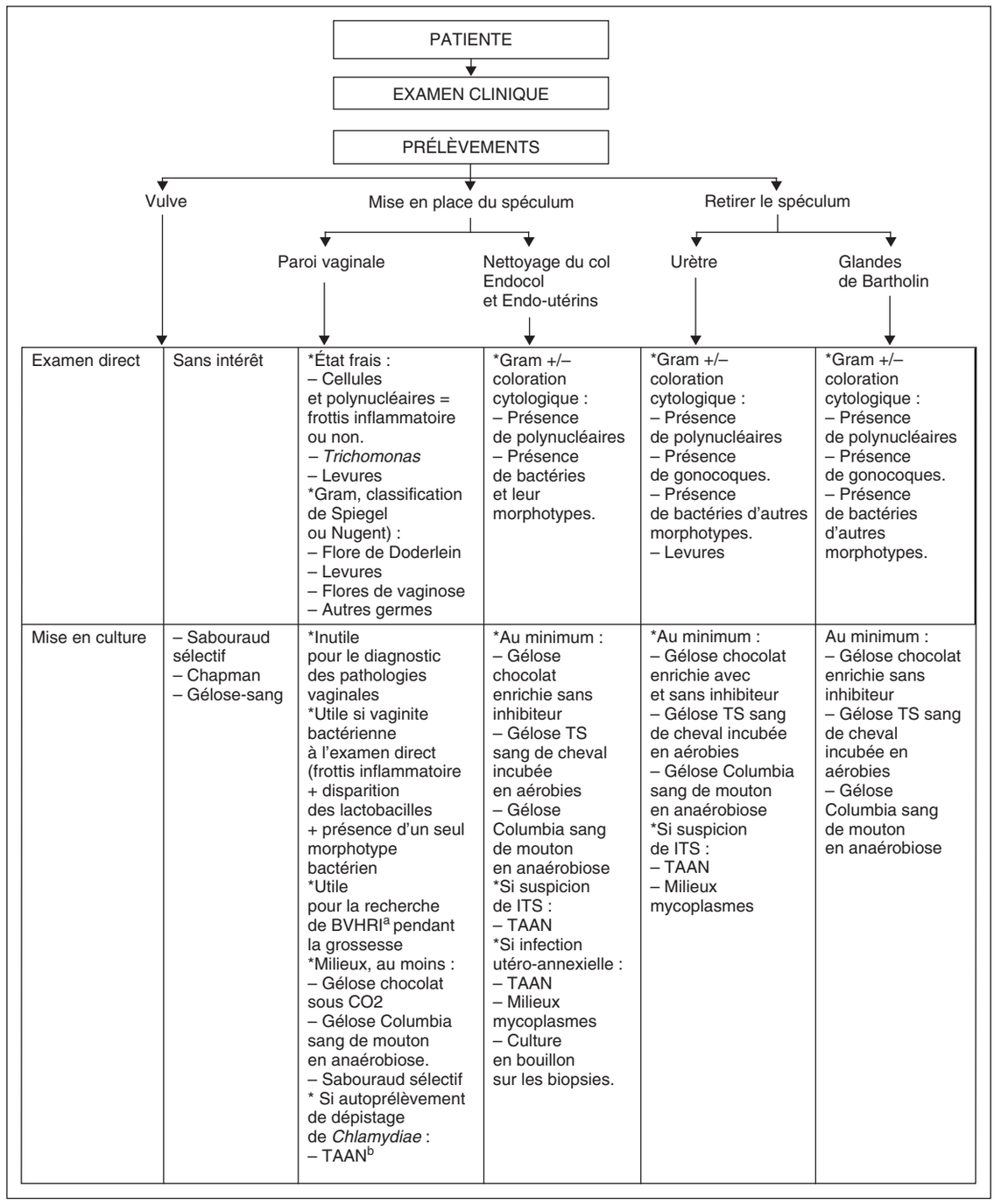
L'échantillon doit être préparé pour pouvoir effectuer un examen direct et si nécessaire des cultures. Quelques gouttes d'eau salée à 0,9 % sont déposées dans le tube pour imbiber l'écouvillon. Si l'on ne dispose pas de deux écouvillons, les cultures seront réalisées en premier, puis les lames pour l'état frais et l'examen après coloration de Gram seront préparées.

## Examen direct et interprétation des résultats

La démarche diagnostique est résumée sur la figure 26.5.

### *État frais*

Sur une lame, une goutte de sécrétion vaginale est mélangée avec une goutte de solution saline et recouverte d'une lamelle. La préparation est observée à l'objectif à sec. Cet examen met en évidence les cellules vaginales et les polynucléaires, la mobilité de *Trichomonas* (fig. 26.6) et




| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Examen direct | Sans intérêt | *État frais :<br>– Cellules et polynucléaires = frottis inflammatoire ou non.<br>– *Trichomonas*<br>– Levures<br>*Gram, classification de Spiegel ou Nugent) :<br>– Flore de Doderlein<br>– Levures<br>– Flores de vaginose<br>– Autres germes | *Gram +/– coloration cytologique :<br>– Présence de polynucléaires<br>– Présence de bactéries et leur morphotypes. | *Gram +/– coloration cytologique :<br>– Présence de polynucléaires<br>– Présence de gonocoques.<br>– Présence de bactéries d'autres morphotypes.<br>– Levures | *Gram +/– coloration cytologique :<br>– Présence de polynucléaires<br>– Présence de gonocoques.<br>– Présence de bactéries d'autres morphotypes. |
| Mise en culture | – Sabouraud sélectif<br>– Chapman<br>– Gélose-sang | *Inutile pour le diagnostic des pathologies vaginales<br>*Utile si vaginite bactérienne à l'examen direct (frottis inflammatoire + disparition des lactobacilles + présence d'un seul morphotype bactérien<br>*Utile pour la recherche de BVHRI[a] pendant la grossesse<br>*Milieux, au moins :<br>– Gélose chocolat sous CO2<br>– Gélose Columbia sang de mouton en anaérobiose.<br>– Sabouraud sélectif<br>* Si autoprélèvement de dépistage de *Chlamydiae* :<br>– TAAN[b] | *Au minimum :<br>– Gélose chocolat enrichie sans inhibiteur<br>– Gélose TS sang de cheval incubée en aérobies<br>– Gélose Columbia sang de mouton en anaérobiose<br>*Si suspicion de ITS :<br>– TAAN<br>*Si infection utéro-annexielle :<br>– TAAN<br>– Milieux mycoplasmes<br>– Culture en bouillon sur les biopsies. | *Au minimum :<br>– Gélose chocolat enrichie avec et sans inhibiteur<br>– Gélose TS sang de cheval incubée en aérobies<br>– Gélose Columbia sang de mouton en anaérobiose<br>*Si suspicion de ITS :<br>– TAAN<br>– Milieux mycoplasmes | Au minimum :<br>– Gélose chocolat enrichie sans inhibiteur<br>– Gélose TS sang de cheval incubée en aérobies<br>– Gélose Columbia sang de mouton en anaérobiose |

**Fig. 26.4.** – *Examen direct et mise en culture des principaux prélèvements génitaux réalisés chez la femme.*
[a] BVHRI : bactéries vaginales à haut risque infectieux. [b] TAAN : tests d'amplification de l'acide nucléique.

les levures (fig. 26.7). La mobilité du *Trichomonas* peut n'être visible qu'après avoir laissé réchauffer la préparation. Il faut garder à l'idée qu'un frottis inflammatoire est avant tout le résultat d'une infection à *Trichomonas* qu'il faudra rechercher avec pugnacité.

Au cours de l'infection à *T. vaginalis*, le frottis est inflammatoire. Au cours des mycoses, le frottis est non inflammatoire dans la grande majorité des cas.

### *Coloration de Gram*

L'idéal est d'effectuer la coloration de Gram sur un frottis réalisé par étalement des sécrétions vaginales au moment où l'on prélève. Sinon, on peut soit laisser sécher la lame qui a servi pour l'examen à l'état frais après avoir enlevé la lamelle, soit pratiquer un étalement grossier assez dense sur une nouvelle lame avant de pratiquer une coloration de Gram.

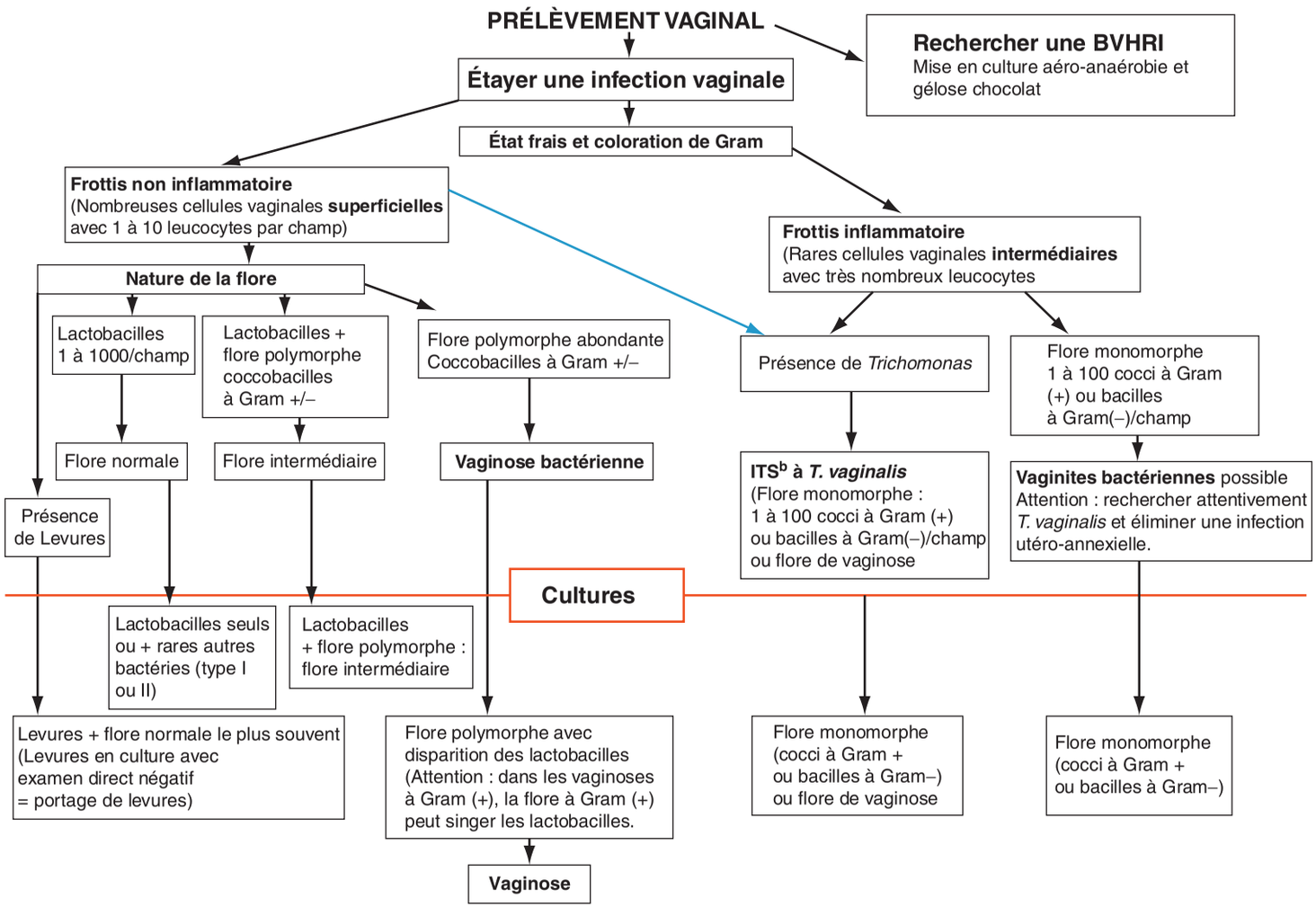



**Fig. 26.5.** – *Logigramme de prise en charge et d'interprétation du prélèvement vaginal. BVHRI : bactéries vaginales à haut risque infectieux; ITS : infection transmise sexuellement.*

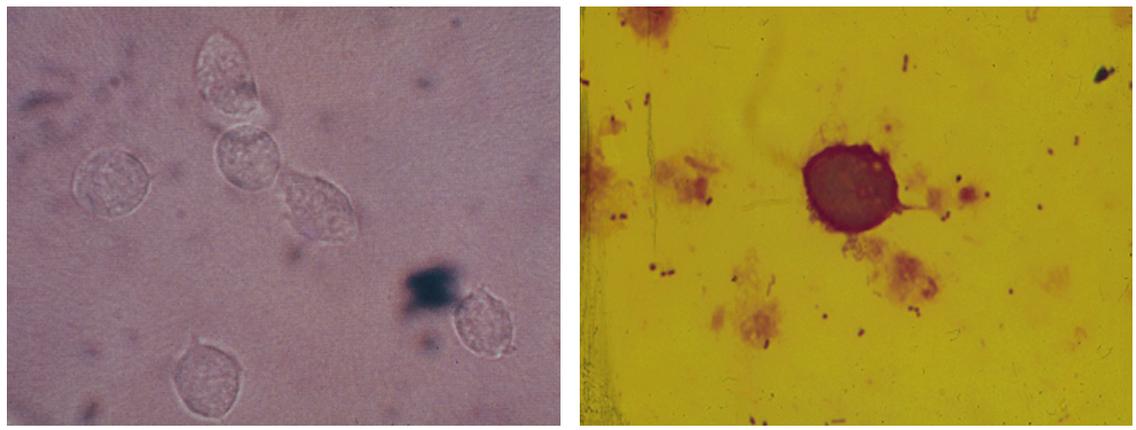


**Fig. 26.6.** – *Mise en évidence de* Trichomonas vaginalis *sur un prélèvement vaginal à l'état frais et après coloration.*
Le frottis est inflammatoire. *Trichomonas vaginalis* est un flagelle d'aspect piriforme, long de 10 à 15 µ, large de 7 à 10 µ, présentant à la partie antérieure 3 à 5 flagelles dirigés en avant, et 1 flagelle dirigé en arrière et accolé au corps ; ce flagelle ainsi accolé produit une sorte de membrane ondulante. Il y a des vacuoles dans le protoplasme. À l'état frais, entre lame et lamelle, le *Trichomonas* est mobile et ses flagelles provoquent des mouvements d'ondes autour du corps. Après coloration, le *Trichomonas* se distingue par sa taille, ses vacuoles et la présence de flagelles. La coloration montre une flore vaginale très perturbée – ici, une flore monobactérienne de cocci à Gram positif. On ne fera pas d'identification ni d'antibiogramme, sauf si la flore d'accompagnement est une BVHRI chez une femme enceinte.

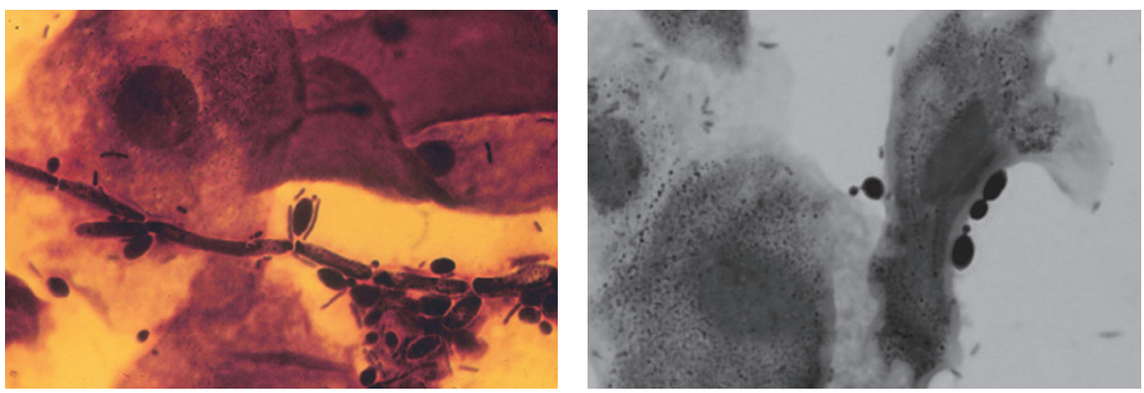


**Fig. 26.7.** – *Mise en évidence de levures sur un prélèvement vaginal à l'examen direct.*
*Candida albicans* est la levure la plus souvent impliquée. Il s'agit d'un champignon unicellulaire qui se reproduit par bourgeonnement. À l'état frais, entre lame et lamelle, il se reconnaît sous la forme de cellules de 2 à 4 µ, ovales ou rondes et bourgeonnantes, accompagnées de filaments mycéliens. *Torulopsis glabrata*, autre agent fréquent des mycoses vulvovaginales, ne filamente pas. Sur le frottis, les sécrétions vaginales mycosiques contiennent habituellement peu de polynucléaires et de très nombreuses cellules épithéliales desquamées. Après coloration, les levures apparaissent plutôt Gram positif et, comme ici, la flore vaginale est généralement composée quasi exclusivement de lactobacilles (grade I de Spiegel ou score de 0 à 3 de Nugent).

Cet examen permet de préciser la cytologie, de confirmer la présence des levures et de juger de l'aspect de la flore bactérienne vaginale. La flore vaginale sera classifiée selon la classification de Spiegel ou le score de Nugent qui permet d'indiquer l'aspect normal de la flore vaginale ou de faire le diagnostic des fréquentes (7 à 8 % de femmes dans les études françaises) vaginoses bactériennes (tableaux 26.4 et 26.5).

- *Diagnostic des infections à T. vaginalis.* Au cours des infections à *T. vaginalis* (fig. 26.6), le frottis est quasi exclusivement composé de polynucléaires. La flore vaginale d'accompagnement est soit de type « vaginose bactérienne » (voir ci-après), soit monobactérienne. Dans ces deux cas, on n'identifiera pas les bactéries observées et on ne pratiquera pas d'antibiogramme, sauf si la flore d'accompagnement comprend une BVHRI chez une femme enceinte. Le traitement de l'infection à *T. vaginalis* s'accompagnera généralement d'un rééquilibrage de la flore vaginale vers un grade I de Spiegel ou un score de 0 à 3 de Nugent (tableaux 26.4 et 26.5).
- *Diagnostic des mycoses.* Au cours des mycoses (fig. 26.7), la cytologie vaginale est non inflammatoire et le diagnostic de mycose est affirmé par la présence

**TABLEAU 26-4**

**Classification de la flore vaginale à partir de la proposition de Spiegel*.**

| *Classification* | *Aspect à la coloration de Gram* | *Interprétation* |
|---|---|---|
| Grade I | Large prédominance de lactobacilles | Flore normale |
| Grade II | Équilibre entre les lactobacilles et les autres morphotypes | Flore intermédiaire |
| Grade III | Disparition ou diminution des lactobacilles et prolifération des autres morphotypes | Flore de vaginose |

* D'après Spiegel CA. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol* 1983 ; 18 : 170-7.

de levures. Rappelons que le diagnostic de mycose se définit par un examen direct positif. L'isolement de levures à la culture avec un examen direct négatif, quelle que soit la densité apparente de la culture, définit le portage (15 à 20 % des femmes). La flore bactérienne vaginale est généralement de bonne qualité, de grade I de Spiegel ou de score 0 à 3 de Nugent au cours des mycoses, c'est-à-dire composée quasi exclusivement de lactobacilles.

- *Diagnostic des vaginoses bactériennes.* Les bactéries des vaginoses bactériennes sont nombreuses (tableau 26.2) [5]. Elles ne doivent être ni cultivées ni identifiées à partir des prélèvements vaginaux. Un consensus quasi mondial existe depuis les années 1980. Le diagnostic de vaginose bactérienne s'effectue par la coloration de Gram en utilisant la classification de Spiegel ou le score de Nugent (tableaux 26.4 et 26.5) et non par la culture bactérienne. Néanmoins, nous rappelons les principales caractéristiques de certaines bactéries impliquées, car nombre d'entre elles peuvent êtres isolées de prélèvements utéro-annexiels au cours des infections génitales hautes ou de chorioamniotites. Ces infections surviennent en effet plus souvent chez les femmes atteintes de vaginose, en particulier sur stérilet ou dans le postpartum (tableau 26.6). La flore de vaginose correspond au grade III de Spiegel ou à un score de 7 à 10 de Nugent. Le diagnostic de vaginose est en réalité assez facile puisque la quantité de bactéries est 100 à 100 000 fois plus élevée que dans la flore normale. La prolifération bactérienne polymorphe est donc un critère majeur du diagnostic quelle que soit la nature des bactéries observées dans cette pathologie. À l'observation des lames, il existe des tableaux de vaginoses d'une grande diversité (fig. 26.8). Dans certains tableaux prédominent les bacilles à Gram négatif (*Gardnerella*, bacilles à Gram négatif anaérobies). Dans d'autres prédominent les *Mobiluncus* ou les bactéries à Gram positif (*Peptostreptococccus*, streptocoques *viridans, Atopobium*) et les mycoplasmes. Quoi qu'il en soit, le diagnostic repose sur la présence massive de bactéries polymorphes dans la cavité vaginale parfaitement identifiable par la coloration de Gram. De nouveaux moyens diagnostiques de la vaginose bactérienne sont à l'étude. Il s'agit par exemple de l'utilisation de la PCR quantitative ciblant *Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae* et *Prevotella*, mais le rapport coût/efficacité par rapport à la coloration de Gram mérite d'être évalué. D'autres méthodes cherchent à mettre en évidence les métabolites produits par l'abondante flore microbienne du milieu vaginal.
- *Diagnostic de vaginite bactérienne.* Cette pathologie est quasi inexistante chez la femme en période d'activité ovarienne. Elle est le fait plus particulièrement de la petite fille chez laquelle, parfois, la pathologie révèle l'existence d'un corps étranger associé ; on la retrouve

**TABLEAU 26-5**

**Score permettant la classification de la flore vaginale, établi à partir de la proposition de Nugent et al.*. L'observation se fait à la coloration de Gram (objectif à immersion 1000×).**

| *Score*[a,b] | *Lactobacilles* | *Nombreux bacilles à Gram positif/négatif qui correspondent à la prolifération polybactérienne des bactéries rapportées tableau 26.2* | *Bacilles incurvés qui correspondent aux* Mobiluncus |
|---|---|---|---|
| 0 | 4+ | 0 | 0 |
| 1 | 3+ | 1+ | 1+ ou 2+ |
| 2 | 2+ | 2+ | 3+ ou 4+ |
| 3 | 1+ | 3+ | |
| 4 | 0 | 4+ | |

* Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 297-301.

[a] Les morphotypes bactériens (moyenne sur plusieurs champs microscopiques) sont codifiés de la façon suivante : 0, absence ; 1+, < 1 bactérie ; 2+, 1 à 4 bactéries ; 3+, 5 à 30 bactéries ; 4+, > 30 bactéries.

[b] Interprétation : score de 0 à 3, flore normale ; score de 4 à 6, flore intermédiaire ; score de 7 à 10, flore de vaginose.

**TABLEAU 26-6**

**Les principales bactéries des vaginoses bactériennes.**

| | |
|---|---|
| *Gardnerella vaginalis* | Gardner et Dukes [3] ont décrit cette bactérie tout d'abord sous le nom de *Haemophilus vaginalis*. Cette bactérie a été renommée *Corynebacterium vaginale* car elle n'exigeait ni facteur X, ni facteur V, était souvent groupée en palissade et difficilement décolorée à la coloration de Gram. La taxonomie moderne en a fait un genre spécifique qui ne comporte pour le moment qu'une espèce, *Gardnerella vaginalis*. Cette bactérie est un bacille anaérobie facultatif, non sporulé, non encapsulé, immobile, de Gram variable. Sa croissance est favorisée par le $CO_2$ à 35 °C. Elle est oxydase, catalase, indole, nitrate et uréase négatives. Elle hydrolyse l'hippurate, fermente l'amidon, le raffinose, le glucose, le maltose et le sucrose, mais pas le mélibiose et le mannitol. Autour des colonies, on observe une $\tilde{\beta}$ hémolyse sur gélose au sang humain mais pas sur gélose au sang de mouton. Le rôle exact de *G. vaginalis* dans la physiopathologie de la vaginose bactérienne reste en partie inconnu. En effet, *G. vaginalis* est une bactérie commune de la flore vaginale endogène (11,5 à 69 % d'entre elles). La recherche de *G. vaginalis* pour porter le diagnostic de vaginose bactérienne a une faible valeur prédictive positive (50 %). |
| Bactéries anaérobies | En 1978, Pheifer et al. [6] évoquent un rôle probable des bactéries anaérobies dans la pathogénie des vaginoses bactériennes. Ultérieurement, de nombreuses études ont confirmé le rôle majeur des bactéries anaérobies strictes dans la physiopathologie de certaines vaginoses bactériennes. La plupart des espèces anaérobies à Gram négatif ont été mises en évidence dans la vaginose bactérienne, en particulier les espèces appartenant aux genres *Bacteroides, Fusobacterium, Prevotella, Porphyromonas, Veillonella*, parmi lesquelles les espèces les plus souvent rencontrées et quantitativement prédominantes sont *Prevotella bivia, Prevotella disiens, Porphyromonas asaccharolytica* et *Fusobacterium nucleatum.* (Pour l'identification de ces espèces, se référer au chapitre des bactéries anaérobies.)<br><br>Les bactéries anaérobies à Gram positif et en particulier les *Peptostreptococcus* apparaissent comme des agents fréquemment isolés parallèlement aux *Prevotella* dans les vaginoses. Les études quantitatives ont permis de montrer qu'au cours de la vaginose bactérienne à anaérobies, les lactobacilles ne diminuaient pas toujours significativement mais qu'il s'agissait d'une diminution relative au regard de la forte augmentation du nombre d'anaérobies, en particulier de *Prevotella* et de *Peptostreptococcus*. Au total, la pathologie paraît être en relation avec la prolifération bactérienne souvent largement supérieure à $10^9$ bactéries/g de sécrétions vaginales plutôt qu'avec la présence d'un agent anaérobie spécifique.<br><br>La prolifération des bactéries anaérobies est en partie responsable de la symptomatologie observée au cours de la vaginose bactérienne, en particulier de l'hyperdesquamation de la muqueuse et de l'odeur désagréable des sécrétions.<br><br>L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse a permis d'identifier des productions potentiellement responsables de la symptomatologie : méthylamine, isobutylamine, putrescine, cadavérine, histamine, tyramine et phénéthylamine. |
| *Mobiluncus* spp. | Ces bactéries sont des bacilles incurvés, à Gram variable, mobiles, qui avaient été observés dans les sécrétions vaginales dès la fin du XIX$^{e}$ siècle. Il existe actuellement un seul genre *Mobiluncus* qui comporte deux espèces, *Mobiluncus curtisii* et *Mobiluncus mulieris*. L'espèce *M. curtisii* comprend deux sous-espèces : *M. curtisii* subsp. *curtisii* et *M. curtisii* subsp. *holmesii*. Les bactéries du genre *Mobiluncus* sont des micro-organismes de croissance lente et difficile. Elles sont indole, catalase, oxydase, $H_2S$ négatives, non sporulées. Les résultats de la coloration de Gram sont variables. Il s'agit d'une bactérie dont la paroi est celle d'un bacille à Gram positif, mais la faible épaisseur du peptidoglycane permet une décoloration assez facile qui lui donne souvent un aspect Gram variable ou négatif. La mise en évidence de cette bactérie par culture est souvent assez longue (au minimum 5 jours d'incubation à 37 °C en anaérobiose). Elle cultive sur gélose Columbia enrichie de 5 % de sang de mouton. Les milieux sélectifs utilisent la colistine (10 µg/ml) et l'acide nalidixique (15 µg/ml). À l'examen à l'état frais d'un prélèvement vaginal, il peut être repéré par sa mobilité en particulier lorsqu'il est en quantité abondante. La prévalence des *Mobiluncus* dans la vaginose bactérienne a été diversement appréciée en raison de la variabilité des moyens techniques mis en œuvre. Lorsqu'elle est présente, l'observation à l'examen direct de cette bactérie mobile dans les sécrétions vaginales signe pratiquement le diagnostic de vaginose. Néanmoins, cet agent est fréquemment absent dans d'authentiques tableaux de vaginoses. Cela indique que l'on ne peut pas recommander la mise en évidence par culture des *Mobiluncus* comme moyen spécifique de diagnostic de la vaginose bactérienne. |
| Streptocoques du groupe *viridans* | La présence de streptocoque *viridans* dans la flore vaginale naturelle est régulièrement évoquée. La taxonomie moderne a pu démontrer qu'il s'agissait en réalité parfois de bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* qui, à la coloration de Gram, apparaissaient comme des diplocoques en courtes chaînettes donnant en culture des petites colonies α-hémolytiques sur gélose au sang. Néanmoins, *Streptococcus acidominimus, Streptococcus intermedius* et *Streptococcus morbillorum* sont communément retrouvés en grande quantité chez les femmes atteintes d'authentiques tableaux de vaginose bactérienne. |

(*Suite*)

TABLEAU 26-6

**Suite.**

| | |
|---|---|
| Mycoplasmes | Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi non colorables par la coloration de Gram. Trois espèces sont régulièrement identifiées dans la flore vaginale normale, *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma genitalium* (tableau 26.2).<br>Il est pratiquement acquis que *Mycoplasma hominis* ne joue aucun rôle pathogène dans la cavité vaginale en tant que pathogène spécifique. En revanche, il est actuellement admis que *Mycoplasma hominis* est, parmi les mycoplasmes, l'espèce qui prolifère de façon la plus importante et significativement au cours des vaginoses bactériennes. La prévalence d'*U. urealyticum* n'est pas significativement différente au cours des vaginoses et dans la flore vaginale normale. Néanmoins, la densité de la population pourrait être beaucoup plus élevée au cours des vaginoses. Curieusement, *M. genitalium* est moins fréquemment retrouvé au cours des vaginoses bactériennes que dans la flore vaginale normale. L'ensemble de ces données indique que la recherche des mycoplasmes dans le vagin ne peut constituer un bon indicateur de l'existence d'une vaginose bactérienne. |
| *Atopobium vaginae* | Le genre *Atopobium* comporte des bactéries à Gram positif, de forme coccoïde ou bacillaire, anaérobies strictes et produisant principalement de l'acide lactique lors de la fermentation des sucres. Il a été créé en 1992 par Collins et Walbranks [2]. En 1999, une nouvelle espèce du genre *Atopobium,* isolée de flore vaginale, a été nommée *Atopobium vaginae* par Jovita-Rodriguez et al. [4]. Cette bactérie a plutôt, à la coloration de Gram, une morphologie de cocci à Gram positif en paires ou en courtes chaînes. Elle est facultativement anaérobie. En raison des difficultés d'identification, cette bactérie est généralement confondue avec des lactobacilles ou des streptocoques *viridans*. Actuellement, il est possible de détecter cette bactérie dans les sécrétions génitales par PCR spécifique. En pratique, il faut considérer comme vaginose tout examen direct qui montre une prolifération abondante (100 à 100 000 fois la concentration normale de bactéries) en « paquet » de coccobacilles à Gram positif, qu'il s'agisse d'*Atopobium* ou d'autres bactéries à morphotype identique (*Peptostreptococcus*, Streptocoques *viridans*, etc.). |

aussi chez la femme ménopausée de longue date. À l'examen à l'état frais et à la coloration de Gram, le frottis est inflammatoire. À l'examen après coloration de Gram, les leucocytes sont nombreux, les lactobacilles ne sont pas présents et la flore vaginale est constituée d'une flore monomorphe d'abondance variable (diplocoques à Gram positif ou bacilles à Gram négatif le plus souvent). Avant de conclure à une vaginite bactérienne, il faut éliminer avant tout le *Trichomonas*, en particulier chez la femme en période d'activité génitale.

## Mise en culture

Le diagnostic des pathologies vaginales relevant de l'examen direct, les cultures des sécrétions vaginales ne s'imposent que :

- lorsque l'examen direct révèle la rare vaginite bactérienne ;
- pour rechercher une BVHRI au cours de la grossesse ou, pour certains, avant un acte diagnostic ou thérapeutique par voie basse.

Une culture sur une gélose Columbia + sang de mouton incubée pendant 48 heures en anaérobiose et une gélose au sang cuit incubée sous 5 à 8 % de $CO_2$ suffit généralement pour isoler les bactéries de vaginites bactériennes. En outre, ces deux milieux permettent une croissance bactérienne qui reflète, au plus proche, les résultats de l'examen direct quant à l'aspect de la flore vaginale. D'autres milieux incubés en aérobie ou sous $CO_2$ peuvent être ajoutés en fonction des procédures d'identification de chacun.

Pour la recherche des BVHRI (*S. agalactiae* et autres streptocoques β-hémolytiques, *S. porcinus* et *S. pseudoporcinus, E. coli* et autres entérobactéries, *S. aureus, H. influenzae* et autres bacilles à Gram négatif capnophiles, *S. pneumoniae, Neisseria*), on peut utiliser les mêmes milieux que pour le diagnostic des vaginites bactériennes lorsque les parturientes sont en situation à risque infectieux (risque d'accouchement prématuré [RPM]). Pour le dépistage systématique de *S. agalactiae* à 35 à 37 semaines de grossesse, les recommandations nationales préconisent l'utilisation de la gélose au sang ensemencée en quadrant. La réponse est semi-quantitative dans la mesure où la réponse doit indiquer le nombre de quadrants dans lesquels on observe une culture bactérienne. Des milieux chromogènes, commercialisés pour aider à repérer des colonies de *S. agalactiae* (Granada®, Biolys ; Strepto B ID®, bioMérieux ; Strepto B agar®, AES), ou des milieux sélectifs pour Gram positif (gélose Columbia ANC + 5 % de sang de mouton) peuvent être utilisés en complément.

On ensemencera une gélose de Sabouraud sélective tout en sachant que les levures cultivent parfois mieux sur la gélose au sang cuit sous $CO_2$. Rappelons, comme indiqué ci-dessus, que le diagnostic de mycose s'effectue à l'examen direct et que la présence de *Trichomonas* rend inutile l'identification de toute flore d'accompagnement, même monobactérienne.

Il existe des cas particuliers. La recherche de gonocoques par culture ne doit pas être faite sur un prélèvement vaginal, sauf chez la petite fille ou lorsque l'on ne peut pas réaliser un prélèvement d'endocol (femme hystérectomisée). Dans ces cas, on utilise en plus une gélose chocolat enrichie additionnée du mélange VCN (vancomycine,

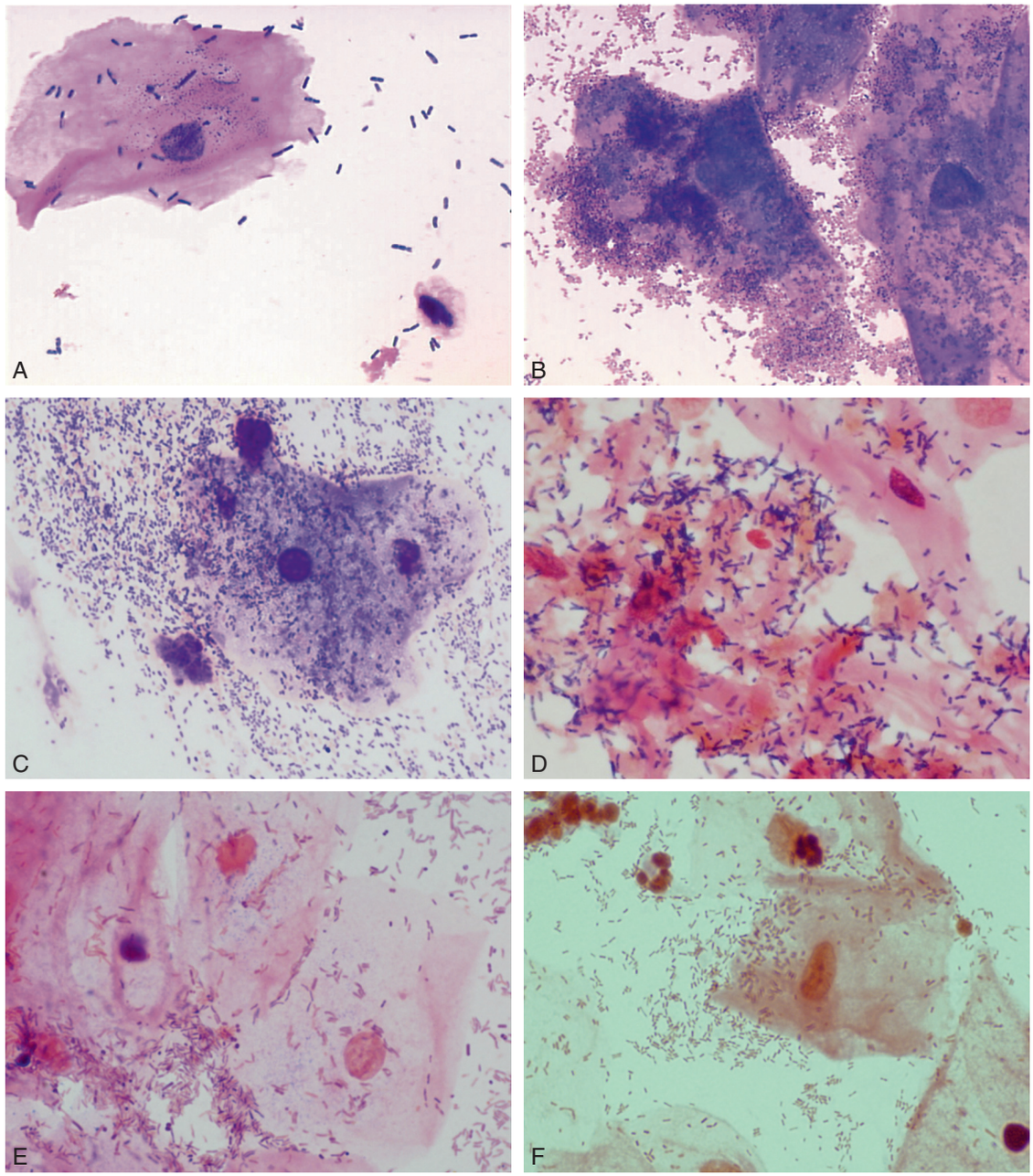



**Fig. 26.8.** – *Flore vaginale normale en haut à gauche (grade I de Spiegel ou score à 0 de Nugent). Les cinq autres photos ont été réalisées à partir de sécrétions vaginales de femmes souffrant cliniquement de vaginose bactérienne et ayant bien répondu au traitement. Bien qu'elles aient toutes une flore de grade III de Spiegel ou un score >7 de Nugent, on remarque la grande diversité microbiologique des paysages vaginaux pour une même pathologie. Pour toutes, on observe une prolifération bactérienne qui est le meilleur critère diagnostique de la vaginose bactérienne. Le frottis est généralement non inflammatoire.*
*(Deux figures du haut : photographies de Philippe Lanotte. Figures du bas : photographies de Roland Quentin.)*

colistine, nystatine), ou VCNT (vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime), ou VCAT (vancomycine, colistine, amphothéricine B, triméthoprime). En outre, comme pour la recherche de *Chlamydiae*, la recherche de gonocoque peut être réalisée sur les sécrétions vaginales dès lors que l'on utilise des TAAN comme moyen diagnostique. En effet, si le milieu vaginal est peu propice à la survie du gonocoque, les acides nucléiques éliminés par le col peuvent être détectés dans le vagin avec des performances satisfaisantes.

### Prélèvements endocervicaux et endo-utérins

Ces prélèvements ont deux objectifs :

- rechercher l'étiologie d'une endocervicite dans un contexte d'ITS, *Neisseria gonorrhoeae, Chamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium*. Dans ce cadre, le prélèvement est souvent associé à un prélèvement vaginal, urétral ou du premier jet d'urine ;
- rechercher l'étiologie d'une infection utéro-annexielle (endométrite, pyométrie, fausse couche septique, salpingite) ou d'une chorioamniotite. Ces infections étant le plus souvent acquises par voie ascendante, il faut pouvoir mettre en évidence, sur ces prélèvements, comme sur des pus, toutes les bactéries des groupes II et III indiquées sur le tableau 26.1.

#### Examen direct et interprétation des résultats

L'examen direct est effectué après mise en culture de l'échantillon par coloration de Gram. Il est souvent peu informatif. La présence de sang peut gêner l'examen. Il convient, dans ce cas, d'utiliser le bain fixateur et hémolysant de Carnoy.

Dans un premier temps, on évalue la qualité du prélèvement. La présence de cellules épithéliales vaginales superficielles et/ou de lactobacilles indique une contamination vaginale qui doit faire déclarer le prélèvement comme non conforme. L'abondance des leucocytes est évaluée (rares, nombreux, très nombreux) ou quantifiée par champ microscopique sur chaque prélèvement. La nature des bactéries observées est décrite et quantifiée par champ microscopique. Néanmoins, la sensibilité de la coloration de Gram sur les prélèvements endocervicaux et endo-utérins est faible (40 à 65 % par exemple pour le gonocoque).

#### Mise en culture

Compte tenu de l'étendue des bactéries que l'on doit être capable d'isoler (groupes II et III, tableau 26.1), on utilisera au minimum :

- deux géloses chocolat enrichies, l'une sans et l'autre avec inhibiteurs VCN ou VCNT ou VCAT incubées sous $CO_2$ ;
- une gélose trypticase soja additionnée de 5 % de sang de cheval incubée en aérobiose ;
- une gélose type Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, incubée en anaérobiose.

L'utilisation de milieux sélectifs est rarement nécessaire et ne doit pas être envisagée comme un moyen de suppléer la mauvaise qualité du prélèvement. On peut néanmoins adjoindre aux milieux sus-cités une gélose Columbia ANC.

S'il s'agit de biopsie ou de produit de curetage recueilli chirurgicalement, on peut adjoindre des cultures en bouillon (milieu de Schaedler, milieu BHI, ou milieu de Rosenow).

Les cultures sont examinées à la 24e et à la 48e heure puis à 5 jours si on suspecte une gonococcie ou au cours des infections utéro-annexielles.

L'interprétation au laboratoire des cultures positives est simple dans deux circonstances. La présence de *Neisseria* conduit à confirmer qu'il s'agit bien de *Neisseria gonorrhoeae*, et la présence d'assez nombreuses colonies d'une seule espèce bactérienne fait poursuivre l'identification avec antibiogramme.

L'interprétation est plus difficile quand la culture est polybactérienne. On doit faire une coloration de Gram, de préférence sur les géloses incubées en anaérobiose. Lorsque cet examen microscopique évoque la flore vaginale normale, il ne convient pas de poursuivre l'analyse. La présence de deux voire trois espèces bactériennes bien différenciées n'est interprétable qu'en fonction des renseignements cliniques. S'il y a manifestement une infection utérine ou une chorioamniotite, il convient de poursuivre l'analyse par identifications et antibiogrammes. Dans les cas difficiles, si on dispose à la fois de prélèvements cervicaux et endo-utérins, on confrontera les résultats des cultures en donnant plus de poids aux résultats des prélèvements endo-utérins.

Dans le cadre des suspicions d'ITS, il faut privilégier l'utilisation des TAAN pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium* sur les prélèvements endocervicaux, vaginaux, urinaires et urétraux qui sont sensibles et spécifiques ; néanmoins, leurs performances peuvent être modifiées par le sang et le mucus. Pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, la culture offre la possibilité de confirmer l'identification – ce qui est nécessaire dans les affaires d'agression – et d'étudier la sensibilité aux antibiotiques de la souche.

### Prélèvements urétraux

Les prélèvements urétraux sont traités comme les prélèvements endocervicaux. En outre, on pratique une recherche de mycoplasmes par cultures en milieux solides et liquides. Ces milieux permettent l'isolement de *Mycoplasma hominis* et d'*Ureaplasma urealyticum*, mais pas de *Mycoplasma genitalium* pour lequel on recourra aux TAAN.

### Autres prélèvements

#### Prélèvements tubopéritonéaux (haut appareil génital)

Ces échantillons doivent être traités comme des pus profonds avec quelques spécificités. L'examen direct est effectué après coloration de Gram. S'il est négatif, les ensemencements sur les milieux gélosés seront effectués en nappe épaisse sur une moitié de la boîte de Petri, suivis d'isolement sur les deux derniers quadrants. En outre, des cultures en bouillons incubées au moins une semaine sont réalisées. On utilisera au minimum :

- deux géloses chocolat enrichies, l'une sans et l'autre avec inhibiteurs VCN ou VCNT ou VCAT incubées sous $CO_2$ ;
- une gélose trypticase soja additionnée de 5 % de sang de cheval incubée en aérobiose ;
- une gélose type Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, incubée en anaérobiose ;
- un bouillon (milieu de Schaedler, milieu BHI, ou milieu de Rosenow) ;
- des milieux pour rechercher les mycoplasmes génitaux, milieux solides (type gélose A7) et milieux liquides (minigalerie type Mycofast® Evolution).

Selon l'examen direct, on pourra adjoindre des cultures sur milieux sélectifs (milieux de Chapman, de Drigalski, gélose Columbia ANC).

La recherche de *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium* par utilisation de TAAN doit être systématique dès lors qu'il existe une atteinte tubaire, des adhérences, une périhépatite, ou un syndrome de Fitz-Hugh-Curtis.

### Prélèvements au niveau des orifices des glandes de Bartholin

Ces prélèvements sont traités comme des pus ouverts. Les milieux utilisés doivent permettre la croissance des aéro-anaérobies, des bactéries exigeantes en facteurs X et V, et du gonocoque.

### Ulcérations génitales

#### *Recherche de* Treponema pallidum *dans l'ulcération syphilitique*

Cette recherche s'effectue à partir des produits du grattage du chancre ou de la ponction ganglionnaire par l'examen direct au microscope fond noir ± immunofluorescence directe. Mais il faut savoir qu'il existe des tréponèmes commensaux, non pathogènes, sur certaines lésions ulcératives non infectieuses de la vulve et du vagin (par exemple cancer vulvaire). En conséquence, le diagnostic doit être confirmé par les résultats d'une sérologie syphilitique.

#### *Recherche d'*Haemophilus ducreyi

C'est chez la femme qu'on observe le « chancre en miroir ». Les cultures sont actuellement la méthode privilégiée. Le diagnostic direct sur un frottis s'effectue après par coloration au bleu de méthylène ou au Giemsa à partir d'un prélèvement effectué à la base du chancre ou du pus ganglionnaire. Deux milieux sont ensemencés à partir de l'écouvillon ou de l'aspirat de bubons. On utilise des milieux gélosés riches, type chocolat Polyvitex® additionné de 5 à 10 % de sérum de veau fœtal, et milieu Columbia enrichi de sang de lapin. L'incubation des milieux est réalisée en atmosphère enrichie en 5 à 10 % de $CO_2$, au moins 48 heures et jusqu'à 10 jours (dans ce cas, il est utile d'utiliser un milieu rendu sélectif par addition de 5 µg/ml de vancomycine). La température idéale d'incubation est de 33 à 35 °C.

#### *Recherche de* Chlamydia trachomatis *sérotypes L1, L2, L3 au cours du lymphogranulome vénérien (LGV)*

Les lésions observées sont très diverses, avec une papule non douloureuse qui guérit spontanément au stade primaire et qui passe souvent inaperçu. À ce stade, seuls la culture ou les TAAN effectués à partir de l'écouvillonnage de la lésion primaire permettent le diagnostic d'infection à *C. trachomatis*. Puis, aux stades secondaire et tertiaire, apparaissent les signes généraux avec manifestations très variables (abcès divers avec parfois fistulisation, adénopathies, rectite hémorragique, colite ulcéreuse, éléphantiasis génital, voire destructions tissulaires plus ou moins importantes). Devant de tels tableaux, le diagnostic clinique est difficile – infections ou pathologies tumorales ? Pour cette raison, en pratique, à ces stades, la sérologie (test de micro-immunofluorescence, réaction de fixation du complément) est souvent le premier examen prescrit qui alertera sur la possibilité du LGV. Pour la confirmation, l'analyse par culture ou à l'aide de TAAN des produits d'aspiration de bubons, des prélèvements effectués sur les lésions diverses (vagin, vulve, rectum, etc.) permet le diagnostic d'infection à *C. trachomatis* La confirmation du sérotype en cause nécessite le recours à des laboratoires spécialisés qui pourront effectuer des tests de confirmation par séquençage et étude du polymorphisme de restriction.

#### *Recherche de* Klebsiella granulomatis *au cours de la donovanose (granulome inguinal)*

Cette recherche s'effectue par coloration (May-Grünwald-Giemsa) des corps de Donovan sur une préparation effectuée à partir d'une parcelle de tissu granulomateux ou une biopsie.

## Conclusion

Les prélèvements génitaux chez la femme sont très divers. Deux d'entre eux sont fréquemment réalisés, le prélèvement vaginal et l'endocol. L'impact diagnostique de leurs résultats est très différent. En effet, l'endocol est un prélèvement endo-utérin qui doit être analysé comme un pus. Néanmoins, trois recherches spécifiques – *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium* – doivent pouvoir être mises en évidence dès lors que l'on suspecte une ITS. Le prélèvement vaginal a comme objet de diagnostiquer les mycoses, *T. vaginalis* et les vaginoses bactériennes, et de rechercher les bactéries à risque maternofœtal et néonatal chez la femme enceinte.

AU1

## BIBLIOGRAPHIE


[1] Blond MH, Poulain P, Gold F, et al. Infection bactérienne materno-fœtale. Encycl Méd Chir 2004 ; 10 : 1–40.

[2] Collins MD, Wallbranks S. Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus, Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus* : proposal for the creation of a new genus Atopobium. FEMS Microbiol Lett 1992 ; 74 (2–3) : 235–40.

[3] Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis : a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. Am J Obstet Gynecol 1955 ; 69 : 962–76.

[4] Rodriguez-Jovita M, Collins MD, Sjödén B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina : description of Atopobium vaginae sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1999 ; 49(4) : 1573–6.

[5] Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 297–301.

[6] Pheifer TA, Forsyth PS, Durfee MA, et al. Nonspecific vaginitis : role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. N Engl J Med 1978 ; 298 : 1429–34.


## POUR EN SAVOIR PLUS


Agence de santé publique du Canada. Lignes directrices sur les infections transmissibles sexuellement, Editions 2006. www.santepublique.gc.ca/its.

ANAES. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. RPC ; 2001. www.bmlweb.org/consensus_infection_antenatale_recommandation.pdf.

Barbeyrac B, Clerc M, Raherison S, Bébéar CM, Bébéar C. Infections humaines à *chlamydiae* : diagnostic biologique et épidémiologie. Revue Francophone des Laboratoires 2007 ; 37 : 71–6.

Bébéar C, Bébéar CM. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires 2007 ; 37 : 63–9.

Lanotte P, Quentin R. Uréthrites et cervicovaginites. In : Machet L, et al., editors. Dermatologie en gynécologie obstétrique. Paris : Masson ; 2006.

Quentin R. Bactéries des vaginoses bactériennes. Encycl Méd Bio (Elsevier SAS, Paris) I-047 2006.

Quentin R. Flores vaginales normales et pathologiques : diagnostic et prise en charge. Feuillets de Biologie 2006 ; 47 (273) : 15–21.

REMIC. Référentiel en microbiologie médicale. Société Française de Microbiologie. CMIT Vivactis Éditeur ; 2010.

CHAPITRE

27

# Prélèvements chez le nouveau-né

R. Quentin

## Introduction

Les prélèvements chez le nouveau-né ont comme objectif d'aider au diagnostic d'infection néonatale. Ce diagnostic est cliniquement difficile et se fondera sur des arguments anamnestiques, cliniques et biologiques. Parmi les moyens biologiques, l'analyse bactériologique des prélèvements de liquide gastrique et des prélèvements superficiels, des hémocultures et du liquide céphalorachidien du nouveau-né est primordiale.

## Rappel clinique

Le diagnostic d'infection néonatale est difficile. Le nouveau-né est suspect d'infection dès lors qu'il existe des éléments cliniques appelés par les experts « critères majeurs » et « critères mineurs » d'infection qui ne préjugent pas de l'attitude thérapeutique. Néanmoins, la présence d'un ou plusieurs de ces critères conduit à prescrire un bilan biologique qui comporte, au minimum, un hémogramme, des marqueurs sériques de l'inflammation (au moins le dosage de la protéine C-réactive), et un bilan bactériologique qui sera détaillé ici. En outre, ce bilan sera prescrit dès lors que le nouveau-né est symptomatique.

Les critères majeurs retenus, en 2002, par les experts de l'Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (Anaes, actuellement Haute autorité de santé [HAS]) sont :

- un tableau évocateur de chorioamniotite ;
- un jumeau atteint d'une infection maternofœtale ;
- la température maternelle avant ou en début de travail ≥ 38 °C ;
- la prématurité spontanée < 35 semaines d'aménorrhée (SA) ;
- une durée d'ouverture de la poche des eaux ≥ 18 heures ;
- la rupture prématurée des membranes (RPM) avant 37 SA ;
- une parturiente qui a :
  - un antécédent d'infection maternofœtale à *S. agalactiae* ;
  - un portage vaginal de *S. agalactiae* ;
  - une bactériurie à *S. agalactiae*, la mère n'ayant pas reçu une antibioprophylaxie complète au moment de l'accouchement (pénicilline G en IV 5 M d'UI, puis au moins une seconde injection de 2,5 M d'UI 4 heures plus tard ; ou amoxicilline en IV 2 g, puis au moins une seconde injection de 1 g 4 heures plus tard ; ou au moins deux injections d'érythromycine ou de céphalosporine en cas d'allergie).

Les critères mineurs retenus par les experts de l'Anaes sont :

- une durée d'ouverture de la poche des eaux > 12 heures mais ≤ 18 heures ;
- la prématurité spontanée < 37 SA et ≥ 35 SA ;
- la tachycardie fœtale isolée ;
- l'asphyxie fœtale non expliquée.

De plus, les examens bactériologiques sont prescrits chez tous les nouveau-nés symptomatiques. Les signes cliniques évocateurs d'infections retenus par les experts de l'Anaes sont :

- une fièvre (> 37,8 °C) ou une hypothermie (< 35 °C), ou, en cas de réglage automatique d'un incubateur, une modification de la température de régulation ;
- des signes hémodynamiques : teint gris, tachycardie, bradycardie, augmentation du temps de recoloration capillaire, hypotension artérielle ;
- des signes respiratoires : geignement, tachypnée, dyspnée, pauses respiratoires, détresse respiratoire ;
- des signes neurologiques : fontanelle tendue, somnolence, troubles du tonus, troubles de conscience, convulsions ;
- des signes cutanés : purpura, éruption ;
- et tous les nouveau-nés qui vont mal sans explication.

## Pathogénie

L'infection néonatale d'origine maternelle est l'aboutissement d'un processus infectieux qui débute par une infection maternelle ou par la présence dans la flore génitale de la gestante d'une bactérie vaginale à haut risque infectieux. À chaque stade, des prélèvements spécifiques sont à réaliser (fig. 27.1).

La cavité amniotique du nouveau-né peut être ensemencée au cours des infections maternelles par la voie hématogène transplacentaire. Les deux infections bactériennes les plus répandues dans ce cadre sont la listériose et la pyélonéphrite gravidique. La seconde voie de colonisation intra-amniotique est la voie ascendante, plus particulièrement liée à l'existence d'une infection génitale (vaginoses, endocervicites) ou à la présence d'une bactérie vaginale à haut risque d'infection maternofœtale dans la flore génitale. Les situations obstétricales à risque important d'infection par voie ascendante sont l'ouverture prématurée du col et la rupture prématurée des membranes. Lors des accouchements normaux à terme, le portage de *Streptococcus agalactiae* est à haut risque de colonisation. Enfin, la colonisation peut survenir au passage de la filière génitale. Les bactéries les plus souvent en cause sont répertoriées dans le tableau 27.1.

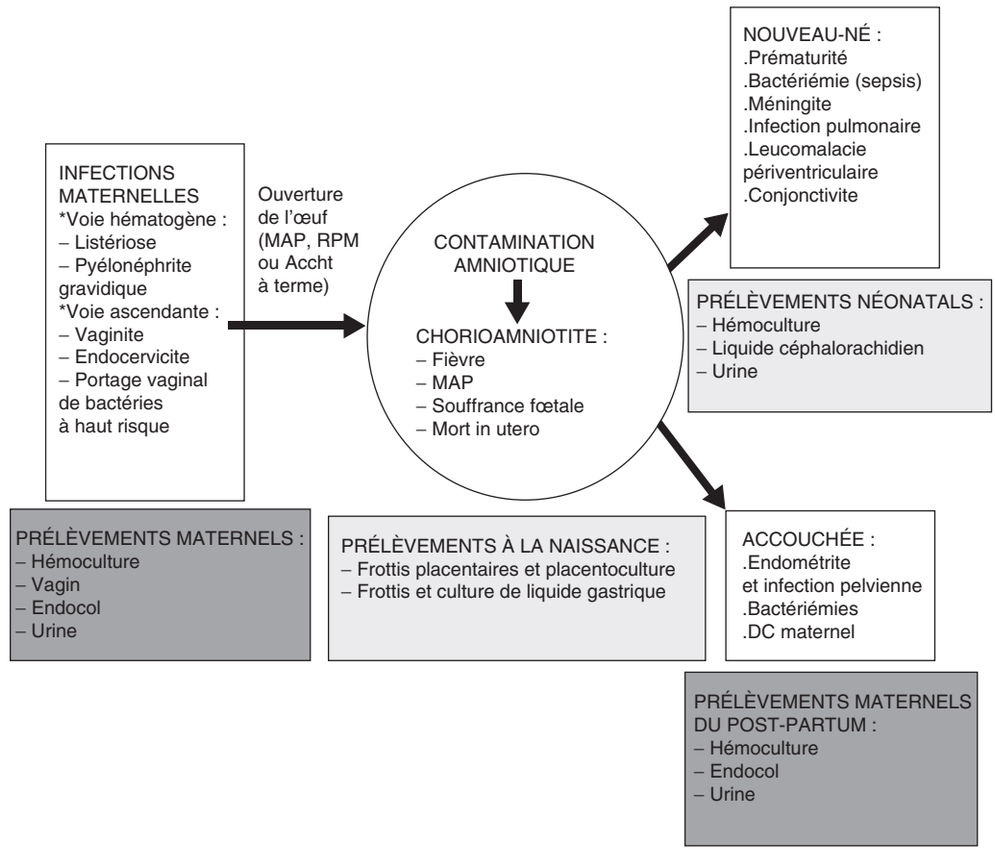



**Fig. 27.1.** – *Infections bactériennes néonatales et prélèvements bactériologiques à réaliser chez le nouveau-né (en gris clair) et chez sa mère (en gris foncé). MAP : menace d'accouchement prématuré; RPM : rupture prématurée des membranes.*

**TABLEAU 27-1**

## Les principales bactéries maternelles à risque infectieux maternofœtal et néonatal.

Principales bactéries impliquées dans les infections par voie hématogène
– *Listeria monocytogenes* (listériose)
– *Escherichia coli, Proteus* spp. et autres entérobactéries (pyélonéphrite gravidique)

Principales bactéries impliquées dans les infections par voie ascendante
– Bactéries des cervicites :
• *Neisseria gonorrhoeae*
• *Chlamydia trachomatis*
– Bactéries des vaginoses :
• bactéries anaérobies (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Mobiluncus*)
• *Gardnerella vaginalis*
• *Atopobium vaginae*
• *Streptococcus acidominimus, Streptococcus intermedius* et *Streptococcus morbillorum*
• *Mobiluncus mulieris, M. curtisii* subsp. *curtisii* et *M. curtisii* subsp. *holmesii*
– Bactéries de portage vaginal à haut risque d'infection maternelle et néonatale :
• *Streptococcus agalactiae, Streptococcus porcinus* et *pseudoporcinus, Enterococcus*
• entérobactéries (*Escherichia coli* [+++], mais aussi *Proteus*, *Morganella*, *Providencia, Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies ou par utilisation de produits à usage local contaminés
• exceptionnellement, *Pseudomonas* et *Acinetobacter* (il s'agit le plus souvent de l'utilisation de produits contaminés)
• *Staphylococcus aureus*
• *Haemophilus influenzae* et *parainfluenzae*
• *Streptococcus pyogenes* et autres streptocoques β-hémolytiques
• pneumocoques
• méningocoques et autres bactéries capnophiles (*Neisseria, Branhamella, Capnocytophaga*, etc.)

L'ensemencement de la cavité amniotique par voie hématogène ou par voie ascendante va, en l'absence de prise en charge, rapidement évoluer vers la chorioamniotite. La flore bactérienne est souvent monomorphe et abondante au cours de la contamination massive de liquide amniotique à risque d'infection ou au cours des chorioamniotites récentes. À l'inverse, la flore bactérienne est souvent polymorphe et moins abondante lors des fréquentes colonisations physiologiques du liquide amniotique au cours des accouchements normaux. Les conséquences de la contamination bactérienne apparaissent soit pendant l'accouchement, soit dans les quelques jours qui suivent l'accouchement. Cette infection néonatale d'origine maternelle se traduit par une bactériémie, une méningite ou éventuellement des infections plus localisées : infections pulmonaires, infections urinaires, conjonctivite (fig. 27.1). Des métastases septiques succédant aux bactériémies sont possibles mais plus rares.

## Diagnostic bactériologique direct

Les prélèvements à réaliser au cours des infections néonatales sont rapportés sur la figure 27.1. Certains sont effectués chez la mère (voir les chapitres sur les prélèvements génitaux, l'ECBU et les hémocultures). Il y a nombre de difficultés pour interpréter certains prélèvements néonatals en raison de l'abondance de la flore bactérienne vaginale et fécale qui colonise naturellement le nouveau-né lors de la naissance. En outre, les pratiques varient assez notablement d'un centre à un autre. L'impact thérapeutique des résultats des prélèvements de liquide gastrique et des prélèvements superficiels chez le nouveau-né colonisé asymptomatique est aussi très divers.

### Prélèvement de liquide gastrique et prélèvements périphériques

#### *Objectifs*

Ces prélèvements (fig. 27.2) établissent très approximativement le contenu bactérien du liquide amniotique à la naissance. Celui-ci comporte naturellement les bactéries acquises in utero pendant l'accouchement, puis au passage de la filière génitale,voire celles de la flore fécale maternelle sur le périnée. La littérature apporte peu d'éléments qui permettraient de standardiser les méthodes d'analyse de ces prélèvements et d'établir des critères bactériologiques d'interprétation différenciant clairement la colonisation normale et physiologique du nouveau-né d'une contamination à risque infectieux. Cela explique sans doute en partie la très grande variabilité des performances attribuées à ces prélèvements comme moyen de porter le diagnostic d'infection néonatale (VPP = 13 à 100 % ; VPN = 67 à 100 %). Nombre d'auteurs concluent, sans doute avec des arguments, que : 1) la qualité méthodologique des études utilisant ces tests est généralement pauvre ; 2) même dans les études rigoureuses, les performances de ces tests varient énormément ; et 3) la valeur de ces tests est limitée pour diagnostiquer une infection. C'est dire qu'il faut être restrictif dans l'interprétation de ces examens bactériologiques et ne s'intéresser qu'aux bactéries manifestement à risque (*Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, pneumocoques) ou aux

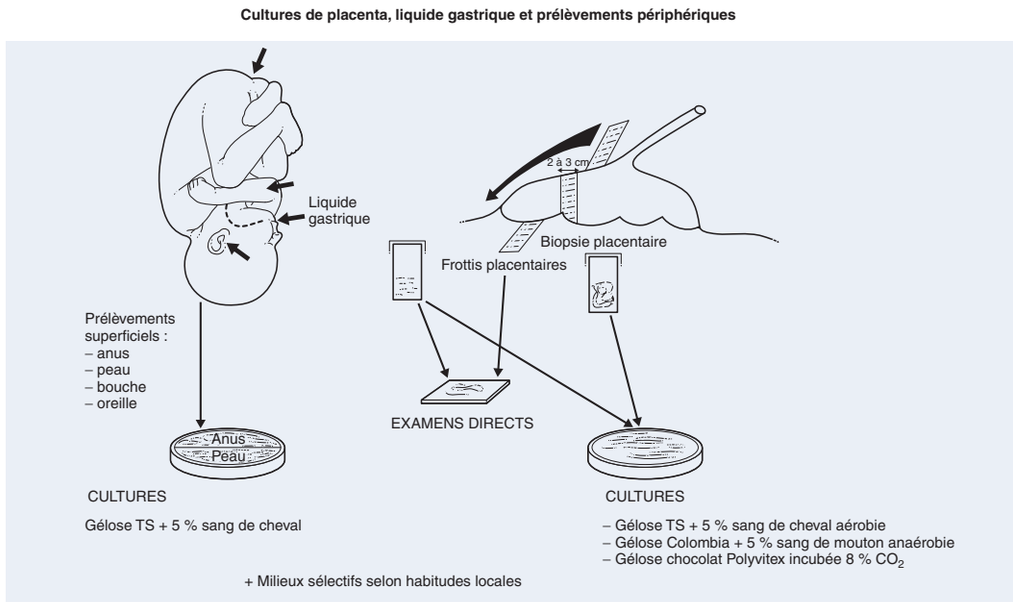



**Fig. 27.2.** – *Examens directs et cultures réalisées sur les prélèvements cutanéomuqueux du nouveau-né et sur le placenta à la naissance.*

contaminations monobactériennes massives dès qu'il s'agit de bactéries usuelles de la flore intestinale ou périnéale (entérobactéries, en particulier *Escherichia coli,* anaérobies, streptocoques α-hémolytiques, etc.). En outre, l'interprétation doit se faire en tenant compte du contexte clinique de prélèvement.

### Indication du prélèvement

En France, les indications de ces prélèvements sont relativement larges. On prélève s'il existe un problème infectieux maternel, si l'accouchement a eu lieu dans un contexte à risque infectieux, ou si l'examen du nouveau-né laisse suspecter une infection néonatale (tableau 27.2).

Actuellement, le portage isolé de streptocoque du groupe B ne constitue pas une indication à effectuer ce bilan de façon systématique dès lors que l'antibioprophylaxie perpartum a été correcte (exposition du fœtus aux antibiotiques pendant au minimum 4 heures), que l'accouchement s'est déroulé normalement dans des circonstances obstétricales normales, et que l'examen du nouveau-né est normal. Ce bilan bactériologique est préconisé en France lorsque l'antibioprophylaxie n'a pas été correcte (≤4 heures ou <2 doses). Dans d'autres recommandations, ce bilan n'est pas préconisé dans cette circonstance, mais il est alors recommandé de pratiquer plutôt une hémoculture.

**TABLEAU 27-2**

**Indications des prélèvements du liquide gastrique, du placenta et des prélèvements superficiels à la naissance.**

| *Critères anamnestiques et maternels* |
|---|
| Fièvre maternelle ≥38 °C pendant le travail ou 6 heures suivant la naissance |
| Rupture prématurée des membranes (avant le début du travail) |
| Ouverture de la poche des eaux ≥12 heures |
| Liquide amniotique teinté ou méconial |
| Prématurité <37 semaines d'aménorrhée |
| Tachycardie fœtale >160/min et/ou anomalies au monitorage du rythme cardiaque fœtal |
| Score d'APGAR <7 à 5 minutes |
| Infection urinaire maternelle dans le mois précédant l'accouchement |
| Portage de streptocoque du groupe B n'ayant pas donné lieu à une antibioprophylaxie perpartum ou à une antibioprophylaxie incomplète (≤4 heures ou <2 doses) |
| *Critères cliniques chez le nouveau-né* |
| Troubles respiratoires : tachypnée, geignement, apnée, cyanose |
| Troubles hémodynamiques : collapsus, pâleur, marbrure, temps de recoloration cutanée >3 s |
| Anomalies du comportement : somnolence, refus de boire |
| Troubles neurologiques : hypotonie, hyporéactivité, hyperexcitabilité ou convulsions |
| Troubles digestifs : ballonnement abdominal, trouble du transit, ictère précoce ou prolongé |
| Instabilité thermique |
| Signes cutanés : purpura, éruptions diverses précoces |

### Réalisation des prélèvements

Dans les travaux publiés, les conditions techniques de réalisation de ces prélèvements (matériel utilisé, moment par rapport à la naissance, conditions de transport) sont généralement décrites de façon très succincte. Ceux-ci doivent être faits le plus près possible de l'accouchement en salle de travail (fig. 27.3).

#### Prélèvement de liquide gastrique (liquide amniotique)

Le prélèvement est recueilli par sondage gastrique. Quelques millilitres de liquide sont aspirés et mis dans un récipient stérile. La conservation s'effectue à 4°C.

#### Prélèvements périphériques

Ces prélèvements sont effectués par écouvillonnage des cavités naturelles du nouveau-né ou de la peau. Ils concernent des sites multiples (conduit auditif externe, narines, bouche, yeux, ombilic, anus). Le nombre de prélèvements à réaliser fait débat. Deux prélèvements semblent être suffisants. Depuis 2002, les experts de l'Anaes ont recommandé d'effectuer un prélèvement du conduit auditif externe et un autre prélèvement superficiel au choix de l'opérateur. En réalité, peu d'auteurs ont estimé le service rendu par ces prélèvements en fonction du nombre de sites et de la nature des sites prélevés. Néanmoins, la VPN et le taux de faux négatif paraissent acceptables avec deux prélèvements (nez et oreille) (99 % et 7 % respectivement) pour la recherche de streptocoque du groupe B, et la réduction de 6 sites à 2 sites ne semble pas affecter la qualité des décisions thérapeutiques prises.

### Mise en culture

Les milieux de culture utilisés sont très variables aussi bien en pratique dans les laboratoires que dans la littérature. En outre, les performances des divers milieux et atmosphères d'incubation utilisés n'ont pas fait l'objet d'évaluation particulière quant à l'impact sur le soin. Les milieux recommandés par les experts de l'Anaes sont au minimum : une gélose au sang incubée en aérobiose, une gélose chocolat Polyvitex® incubée sous 5 à 8 % de $CO_2$ et une gélose au sang de mouton base Columbia incubée en anaérobiose. On peut ensemencer des milieux sélectifs ou chromogènes en fonction des habitudes des uns et des autres.

L'ensemencement d'une gélose au sang incubée en aérobiose est presque toujours effectué. Compte tenu de la grande diversité des bactéries que l'on doit être capable de mettre en évidence, l'utilisation de ce seul milieu ne paraît pas totalement satisfaisante. L'ensemencement d'une gélose au sang cuit (gélose chocolat Polyvitex®) incubée sous 5 à 8 % de $CO_2$ s'est imposé pour la mise

**Fig. 27.3.** – *Le bilan bactériologique réalisé à l'accouchement chez le nouveau-né suspect d'infection.*
La mise en culture du placenta nécessite le prélèvement d'une carotte placentaire près de l'insertion du cordon et sur toute l'épaisseur du placenta (A). La biopsie est déposée dans un flacon stérile (B). Un frottis placentaire est réalisé sur toute la longueur de la face maternelle du placenta à l'aide du petit côté d'une lame (C). Un second frottis placentaire est réalisé de la même façon avec une autre lame sur la face fœtale en débordant sur les membranes (D). Chacun des produits recueillis est étalé en couche épaisse sur une autre lame (E). Les deux lames sont séchées à l'air et mises dans un porte-lame. Au laboratoire, elles seront fixées dans le liquide hémolysant de Carnoy (tableau 27.4) avant d'être colorées au Gram. Parallèlement, quelques millilitres de liquide gastrique du nouveau-né sont prélevés par aspiration et déposés dans un tube stérile. Au laboratoire, après mise en culture, le liquide gastrique est étalé en couche épaisse sur une lame pour coloration de Gram. Si le liquide est très épais et/ou « purée de pois », il peut être passé dans le liquide de Carnoy avant coloration pour faciliter la lecture au microscope (G). Un examen direct positif se traduit par la présence d'une bactérie d'une seule espèce dans plusieurs champs microscopiques (H). Le nombre de bactéries et de polynucléaires est comptabilisé par champ microscopique. (Photos R. Quentin)

en évidence des bactéries capnophiles qui ne sont pas une cause exceptionnelle d'infection maternofœtale et néonatale, en particulier *H. influenzae*. En outre, ce milieu et ce système d'incubation permettent la mise en évidence des bactéries déficientes (certains streptocoques, entérobactéries, etc.) et de *Neisseria gonorrhoeae* qui est parfois isolée de ce type de prélèvement au cours des gonococcies maternelles.

L'ensemencement d'une gélose au sang de mouton base Columbia incubée en anaérobiose est absolument indispensable si l'on ne veut pas passer à côté d'une contamination materno-placento-fœtale à anaérobie et des rares mais possibles infections néonatales à bactéries anaérobies. En outre, l'examen du liquide gastrique est un bon indicateur du contenu bactérien du liquide amniotique au moment de l'accouchement. Il peut aider ainsi à documenter l'étiologie d'une chorioamniotite à anaérobies à risque d'endométrite du postpartum.

### *Interprétation des résultats des prélèvements du liquide gastrique et des prélèvements périphériques*

La pratique de l'amniocentèse a permis de démontrer qu'au cours de l'accouchement normal il existait une colonisation physiologique de la cavité amniotique. Dès l'ouverture de l'œuf, le liquide amniotique est rapidement colonisé par la flore bactérienne génitofécale, et ce même en l'absence de signe d'infection amniotique. Les résultats des cultures de liquides amniotiques obtenus par amniocentèse chez des patientes « contrôles » en travail ont montré que les cultures n'étaient négatives que dans 25 % des cas. Lorsque les cultures sont positives au cours de ces accouchements normaux, les quantités de bactéries ne sont > $10^5$ UFC/ml que dans 4 % des cas. Elles comportent des anaérobies dans 25 % des cas et des bactéries « à haut risque infectieux » dans 23 % des cas. Le liquide gastrique reflète à la naissance le contenu de la cavité amniotique éventuellement « surcolonisé » au passage de la filière génitale et sur le périnée. Cette colonisation microbienne naturelle explique la très grande variabilité de la sensibilité, de la spécificité et de la VPP de l'examen direct après coloration de Gram du liquide amniotique rapportée dans la littérature. En revanche, la VPN de la culture est bonne. Ainsi, la négativité de cet examen constitue l'un des arguments majeurs permettant de ne pas prescrire un traitement chez un nouveau-né en situation à risque infectieux ou d'interrompre le traitement lorsqu'un état infectieux suspecté à la naissance cliniquement ne se confirme pas.

### Interprétation des examens directs du liquide gastrique

L'examen direct du liquide gastrique après coloration de Gram nécessite l'examen d'au minimum 20 champs microscopiques. Il permet de recueillir deux informations :

- le nombre de polynucléaires par champ microscopique. Les polynucléaires sont comptés par champs microscopiques après coloration. Un nombre de polynucléaires moyens > 3/champ microscopique est observé chez environ un nouveau-né atteint d'infection certaine ou probable sur deux. Inversement, lorsqu'il n'existe pas de polynucléaire, une infection néonatale n'est observée que chez un nouveau-né sur dix prélevés ;
- le nombre de bactéries par champ microscopique. Un examen direct de liquide gastrique est considéré comme positif lorsque l'on observe un seul morphotype bactérien à la coloration de Gram. Il s'agit le plus souvent de cocci à Gram positif en diplocoques ou en chaînette (*S. agalactiae*) ou de bacilles à Gram négatif (*E. coli*), plus rarement de bacilles à Gram positif (*L. monocytogenes*). Les bactéries observées doivent être comptées par champs microscopiques. En effet, le nombre de bactéries observées par champ informe le pédiatre quant au risque d'infection néonatale certaine ou probable associé (tableau 27.3).

**TABLEAU 27-3**

**Densité des bactéries à l'examen direct du liquide gastrique et risque infectieux bactérien néonatal.**

| *Nombre de bactéries/champ microscopique* | *Prévalence des infections néonatales certaines ou probables* |
|---|---|
| 1–10 bactéries/ champ | Environ 1 cas sur 10 enfants positifs |
| 11–50 bactéries/ champ | Environ 1 cas sur 7 enfants positifs |
| 50–100 bactéries/ champ | Environ 1 cas sur 3 enfants positifs |
| Supérieur à 100 bactéries/champ | Environ 2 cas sur 3 enfants positifs |

### Interprétation des cultures du liquide gastrique et des prélèvements superficiels

Une culture négative du liquide gastrique et des prélèvements périphériques est fortement indicative de l'absence d'infection bactérienne en l'absence de traitement anté- ou pernatal (bonne VPN).

L'interprétation des cultures positives tient compte de la nature des bactéries observées, de la pureté de la culture et parfois du nombre de colonies observées.

- La présence de bactéries vaginales commensales appartenant à la flore dominante (lactobacilles essentiellement) est fortement corrélée avec une absence d'infection maternofœtale.
- La présence de *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes* et autres streptocoques β-hémolytiques, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* doit toujours être prise en considération. La présence de ces bactéries majore significativement le risque relatif (RR) d'infection maternofœtale chez le nouveau-né (exemple RR = 4 pour la présence de *S. agalactiae*).

- La présence d'entérobactéries, de streptocoques non β-hémolytiques, de bactéries de la flore buccale (*Eikenella, Kingella, Capnocytophaga*, etc.) majore moins notablement le risque relatif d'infection maternofœtale. C'est essentiellement dû aux difficultés qu'a le bactériologiste à différencier une colonisation naturelle par ces bactéries maternelles lors de l'accouchement d'une colonisation à risque d'infection maternofœtale par ces mêmes bactéries. En effet, aucun critère bactériologique n'a été validé et publié pour nous aider à faire cette différenciation. Néanmoins, le risque relatif d'infection paraît majoré lorsque ces bactéries (en particulier *E. coli*) sont retrouvées en culture pure sur le liquide gastrique ou sur les trois sites examinés (liquide gastrique + deux prélèvements superficiels). La pureté de la culture se juge sur l'examen de l'ensemble des milieux ensemencés, mais particulièrement sur la gélose non sélective incubée en anaérobiose et sur la gélose chocolat incubée sous $CO_2$.
- La présence de bactéries anaérobies en culture polybactérienne est assez commune sur la gélose au sang incubée en anaérobiose. Elle reflète la colonisation naturelle par les bactéries de la flore fécale. En revanche, une culture d'une bactérie anaérobie paraît bien corrélée avec un risque majoré d'infection lorsque la culture est monobactérienne et que le nombre de colonies est important (>100/boîte). En outre, un tel aspect peut être informatif pour étayer l'étiologie d'une chorioamniotite.

Le sens clinique à donner aux résultats de ces prélèvements est discuté mais :

- en présence de signes cliniques et biologiques d'infection néonatale, la bactérie isolée du liquide gastrique et des prélèvements superficiels est pratiquement toujours la même que celle isolée des prélèvements centraux lorsqu'ils sont positifs. Ainsi, lorsque les prélèvements centraux sont négatifs, les résultats de ces prélèvements sont fortement indicatifs ;
- devant une évolution clinique rapidement favorable chez un enfant suspect d'infection à la naissance et qui a un bilan biologique normal (protéine C-réactive en particulier), la négativité de ce bilan permet d'aider à exclure le diagnostic d'infection bactérienne et d'arrêter l'antibiothérapie éventuellement initiée à la naissance (bonne VPN).

En revanche, en l'absence de signes cliniques et biologiques d'infection néonatale chez un nouveau-né prélevé parce qu'il est né dans une situation à risque infectieux (RPM, accouchement prématuré, liquide teinté isolé), l'impact décisionnel d'un résultat positif de ces prélèvements varie notablement d'une équipe à une autre. La conduite à tenir doit faire l'objet d'une procédure élaborée par les différents acteurs concernés (obstétriciens, pédiatres, microbiologistes) et être connue de tous.

## Frottis placentaires et placentoculture

Ces examens avaient été préconisés au cours des années 1970 pour permettre un diagnostic rapide de l'infection hématogène à *L. monocytogenes*. En effet, l'examen direct des frottis placentaires est très performant dans la listériose maternofœtale. Depuis cette date, cet examen est toujours préconisé pour aider au diagnostic de listériose néonatale précoce. Certains ont étendu les indications à l'examen du liquide gastrique et, par conséquent, couplent systématiquement examen du placenta et examen du liquide gastrique. En effet, la positivité de l'examen direct des frottis placentaires effectué chez un nouveau-né suspect d'infection ou prélevé dans un contexte à risque infectieux est fortement associée à une infection (RR = 4,7) quel que soit le germe en cause.

Les experts de l'Anaes ont recommandé d'effectuer les examens du placenta uniquement lors des accouchements de mères fébriles (température >38 °C au repos et confirmée).

### Réalisation des prélèvements

Les frottis placentaires sont réalisés en salle de travail (fig. 27.3). L'excès de sang est éliminé avec une compresse stérile aussi bien sur la face maternelle que fœtale du placenta. Avec le petit bord d'une lame, on racle la face amniotique du placenta de l'insertion du cordon vers les membranes et on étale le produit de raclage grossièrement et en couche épaisse sur une seconde lame. On pratique de la même façon sur la face maternelle. Les deux étalements sont séchés à l'air libre et déposés dans un porte-lame. Les lames sont examinées au microscope en même temps que le frottis de liquide gastrique après fixation dans le liquide fixateur hémolytique de Carnoy (tableau 27.4) qui permet d'obtenir des lames faciles à lire.

Pour la culture de placenta, une biopsie d'environ 1 $cm^2$ de surface portant sur toute l'épaisseur du placenta, en plein centre des lésions si des abcès sont visibles (listériose par exemple) ou près de l'insertion du cordon si le placenta est apparemment normal, est réalisée. Le morceau de placenta recueilli est déposé dans un flacon stérile et conservé si nécessaire à 4 °C.

### Mise en culture

Les milieux à ensemencer sont identiques à ceux utilisés pour le liquide gastrique : au minimum une gélose au sang de cheval incubée en anaérobiose, une gélose au sang cuit + Polyvitex® incubée sous 5 à 8 % de $CO_2$, et une gélose au sang de mouton base Columbia incubée en anaérobiose (fig. 27.2).

**TABLEAU 27-4**

**Composition du bain fixateur hémolysant de Carnoy.**

| | |
|---|---|
| Éthanol 100 % ou alcool méthylique | 120 ml (6 volumes) |
| Chloroforme | 60 ml (3 volumes) |
| Acide acétique | 20 ml (1 volume) |

### Interprétation

Les examens directs et les cultures de placenta sont interprétés parallèlement et de la même façon que ceux du liquide gastrique. La cohérence des résultats des examens effectués sur le placenta et sur le liquide gastrique aide à différencier colonisation physiologique et contamination à risque infectieux, en particulier quand la culture met en évidence des entérobactéries, des streptocoques non β-hémolytiques, des anaérobies, et plus généralement des bactéries de la flore vaginale et intestinale. En effet, au cours des contaminations à risque infectieux, on observe une culture monobactérienne d'une même espèce sur les deux types de prélèvements, tandis que la colonisation naturelle du nouveau-né se traduit par un aspect polymorphe des cultures, surtout en anaérobie.

## Hémocultures

Les hémocultures sont réalisées chez tous les nouveau-nés suspects d'infection dès lors que le diagnostic de bactériémie est évoqué. En effet, ce moyen diagnostique reste la méthode de référence pour documenter la diffusion hématogène des bactéries à risque infectieux d'origine maternelle. Leurs performances sont très dépendantes de la qualité du prélèvement, en particulier lors de la ponction. Celles-ci sont réalisées si possible avant tout traitement antibiotique. Les hémocultures chez les nouveau-nés ont quelques spécificités en raison de la faible quantité de sang que l'on peut prélever.

### Mode de prélèvement

Les hémocultures peuvent être effectuées à partir du cathéter ombilical pendant les deux ou trois premiers jours. Sinon, la ponction est faite sur une veine périphérique après une désinfection avec un antiseptique conformément aux procédures élaborées dans chaque centre. La désinfection cutanée est parfois difficile chez les nouveau-nés fortement colonisés en périphérie. *S. agalactiae* et *E. coli,* lorsqu'ils sont présents en grande quantité sur les prélèvements superficiels, peuvent contaminer le flacon lors de la ponction, expliquant certaines hémocultures positives chez des nouveau-nés cliniquement et biologiquement normaux.

### Volume optimal à prélever

L'impact important du volume de sang ensemencé sur les performances des hémocultures a surtout été montré chez l'adulte. Chez le nouveau-né, une hémodynamique et des moyens de défenses différents n'autorisent pas à extrapoler les résultats obtenus chez l'adulte.

En pratique, les enquêtes montrent que la quantité de sang inoculée dans les flacons dans les centres de néonatologie est en moyenne de 0,6 à 0,7 ml et qu'un tiers des flacons contient moins de 0,5 ml de sang. Les difficultés pour prélever sont bien évidemment d'autant plus importantes que le nouveau-né est plus prématuré.

Depuis 2002, il est préconisé de prélever au moins un volume de 1 ml de sang voire 2 ml si le poids du nouveau-né le permet. Au-dessous de 0,5 ml, l'examen peut être considéré comme non conforme mais ne pourra pas être rejeté par le laboratoire et devra être exécuté.

### Nombre de flacons

Depuis les années 1970, chez le nouveau-né, il est admis que la réalisation d'une seule hémoculture est suffisante. Le rationnel de cette attitude est : 1) qu'il faut débuter le plus rapidement possible le traitement antibiotique – multiplier les ponctions impliquerait de retarder le début du traitement –; 2) qu'il faut éviter les ponctions veineuses répétées au risque de devoir transfuser le nouveau-né ; et 3) que la bactériémie est plus permanente chez le nouveau-né que chez l'enfant plus âgé ou l'adulte, et donc qu'il n'y a pas lieu de multiplier les prélèvements pour augmenter les chances de positivité.

### Durée d'incubation et interprétation

Il a été démontré que, chez le nouveau-né infecté, la probabilité pour qu'une hémoculture négative à 36 heures le soit toujours à 72 heures est de 99,8 %. En conséquence, la durée d'incubation de 5 jours généralement utilisée dans les laboratoires est suffisante. En outre, la VPN des hémocultures est telle qu'un délai de 48 à 72 heures est raisonnable pour réévaluer l'attitude thérapeutique chez les nouveau-nés en fonction de l'évolution clinique et du résultat des autres tests de laboratoire.

Lorsque les hémocultures sont positives à *E. coli* ou à *S. agalactiae*, il est recommandé de sérotyper les souches pour identifier *E. coli* de sérotype K1 ou *S. agalactiae* de sérotype III. Si les capacités techniques du laboratoire le permettent, le typage par PCR ou en spectrométrie de masse de *S. agalactiae* pour rechercher les souches de ST17 ou CC17, et d'*E. coli* pour rechercher les souches du groupe ECOR B2 peut être réalisé. L'identification de ces sérotypes et/ou complexes clonaux à très haut risque permet d'apporter un élément biologique supplémentaire pour évaluer le risque de méningite associé au sepsis de l'enfant. En effet, ces souches particulières sont la cause d'au moins 80 % des méningites néonatales

### Hémocultures quantitatives

Un travail ancien (1974) avait montré, chez des nouveau-nés âgés de 2 à 8 jours atteints de sepsis à *E. coli*, que les enfants avec plus de 1000 UFC/ml avaient une incidence des méningites 12 fois plus importante (60 % versus 5 %) et une mortalité deux fois plus importante (73 % versus 37 %). D'où l'idée d'effectuer des hémocultures quantitatives pour aider à évaluer le risque associé de méningite et le pronostic vital.

Actuellement, la mise sur le marché des automates d'hémocultures a changé les données. Ces appareils permettent souvent une croissance bactérienne dans un délai inférieur à 24 heures lors des infections néonatales d'origine maternelle. Les tentatives d'utilisation de

la quantification en néonatologie pour fixer une valeur seuil qui permettrait de différencier « contamination » et « infection » ont donné des résultats divergents.

## Examen bactériologique du liquide céphalorachidien

Cet examen permet de confirmer le diagnostic de méningite néonatale, pathologie actuellement moins fréquente – incidence dans les premières 72 heures de vie : environ 0,25 cas/1000 naissances vivantes.

### *Indications de la ponction lombaire*

Les rares études qui évaluent les pratiques des néonatologistes au regard des circonstances qui les conduisent à réaliser une ponction lombaire (PL) indiquent une assez grande variabilité des comportements, mais tous ont le souci de limiter cet examen. La PL à la naissance est traumatique dans un quart des cas et la quantité de LCR recueillie est inadéquate dans un quart des cas. Au total, 28 à 37 % des PL effectuées chez les nouveau-nés sont inutilisables pour exécuter un examen bactériologique correct.

Les indications de la PL les moins discutées chez les nouveau-nés sont : 1) les nouveau-nés suspects d'infection ayant des hémocultures positives, surtout lorsqu'il s'agit d'*E. coli* K1 ou de *S. agalactiae* de sérotype III (au moins 80 % des méningites néonatales) ; 2) les nouveau-nés suspects d'infections ayant des troubles neurologiques ; et 3) les nouveau-nés ayant une altération de l'état général non ou mal expliquée.

### *Paramètres caractérisant le LCR normal chez le nouveau-né*

Le LCR normal du nouveau-né comprend 0 à 50 globules blancs/mm$^3$. Le pourcentage de polynucléaires est très variable, mais les travaux les plus récents qui ont exclu toute infection par PCR montrent que 88 % des nouveau-nés n'ont pas de polynucléaires neutrophiles dans le LCR. La glycorachie se situe en moyenne à 50 mg/dl (34 à 119 mg/dl), soit 2,77 mmol/l (1,89 mmol/l à 6,60 mmol/l), et la protéinorachie à 0,64 g/l (0,15 à 1,7 g/l). Il faut comparer la glycorachie à la glycémie. Le rapport glucose LCR/sang normal est d'environ 0,5. Néanmoins, des controverses existent sur l'interprétation des résultats.

Lors des méningites, comme chez l'adulte, le nombre de leucocytes/mm$^3$ et la protéinorachie s'élèvent, tandis que la glycorachie et le rapport glucose LCR/sang diminuent.

### *Mise en culture*

Les cultures du LCR du nouveau-né s'effectuent comme pour tous les LCR (voir chapitre correspondant). Néanmoins, la quantité de liquide recueillie est régulièrement assez faible. Dans ce cas, une culture sur gélose au sang cuit Polyvitex® incubée sous 5 à 8 % de $CO_2$ et une culture en bouillon sont à privilégier.

### *Recherches spécifiques*

Lorsque le nouveau-né a été exposé in utero aux antibiotiques (prophylaxie *S. agalactiae*, prophylaxie dans la RPM, chorioamniotite) ou traité avant la PL sur des critères cliniques et biologiques, il faut rechercher les antigènes solubles de *S. agalactiae* et d'*E. coli* K1 dans le LCR (voir chapitres spécifiques).

Dans les mêmes circonstances, des recherches d'ADN bactérien par PCR peuvent se justifier : recherches avec des amorces spécifiques de *S. agalactiae* et d'*E. coli* et PCR universelle des ADN bactériens à l'aide d'amorces ciblant l'ARN16S, puis séquençage et identification des séquences par comparaison aux données des banques. Seule la mise à disposition de techniques validées autorise l'utilisation de ces méthodes moléculaires de diagnostic.

## Examen des urines pour le diagnostic d'infection néonatale

Chez le nouveau-né, le prélèvement d'urine a deux objectifs : diagnostiquer une infection urinaire éventuellement responsable de bactériémie, et rechercher des antigènes urinaires bactériens au cours des bactériémies.

### *Examen cytobactériologique des urines (ECBU)*

L'incidence de l'infection du tractus urinaire chez le nouveau-né varie de 0,1 à 1 % et peut atteindre 10 % chez les enfants de très petit poids. En réalité, ces chiffres incluent infections d'origine maternelle et infections nosocomiales. Chez le nouveau-né de moins de 3 jours, l'infection du tractus urinaire est en fait une éventualité rare. Plus probablement, les bactéries isolées dans l'urine chez le nouveau-né de moins de 72 heures sont reliées à la colonisation de surface ou sont le témoin d'une bactériémie.

Au total, en raison du faible service rendu par l'ECBU, il est recommandé de ne pas chercher à obtenir systématiquement une urine chez les nouveau-nés. En outre, il ne faut pas différer le traitement d'un nouveau-né pour attendre une émission d'urine.

### *Recherche d'antigènes urinaires*

S'ils sont réalisés, les tests de détection d'antigènes urinaires doivent l'être sur des urines concentrées 20 à 25 fois pour améliorer leurs performances. Lorsqu'un nouveau-né a pu être correctement exploré à la naissance (liquide gastrique et prélèvements périphériques + frottis placentaires et placentoculture si fièvre maternelle + hémocultures) en l'absence d'antibiothérapie préalable, la recherche d'antigènes urinaires n'apporte pas de service supplémentaire au patient. Inversement, ces tests peuvent aider à faire un diagnostic « rétrospectif » chez les nouveau-nés préalablement traités par les antibiotiques ou lorsque l'exploration initiale n'a été que partielle. Malheureusement, il n'y a pas de tests qui couvrent l'ensemble des étiologies des infections néonatales d'origine maternelle.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Aujard Y, Bingen E, Boithias C, Jarreau P, Raymond J. Infections néonatales primitives bactériennes et mycosiques. Marne-La-Vallée : Guigoz ; 2005.

Blond MH, Poulain P, Gold F, Bingen E, Watier H, Quentin R. Infection bactérienne maternofœtale. Encycl Méd Chir 2004 ; 5-040-C-10 : 1–40.

Denis F, editor. Infections bactériennes, parasitaires et fongiques transmissibles de la mère à l'enfant. Montrouge : John Libbey Eurotext ; 2002.

Diagnostic et traitement curatif de l'infection bactérienne précoce du nouveau-né. Recommandations pour la pratique clinique. 2002. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/argumentaireinn-mel_2006.pdf.

Mereghetti L, Watt S, Quentin R. Infections bactériennes à manifestations cutanées et conséquences obstétricales et néonatales. In : Machet L, Vaillant L, editors. Dermatologie en gynécologie obstétrique. Paris : Masson ; 2006. p. 129–40.

REMIC. Référentiel en microbiologie médicale. Société Française de Microbiologie. CMIT Vivactis Éditeur ; 2010.

Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker C. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 6th ed. Philadelphie : W.B. Saunders Company ; 2005.

CHAPITRE

28

# Prélèvements bactériologiques et assistance médicale à la procréation

L. Mereghetti, P. Lanotte, R. Quentin

## Introduction

L'infertilité, qui se définit par l'impossibilité de concevoir un enfant après un an de tentatives infructueuses, affecte environ 10 à 15 % des couples dans les pays industrialisés. Elle est liée à une cause féminine dans environ 33 % des cas, à une cause masculine dans environ 20 % des cas, et à une étiologie mixte impliquant à la fois la femme et l'homme dans 32 % des cas ; pour les 15 % des cas restants, aucune étiologie n'est retrouvée. Les étiologies de l'infertilité sont très nombreuses et parfois multiples, principalement liées à des pathologies tubaires, à des problèmes d'ovulation et à l'endométriose chez la femme (les malformations anatomiques y sont plus rares), alors que les causes masculines sont essentiellement des oligospermies ou des azoospermies ; certaines de ces étiologies sont d'origine bactérienne.

Une partie de ces causes d'infertilité peut être prise en charge dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation, qui est l'ensemble des procédés par lesquels la fusion du spermatozoïde et de l'ovule est réalisée en dehors des relations sexuelles. Plusieurs techniques existent : insémination artificielle avec sperme du conjoint, fécondation in vitro intraconjugale ou avec sperme du donneur, fécondation assistée type microinjection intracytoplasmique, etc. Dans le contexte de l'assistance médicale à la procréation, la réalisation des prélèvements bactériologiques s'envisage avec deux objectifs distincts.

- Le premier objectif est d'identifier une éventuelle cause infectieuse à l'infertilité. Ces infections sont surtout dues à *Chlamydia trachomatis*, plus rarement à *Neisseria gonorrhoeae* ou à des pathogènes ordinaires, éventuellement anaérobies, et plus exceptionnellement à *Mycobacterium tuberculosis*.
- Le deuxième objectif est d'identifier une colonisation bactérienne, soit d'un échantillon (par exemple sperme), soit d'une localisation anatomique (par exemple endocol), soit d'un milieu de culture (par exemple milieu de conservation des ovocytes), qui aurait un impact sur la réalisation de la fécondation in vitro ou l'implantation de l'œuf.

## Diagnostic bactériologique direct chez l'homme

### Prélèvements

Le prélèvement du sperme est réalisé au laboratoire. Le recueil doit se faire après une abstinence de 2 à 5 jours, immédiatement après vidange vésicale. Après décalottage du gland, il faut réaliser une toilette soigneuse du méat et du gland au savon antiseptique, ainsi qu'un lavage des mains avec le même produit. Appliquer ensuite une solution antiseptique sur le méat et le gland, puis rincer au sérum physiologique pour éliminer toutes traces d'antiseptiques. Après masturbation, l'éjaculat est recueilli dans un flacon stérile.

Certains centres réalisent également un examen cytobactériologique des urines à titre systématique (voir le chapitre « Examen cytobactériologique des urines »).

En cas de symptomatologie urétrale, réaliser également un prélèvement urétral (voir le chapitre « Prélèvements génitaux chez l'homme »).

### Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique

#### *Examen direct*

L'examen direct à l'état frais, ou par colorations de Gram ou de May-Grünwald-Giemsa, est peu contributif. De même, la numération leucocytaire après dilution du sperme donne des résultats peu satisfaisants et non reproductibles.

#### *Cultures*

##### Milieux de culture

Pour la recherche de bactéries communes, ensemencer 10 ou 100 µl de sperme dilué au 1/10e sur une gélose au sang (base Columbia ou trypticase-soja, enrichie de 5 % de sang de cheval ou de mouton) et une gélose type chocolat Polyvitex®. Certains laboratoires utilisent également une gélose au sang incubée en atmosphère anaérobie. Incuber les géloses 48 heures au minimum.

Pour les mycoplasmes génitaux, ensemencer 100 µl de sperme non dilué sur milieux enrichis en sérum et extrait de levures. Il existe des milieux solides (type gélose A7) et des milieux liquides (minigalerie type Mycofast® Evolution) qui permettent à la fois l'identification, la numération et l'antibiogramme du mycoplasme. Les géloses sont incubées 48 à 72 heures et les minigaleries 24 à 48 heures. Il est à noter que ces milieux permettent la croissance d'*Ureaplasma urealyticum* et de *Mycoplasma hominis*, mais pas de *Mycoplasma genitalium*.

Pour la recherche de *Chlamydia trachomatis*, la culture sur milieux gélosés est impossible. L'examen de référence est la culture cellulaire sur cellules HeLa 229 ou MacCoy, présentant une excellente spécificité, une sensibilité de 80 à 90 %, mais elle reste réservée à quelques laboratoires spécialisés.

### Identification

L'identification des bactéries « communes » se fait par les techniques usuelles, types galeries API® (bioMérieux), cartes Vitek b® (bioMérieux), plaques Microscan® (Siemens) ou Phoenix® (Becton-Dickinson), etc.

Sur milieux gélosés, la morphologie des mycoplasmes génitaux observée au microscope (objectif 40) est caractéristique : colonies avec partie centrale plus dense et périphérie plus claire (image en « œuf au plat ») évocatrices de *Mycoplasma hominis* ; colonies denses de façon homogène (image en « oursin ») évocatrices d'*Ureaplasma urealyticum*. L'identification des mycoplasmes génitaux par minigaleries repose sur leur résistance naturelle vis-à-vis de certains antibiotiques (voir tableau 25.2). Ces minigaleries permettent également de numérer *Ureaplasma urealyticum* ($10^3$, $10^4$ ou $\geq 10^5$ unités de changement de couleur par ml [UCC/ml]) et *Mycoplasma hominis* ($\geq 10^4$ UCC/ml). S'il y a discordance entre les résultats observés sur minigaleries et sur milieux gélosés, par exemple minigalerie positive et gélose négative, repiquer les cupules positives de la minigalerie sur milieux gélosés afin de vérifier la morphologie des colonies.

### Résultats et interprétation

Concernant les bactéries « communes », en fonction du soin apporté à la réalisation du prélèvement, environ 50 à 75 % des spermocultures sont négatives, 20 à 50 % sont polybactériennes et 1 à 5 % sont monobactériennes. Compte tenu de la présence d'une flore commensale sur le tiers externe de l'urètre, un seuil de $10^3$ à $10^4$ bactéries/ml est retenu suivant les équipes. L'identification et l'antibiogramme seront réalisés en cas de culture monobactérienne ou en cas de nette prédominance d'une espèce.

En revanche, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* sont des commensaux des voies génitales, ce qui rend plus difficile l'appréciation de leur pathogénicité. L'aspect quantitatif est donc important à prendre en considération.

La présence de *Chlamydia trachomatis* signe l'infection, qu'elle soit symptomatique ou non.

### Antibiotiques à tester

La détermination de la sensibilité des bactéries « communes » se fait selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie.

La détermination de la sensibilité des mycoplasmes peut se faire par antibiogramme en milieu liquide en utilisant les galeries d'identification.

## *Recherche de constituants bactériens*

### Antigènes

Deux techniques permettent la détection de *Chlamydia trachomatis* à partir de prélèvements urétraux.

- L'immunofluorescence directe permet la mise en évidence des corps élémentaires à partir de frottis ou d'étalements. Elle dépend de la qualité et du type d'anticorps utilisé ainsi que de l'expérience de l'opérateur. Elle est spécifique et rapide (environ 1 heure), mais présente une sensibilité moyenne.
- Les réactions immuno-enzymatiques sont des techniques automatisées, sensibles et très spécifiques, relativement rapides (environ 4 heures) ; elles sont utilisables sur les prélèvements urétraux mais pas sur les urines.

### Recherche génomique

Différentes techniques sont actuellement commercialisées et utilisables. Elles sont très sensibles et très spécifiques, rapides (environ 4 heures), mais relativement onéreuses. Comme pour toute PCR, il est important de s'entourer de précautions : contrôles positif et négatif, recherche d'inhibiteur par utilisation de standard interne. Il faut également éviter de contrôler trop précocement après traitement, la réaction pouvant être positive alors que l'antibiotique a été efficace.

# Diagnostic bactériologique direct chez la femme

## Prélèvements

Les prélèvements réalisés chez la femme n'ont rien de spécifique : un prélèvement d'endocol et un prélèvement vaginal.

La recherche de *Chlamydia trachomatis* peut également être réalisée par PCR sur un échantillon de premier jet d'urines.

Certains centres réalisent également un ECBU à titre systématique.

## Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique

La conduite pratique de l'examen bactériologique de ces prélèvements est réalisée selon la méthodologie décrite dans le chapitre « Prélèvements génitaux chez la femme ».

## Diagnostic bactériologique indirect

La sérologie à *Chlamydia trachomatis* n'a pas de réel intérêt dans le bilan d'infertilité chez l'homme, en dehors d'une notion d'(orchi)épididymite. En revanche, la présence d'immunoglobulines de type A dans le sperme est en faveur d'un processus inflammatoire lié à l'entretien de la réaction immunitaire par les antigènes de la membrane externe de la bactérie. Ce marqueur est souvent le seul positif lors d'une chlamydiose chronique active, alors que la culture, la recherche directe et même la PCR sont négatives.

La sérologie à *Chlamydia trachomatis*, qui n'a pas d'intérêt dans les infections génitales basses, est en revanche contributive en cas d'infection profonde ; elle est donc indiquée dans le bilan d'infertilité chez la femme, en raison de la possibilité de salpingite.

La sérologie à *Treponema pallidum* est réalisée systématiquement chez l'homme et la femme.

Dans le bilan sérologique, il convient de penser également à la recherche d'anticorps vis-à-vis des VIH, VHB et VHC, qui est prévue par les textes réglementaires.

## Contrôle des milieux de culture

Différents milieux sont utilisés pour le recueil et la conservation des spermatozoïdes et des ovocytes. Il est possible qu'après mise en contact des spermatozoïdes et des ovocytes, la fécondation n'ait pas lieu en raison d'une contamination du milieu par des bactéries. Dans ce cas, un contrôle bactériologique est réalisé à la demande du laboratoire de biologie de la reproduction, à la recherche de bactéries « communes » ou de mycoplasmes.

Pour la recherche de bactéries « communes », ensemencer une gélose au sang (base Columbia ou trypticase-soja, enrichie de 5 % de sang de cheval ou de mouton) et une gélose type chocolat Polyvitex® ; une gélose lactosée type CLED peut être ajoutée.

Pour la recherche de mycoplasmes, procéder comme indiqué pour un échantillon de sperme.

CHAPITRE

# 29 Incidents transfusionnels d'origine bactérienne : rôle du laboratoire

F. Garnier, F. Denis

Deux types de produits biologiques d'origine humaine peuvent être utilisés au cours des transfusions, les produits sanguins labiles (PSL) et les produits sanguins stables (médicaments dérivés du sang).

Les incidents transfusionnels concernent principalement les PSL et relèvent de deux mécanismes :

- immunologiques :
  - réactions immuno-hématologiques ;
  - incompatibilité protéique ;
  - œdème pulmonaire lésionnel post-transfusionnel ;
  - allo-immunisation antileucoplaquettaire ;
  - réaction du greffon contre l'hôte post-transfusionnelle ;
  - immunisation de l'hémophilie A au facteur VIII ;
  - réactions allergiques.
- non immunologiques :
  - accidents infectieux ;
  - accident de surcharge.

Les signes traduisant une mauvaise tolérance d'une transfusion sont : hyperthermie avec ou sans frissons, agitation, sensation de chaleur, douleurs lombaires ou surtout thoraciques, hypotension voire collapsus, plus rarement hypertension, nausées ou vomissements, diarrhées, bouffées de chaleur, dyspnée, pâleur, sensation de prurit ou d'urticaire, saignements (en particulier aux points d'injection), tachycardie.

L'observation d'un ou de plusieurs de ces signes impose :

- l'arrêt immédiat de la transfusion, l'appel du médecin de proximité ;
- le maintien d'une voie d'abord pour la perfusion d'un soluté ;
- un examen clinique incluant la prise de la température, de la pression artérielle, de la mesure de la fréquence cardiaque, l'examen des urines ;
- la saisie de l'unité en cours de transfusion, des tubes de sang disponibles et des contrôles effectués ;
- la mise en place de mesures thérapeutiques immédiates (réanimation) ;
- la transmission des unités de sang au laboratoire de bactériologie en cas de suspicion d'accident par contamination bactérienne, au laboratoire d'immuno-hématologie en cas de suspicion d'accident immuno-hémolytique (accompagnés de prélèvements du malade), en informant les correspondants de l'établissement de soins et de l'établissement de transfusion qui pourront coordonner ces actions et en diligenter d'autres en fonction des observations cliniques.

L'ensemble des observations fera l'objet d'une déclaration dans les 48 heures au réseau d'hémovigilance (fiche d'incident transfusionnel).

Parmi les accidents infectieux, sont retrouvées les transmissions de maladies virales, de parasitoses et les infections bactériennes. L'infection microbienne par contamination bactérienne du produit sanguin transfusé est devenue aujourd'hui la principale contamination infectieuse transfusionnelle et la plus létale. Elle peut entraîner un choc septique ou endotoxinique immédiat et grave.

## Épidémiologie des accidents bactériens

Aux États-Unis, une contamination bactérienne entraînant la mort a été observée pour 6 à 9 millions d'unités transfusées. Sur 182 accidents transfusionnels mortels survenus en 5 ans, 29, soit 16 %, étaient dus à une infection bactérienne. Avec 21 accidents, la responsabilité des produits plaquettaires apparaît largement prédominante, représentant près de trois quarts des accidents.

En France, sur une période de 46 mois, de 1994 à 1997, 106 cas authentifiés par un isolement bactérien à partir du produit ont été dénombrés, avec 16 décès sur les 63 déclarés. L'étude Bacthem, réalisée entre 1996 et 1998, a évalué l'incidence des accidents mortels à 1,1 accident par million d'unités distribuées soit :

- 1 par million pour les concentrés de globules rouges ;
- 7,1 par million pour les concentrés de plaquettes d'aphérèse.

Sur la totalité des accidents, les mélanges de concentrés plaquettaires montrent une incidence évaluée à 71,8 accidents par million.

## Prise en charge de la poche au laboratoire

Vu la circulaire n° DGS/SD3C/DHOS/AFSSAPS/2003/581 du 15 décembre 2003 relative aux recommandations concernant la conduite à tenir en cas de suspicion d'incident transfusionnel par contamination bactérienne (ITCB) et les recommandations du groupe de travail « Validation des infections bactériennes transmises par transfusion » de

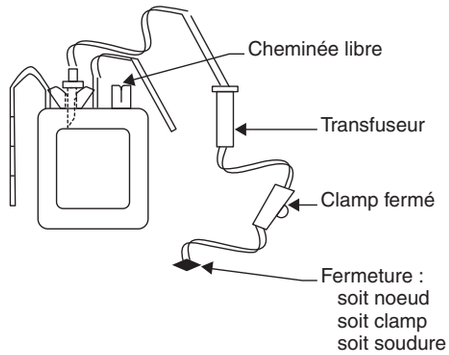



Fig. 29.1. – *Poche arrivant au laboratoire.*

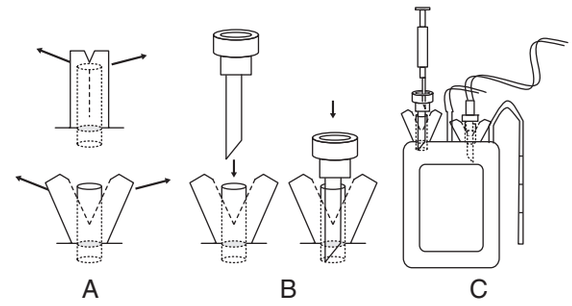



Fig. 29.2. – *Manœuvres à effectuer au laboratoire pour le prélèvement de la poche.*
A) Dégagement de la cheminée. B) Introduction du site de prélèvement. C) Prélèvement de la poche.

l'Afssaps de janvier 2008, devant toute suspicion d'ITCB, la perfusion doit être arrêtée et la poche acheminée au laboratoire référent selon la procédure régionale définie entre le correspondant d'hémovigilance (CHV), le coordinateur régional d'hémovigilance (CRH) et le laboratoire référent. Le choix du laboratoire référent régional pour la prise en charge des examens bactériologiques dans le cadre des ITCB se fait conformément à la circulaire n° 03-851 du 15 décembre 2003. La poche devra être acheminée le plus rapidement possible au laboratoire, à température ambiante si le délai ne dépasse pas 2 heures, sinon à +4 °C, dans une caisse isotherme avec un dispositif de production de froid.

Une fois arrivée au laboratoire de bactériologie, la poche est prise en charge par le personnel chargé de la manipulation des PSL qui disposera des caractéristiques de ces dernières. Ce personnel aura été formé et habilité par le responsable du laboratoire.

La poche doit parvenir au laboratoire dans son emballage protecteur d'origine avec une cheminée libre si possible (pour pouvoir effectuer les prélèvements) et la tubulure clampée sans aiguille (fig. 29.1). Toute poche de sang non clampée ou percée doit être refusée.

Le personnel doit vérifier que des hémocultures ont bien été réalisées ; il est recommandé d'en pratiquer deux à une heure d'intervalle en précisant pour chaque flacon l'heure du prélèvement et si une antibiothérapie a été instaurée, et ce à partir d'un abord veineux différent de celui sur lequel a eu lieu la perfusion. En fonction de la clinique, d'autres prélèvements à visée étiologique (culture du cathéter, recherche d'infection de site, examen cytobactériologique des urines, etc.) peuvent être nécessaires.

## Prélèvement

La poche doit impérativement être manipulée sous un poste de sécurité microbiologique (PSM Type II), avec du matériel à usage unique. L'opérateur, après avoir réalisé une hygiène des mains soit par lavage simple à l'aide d'un savon doux ou pas désinfection avec une solution hydroalcoolique, met des gants. Les surfaces à ponctionner doivent être désinfectées avec de l'alcool iodé à 1 % ou un désinfectant équivalent. Dégager la cheminée de connexion de la poche en écartant les languettes en plastique (fig. 29.2A), la désinfecter et introduire le dispositif de prélèvement fourni par le centre de transfusion sanguine (fig. 29.2B). Après désinfection de l'embout, prélever à l'aide d'une seringue de 10 ml le contenu de la poche pour l'examen microscopique et l'ensemencement des différents milieux (fig. 29.2C). Si les poches sont vides, rincer la poche en injectant à l'aide d'une seringue au travers de l'embout 20 ml de soluté physiologique isotonique stérile, puis les prélever comme précédemment.

## Examen microscopique

Sur tout contenu de la poche, une coloration de Gram et/ou, selon les cas, toute autre coloration que le biologiste juge nécessaire est réalisée. Si l'examen direct est positif, le service clinique concerné, l'établissement de transfusion sanguine ainsi que l'hémovigilance seront prévenus le plus rapidement possible.

## Mise en culture

Des milieux liquides et solides sont systématiquement ensemencés.

### Milieux solides

Deux géloses au sang de cheval ou de mouton sont ensemencées avec 0,1 ml du contenu de la poche. Après étalement du prélèvement en surface, la première gélose est incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures tandis que la deuxième est placée à 37 °C en anaérobiose pendant 5 jours.

### Milieux liquides

Deux flacons pour hémoculture, référencés et enregistrés à l'Afssaps, l'un pour l'aérobiose et l'autre pour l'anaérobiose, sont ensemencés avec 5 à 10 ml du contenu

de la poche. Ces milieux seront incubés à 37 °C pendant 10 jours. La positivité peut être détectée à l'œil ou à l'aide d'un automate.

## Résultats

Lorsque les milieux solides sont positifs, une identification et un antibiogramme sont réalisés selon les procédures du laboratoire.

Lorsque les milieux liquides sont positifs, il convient de réaliser :

- un examen direct après coloration de Gram ;
- un repiquage systématique des flacons :
  - Flacon aérobie : une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures et une gélose de type Sabouraud ou équivalent, incubée à une température de 20 à 25 °C pendant 5 jours pour le flacon aérobie ;
  - Flacon anaérobie : une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures et une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en anaérobiose pendant 5 jours.

En fonction de l'examen microscopique, le repiquage pourra être effectué sur tout autre milieu adapté.

À partir des repiquages, une identification et un antibiogramme seront réalisés selon les procédures du laboratoire et la souche conservée à – 80 °C.

Quel que soit le résultat de la culture, négatif ou positif, un résultat définitif est transmis au service clinique concerné, à l'établissement de transfusion sanguine ainsi qu'à l'hémovigilance.

Lorsque la culture est positive sur un seul des milieux ou en cas de culture polymicrobienne, une discussion entre le bactériologiste et le clinicien est nécessaire afin de déterminer s'il peut s'agir ou non d'une contamination. De toutes les façons, toutes les souches isolées doivent être conservées à – 80 °C. Le biologiste devra aussi récupérer les données microbiologiques de tous les prélèvements pré- et post-transfusionnels disponibles du receveur afin de recenser l'ensemble des éléments microbiologiques pour analyse et comparaison.

Parallèlement, le biologiste surveille les hémocultures du receveur afin de vérifier si celles-ci sortent positives, et si oui, avec quel germe. Une identification et un antibiogramme seront systématiquement réalisés sur le germe isolé. Toutes les souches isolées des hémocultures du receveur sont elles aussi conservées à – 80 °C. Si le même germe est retrouvé à la fois dans le PSL et dans une hémoculture du receveur, le biologiste doit comparer phénotypiquement et génotypiquement les souches entre elles afin de déterminer si elles sont vraiment semblables, ce qui serait en faveur d'un ICTB. Si c'est le cas, les souches doivent alors être centralisées par l'Afssaps et le biologiste sera alors le référent qui sera destinataire de la fiche de liaison (fig. 29.3) à renseigner. Il devra coordonner l'enlèvement des souches par le transporteur jusqu'à leur réception à l'Afssaps. Les souches accompagnées de la fiche de liaison sont récupérées par le transporteur et acheminées à l'unité de microbiologie de l'Afssaps selon les « normes de conditionnement et d'expédition de matières infectieuses » en vigueur.

## Espèces bactériennes incriminées

Les bactéries retrouvées dans les produits sanguins peuvent avoir trois origines :

- bactéries commensales normales de la peau humaine : la flore résidente est constituée essentiellement de cocci à Gram positif (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, notamment *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*), des bacilles à Gram positif (*Corynebacterium* notamment *C. jeikeium* et *C. urealyticum*) et des anaérobies (*Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* et *Eubacterium*) ;
- bactéries de l'environnement aérien et des surfaces : la flore transitoire est plus variable, pouvant comporter des entérobactéries et des bactéries d'origine hydrique ; trois germes sont particulièrement impliqués : *Serratia*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Plus rarement, des souches de *Flavobacterium* et de *Bacillus* sont retrouvées ;
- bactéries du flux circulatoire du donneur dans un contexte bactériémique ou systémique ; *Yersinia enterocolitica*, espèce capable de se développer en 21 jours à 4 °C, est la plus retrouvée. Exceptionnellement, *Y. pseudotuberculosis* et *Listeria monocytogenes* sont signalées. Dans certaines régions, des contaminations par *Borrelia burgdorferi* ou *Coxiella burnetii* sont observées.

La répartition des espèces est très variable d'une enquête à l'autre, comme le montre le tableau 29.1. D'après l'étude Bacthem, les concentrés de globules rouges étaient en France majoritairement contaminés par bacilles à Gram négatif suivis par les cocci à Gram positif (tableau 29.1). Dans les concentrés plaquettaires, la part des cocci à Gram positif est sensiblement la même que celle des bacilles à Gram négatif ainsi que celle des bacilles à Gram positif (tableau 29.1).

Le risque de survenue et la gravité de l'ITCB sont étroitement liés à la prolifération de la bactérie, mais également à la production de molécules toxiques (exotoxines et/ou endotoxines). Bien qu'il ne soit pas possible de définir un seuil précis, une contamination supérieure $> 10^5$ UFC/ml est considérée comme le seuil au-delà duquel l'ITCB sera grave. Dans certains cas particuliers, les conditions sont favorables à la prolifération des bactéries présentes (taille de l'inoculum, méthode de préparation, température de stockage, souche, PSL, etc.) ; le PSL devient alors un remarquable milieu de culture. Les concentrés de globules rouges (CRG) sont propices au développement des souches et espèces cryophiles (prolifération à + 4 °C), du fait de leur température de stockage (+ 4 °C), telles que *Y. enterocolitica*. Les concentrés plaquettaires (CP), conservés à une température de 22 °C, sont plus propices à la prolifération d'un grand nombre

afssaps
Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

**IBTT - FICHE DE LIAISON à renseigner**
**A joindre lors de la récupération des souches**
**à centraliser par le transporteur Afssaps**

***Unité Hémovigilance***

**Nom et adresse du laboratoire référent :**

.....

Nom prénom de la personne à contacter dans le laboratoire en cas de besoin : .....

.....

Coordonnées téléphoniques :: Fax :

Email : .....

Date de l'envoi : .....

Fiche d'effet indésirable receveur numéro (FEIR) : ☐☐☐☐ ☐☐☐☐☐☐☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐

Nombre de souche(s) : .....

**Origine du prélèvement de la (des) souche(s)**

| **PSL** ☐ | **Patient** ☐ | **Donneur** ☐ | **Autres** ☐ |
|---|---|---|---|
| Date de prélèvement : __/__/__ | Date de prélèvement : __/__/__ | Date de prélèvement : __/__/__ | Date du prélèvement : __/__/__ |
| **Type de PSL :**<br>**CGR** ☐<br>**Plaquettes** ☐<br>**Plasma** ☐<br>**Autre PSL : préciser**<br>..... | **Traitement antibiotique en cours :**<br>**Oui** ☐<br>**Non** ☐<br>**Si oui, préciser :**<br>..... | **Type de prélèvement effectué :**<br>**Sang** ☐<br>**Cutané** ☐<br>**Orifices** ☐<br>**Autres :**..... | **Environnement** ☐<br>**Préciser :**.....<br>**Tube de qualification du don** ☐<br>**Cathéter** ☐<br>**Autres (préciser) :**<br>..... |
| **Examen enregistré :**<br>date :.....<br>numéro :..... | **Examen enregistré :**<br>date :.....<br>numéro :..... | **Examen enregistré :**<br>date :.....<br>numéro :..... | **Examen enregistré :**<br>date :.....<br>numéro :..... |
| **Résultats de l'identification :**.....<br>.....<br>.....<br>.....<br>..... | **Résultats de l'identification :**.....<br>.....<br>.....<br>.....<br>..... | **Résultats de l'identification :**.....<br>.....<br>.....<br>.....<br>..... | **Résultats de l'identification :**.....<br>.....<br>.....<br>.....<br>..... |

* les tubes devront être identifiés avec le numéro d'examen

**Commentaires éventuels :**

.....

.....

Joindre les éléments de l'identification de la souche par le laboratoire : phénotypage, génotypage et autres éléments d'identification. Lorsque plusieurs souches sont concernées (patient, PSL…), joindre les antibiogrammes et les éléments de comparaison.

Cette fiche de renseignements devra être : 25/27
- faxée au : 01 55 87 41 12 (Afssaps) et fax du CRH concerné,
- envoyée conjointement au prélèvement(s) à centraliser à l'Afssaps.

Fig. 29.3. – *Fiche de liaison de l'Afssaps.*

**TABLEAU 29-1**

**Organismes isolés de concentrés de globules rouges et de concentrés plaquettaires lors d'incidents transfusionnels d'origine bactérienne lors des études Bacon, Shot et Bachtem (d'après Brecher et al.).**

| *Germes* | *États-Unis* | *Royaume-Uni* | *France* |
|---|---|---|---|
| **Concentrés de globules rouges** | | | |
| Gram positif | 40 % | 50 % | 44,8 % |
| *Staphylococcus* non *aureus* | 40 % | 50 % | 10,3 % |
| *Streptococcus* sp. | | | 13,8 % |
| *Staphylococcus aureus* | | | 6,9 % |
| *Enterococcus faecalis* | | | 3,45 % |
| *Bacillus cereus* | | | 6,9 % |
| *Propionibacterium acnes* | | | 3,45 |
| Gram négatif | 60 % | 50 % | 55,2 % |
| *Serratia liquefaciens* | 40 % | 25 % | 6,9 % |
| *Serratia marcescens* | 20 % | | |
| *Yersinia enterocolitica* | | 25 % | 3,45 % |
| *Enterobacter* sp. | | | 3,45 % |
| *Acinetobacter* sp. | | | 17,25 % |
| *Pseudomonas* sp. | | | 6,9 % |
| *Escherichia coli* | | | 10,35 % |
| *Klebsiella pneumoniae* | | | 3,45 % |
| *Proteus mirabilis* | | | 3,45 % |
| **Concentrés plaquettaires** | | | |
| Gram positif | 60,7 % | 82,4 % | 62,5 % |
| *Bacillus cereus* | 3,6 % | 23,5 % | 12,5 % |
| *Staphylococcus* non *aureus* | 32,1 % | 35,3 % | 31,25 % |
| *Streptococcus* sp. | 10,7 % | 11,8 % | |
| *Staphylococcus aureus* | 14,3 % | 11,8 % | |
| *Propionibacterium acnes* | | | 18,75 % |
| Gram négatif | 39,3 % | 17,6 % | 37,5 % |
| *Klebsiella* sp. | | | 12,5 % |
| *Serratia* sp. | 7,1 % | | 6,25 % |
| *Escherichia coli* | 17,9 % | 11,8 % | 6,25 % |
| *Acinetobacter* sp. | | | 6,25 % |
| *Enterobacter* sp. | 7,1 % | 5,8 % | 6,25 % |
| *Providentia rettgeri* | 3,6 % | | |
| *Yersinia enterocolitica* | 3,6 % | | |

de bactéries. Ils constituent la catégorie de PSL la plus à risque.

Le risque d'ITCB avec un CP est 5 fois supérieur à celui à la transfusion de CGR. Le risque est encore accru par l'emploi de mélanges de CP. Par ailleurs, le risque d'apparition d'ITCB s'accroît avec la durée de conservation des PSL, >8 jours pour les CGR et >1 jour pour les CP, multipliant le risque par deux.

## Conclusion

Tous les produits bactériens ne présentent pas le même risque de contamination. Du fait de leurs modalités de conservation, les concentrés plaquettaires, notamment les mélanges, sont de loin les plus souvent en cause. Pour cette raison, plusieurs pays ont introduit soit une recherche bactérienne systématique sur les préparations plaquettaires comme les Pays-Bas – par culture automatisée ou par mesure de la consommation d'oxygène, ou bien par cytométrie en phase solide –, soit une inactivation des pathogènes à l'aide de substances photochimiques, la riboflavine (vitamine $B_2$) ou l'amotosalen. Parmi l'ensemble des micro-organismes en cause, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries et *Yersinia enterocolitica* sont particulièrement dangereux. Afin de diminuer le nombre d'ITCB, il est important de poursuivre l'amélioration de l'hygiène des conditions de prélèvement, des conditions drastiques lors de la manipulation des PSL, notamment des CP, et de rechercher les moyens d'éviter la prolifération bactérienne en cours de conservation. Le laboratoire de référence joue un rôle important dans la recherche et la détection du germe incriminé au niveau du PSL, mais aussi dans les hémocultures du patient receveur.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. Clin Microbiol Rev 2005; 18 : 195–204.

Cazenave JP. Les bactéries : je dépiste ou j'inactive ? Transfus Clin Biol 2007; 14 : 81–5.

Circulaire DBS (DH). AFS n° 85 du 10 octobre 1995.

Circulaire n° 03-851 du 15 décembre 2003.

De Micco P, Guilian C, Legrand D. In : Lefrère JJ, Rouger P, editors. Transfusion sanguine : une approche sécuritaire. Montrouge : Médecine Science–John Libbey Eurotext; 2000. p. 170–89.

Garnier F, Denis F. Rôle du laboratoire de bactériologie en cas de suspicion d'incidents transfusionnels bactériens. Spectra Biologie 2010; 180 : 34–9.

Larsen CP, Ezligni F, Hermansen NO, Kjeldsen J. Six year's experience of using the Bact/Alert system to screen all platelet concentrates to estimate the frequency of false-negative results. Vox Sang 2005; 88 : 93–7.

Morel P, Deschaseaux M, Bertrand X, Naegelen C, Talon D. Transfusion et bactéries : risque résiduel et perspectives de prévention. Transfus Clin Biol 2003; 10 : 192–200.

Perez P, Salmi LR, Follea G, Schmit JL, de Barbeyrac B, Sudre P, et al., BACTHEM group, French Haemovigilance Network. Determinants of transfusion-associated bacterial contaminations : results of the French BACTHEM Case-Control Study. Transfus 2001; 41 : 862–72.

Recommandations du groupe de travail. Validation des infections bactériennes transmises par transfusion. Afssaps de janvier 2008.

Sazama K. Bacteria in blood for transfusion. Arch Pathol Lab Med 1994; 118 : 350–65.

Wagner S. Transfusion-transmitted bacterial infection : risks, sources and interventions. Vox Sang 2004; 86 : 157–63.

CHAPITRE

30

# Contrôle microbiologique des tissus et des cellules à usage thérapeutique

F. Garnier, M. Drouet, F. Denis

Si l'utilisation de tissus et de cellules à usage thérapeutique est ancienne, l'organisation des structures de conservation de tissus et/ou cellules est récente et fait suite à l'application de décrets qui établissent les conditions d'autorisation d'ouverture des banques de tissus et des centres de thérapie cellulaire ainsi que d'arrêtés qui fixent les règles de bonnes pratiques relatives à l'utilisation thérapeutique des tissus ou des cellules humaines. Cette réglementation exclut les produits sanguins labiles.

## Produits thérapeutiques d'origine humaine

Les banques de tissus ont en charge les tissus ou leurs dérivés (cornée, peau, os, etc.), les centres de thérapie cellulaire prenant en charge les cellules (cellules souches hématopoïétiques [CSH], du sang périphérique ou du sang de cordon) et les cultures cellulaires effectuées à partir de prélèvements tissulaires ou cellulaires (culture de peau, clones antitumoraux). Ces deux activités sont très souvent prises en charge par la même structure (tableau 30.1).

Les tissus et les cellules peuvent être prélevés sur des donneurs vivants ou décédés :

- le don sur donneur décédé peut s'effectuer sur un donneur en état de mort encéphalique lors du prélèvement des organes ou sur un donneur cadavérique dans les 6 heures après le décès ; ce délai peut être reporté à 24 heures si le corps a été conservé à +4 °C ;
- le don du vivant concerne surtout les résidus opératoires, les prélèvements de CSH et également les prélèvements autologues (tissus conservés pour être greffés chez le même malade).

Selon leur origine, ces éléments peuvent être stériles (résidu opératoire, CSH) ou potentiellement porteurs d'une flore bactérienne (cornée, peau).

## Étapes du procédé de production des produits humains à usage thérapeutique

Toutes les étapes allant du recueil à la distribution de ces dérivés du corps humain doivent être parfaitement décrites dans un manuel qualité, et être validées.

Les étapes comprennent : le prélèvement, la réception, la transformation, le stockage, la distribution, le transport.

### Prélèvement

Le prélèvement est effectué par un médecin préleveur habilité qui doit s'assurer de l'absence de toute contre-indication médicale au prélèvement chez le donneur. Il effectue les prélèvements stérilement, éventuellement après avoir décontaminé les tissus. Ainsi, avant un prélèvement de cornée, le globe oculaire doit être décontaminé par application de Bétadine® aqueuse. Les prélèvements cellulaires ou tissulaires sont conditionnés pour le transport dans des emballages primaires (directement en contact avec les produits d'origine humaine) et secondaires. Les prélèvements de tissus sont systématiquement accompagnés de prélèvements sanguins qui permettront la réalisation de sérologies nécessaires à la qualification du donneur.

### Réception

Lors de la réception à la banque, les tissus et les donneurs sont anonymisés. Les codes d'anonymat permettront la traçabilité des produits pendant tout le procédé sans que le nom du donneur et du receveur puissent figurer sur le même document.

### Transformation

La transformation concerne toutes les étapes effectuées sur les produits cellulaires ou tissulaires pour assurer la validation du tissu. Si ces étapes nécessitent d'ouvrir l'emballage initial du tissu, elles doivent être effectuées dans une zone de classe D, les produits humains étant manipulés sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), enceinte à flux laminaire (au minimum classe 100) avec du matériel à usage unique.

Différents contrôles sont effectués lors de cette étape afin de vérifier la stérilité et les qualités techniques du produit. Les contrôles de qualité diffèrent en fonction des produits. Ainsi, la validation d'une cornée impliquera la mesure de la densité des cellules endothéliales, alors que la validation d'un prélèvement de CSH impose la numération du nombre de cellules CD34 positives.

### Stockage

Chaque produit est conservé dans des conditions de température qui lui sont propres (tableau 30.1). Ce stockage

**TABLEAU 30-1**

**Tableau récapitulatif faisant la liste des principaux tissus utilisés actuellement, en précisant l'origine des donneurs, les conditions de stockage, les durées de conservation et les prélèvements effectués pour les contrôles microbiologiques.**

| *Produits humains* | *Conditions du prélèvement* | *Tissus stériles au moment du prélèvement* | *Conditions habituelles de conservation* | *Durée minimale des phases de quarantaine* | *Durée des phases de stockage* | *Échantillon pour le contrôle microbiologique* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cornées | Donneurs cadavériques ou en état de mort encéphalique | Non | 31 °C ± 2 °C en milieu de culture (la conservation à 4 °C n'est pas autorisée en France) | 10 jours | 30–35 jours | 5–10 ml de milieu de transport, de conservation et de déturgescence Collerette cornéenne postgreffe |
| Membranes amniotiques | Placenta prélevé lors d'une césarienne | Oui | –80 °C en RPMI –50 % glycérol | 4 mois | 2 ans | Milieu de lavages Biopsie d'amnios |
| Têtes fémorales | Résidus opératoires de donneur vivant | Oui | –80 °C, à sec dans un cryokit azote liquide | 4 mois | 5 ans | Prélèvement osseux sur la section au-delà 2 $cm^3$ |
| Os massif ou segment | Donneurs en état de mort encéphalique (ou cadavériques) | Oui | –80 °C dans des poches de congélation azote liquide | 4 mois | 5 ans | Biopsie osseuse au cœur de l'os de 1–2 $cm^3$ |
| Ligaments, tendons, cartilages, fascia lata | Donneurs en état de mort encéphalique | Oui | –80 °C, à sec dans un cryokit | 4 mois | 5 ans | Biopsie de 1 $cm^3$ sur la partie terminale du prélèvement |
| Volet crânien | Donneur autologue | Oui | –80 °C, à sec dans un cryokit | 0 jour | 5 ans | Biopsie de 1 $cm^3$ sur la partie terminale du prélèvement |
| Veines | Résidus opératoires de donneur vivant | Oui | –80 °C ou azote liquide, en présence d'un cryoconservateur | 4 mois | 5 ans | Biopsie de 1 cm de long sur une extrémité du prélèvement Liquides de prélèvement et de lavage |
| Artères | Donneurs en état de mort encéphalique | Oui | Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur | 4 mois | 5 ans | Biopsie de 1 cm de long sur une extrémité du prélèvement Liquide de lavage |

| *Produits humains* | *Conditions du prélèvement* | *Tissus stériles au moment du prélèvement* | *Conditions habituelles de conservation* | *Durée minimale des phases de quarantaine* | *Durée des phases de stockage* | *Échantillon pour le contrôle microbiologique* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Valves cardiaques | Donneurs en état de mort encéphalique ou cœur d'un receveur de greffe de cœur | Oui | Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur | 4 mois | 5 ans | Biopsie cardiaque adjacente au prélèvement<br>Liquide de prélèvement et de lavage |
| Peau | Donneurs en état de mort encéphalique (ou cadavérique) | Non | Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur | 10 jours | 5 ans | Biopsie de peau de 1 à 2 $cm^2$<br>Liquide de prélèvement et de lavage |
| Parathyroïdes | Donneur autologue | Oui | Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur | 0 jour | 1 an | Liquide de prélèvement et de lavage |
| Cellules souches périphériques | Donneur autologue ou allogénique | Oui | Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur | 10 jours | 10 ans | 1–2 ml prélevés sur la poche<br>Liquide de congélation et de lavage lors de la décongélation |
| Sang de cordon | Donneur allogénique | Oui | Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur | 10 jours | 10 ans | 1–2 ml prélevés sur la poche<br>Liquide de congélation et de lavage lors de la décongélation |

peut être effectué en étuve à 31 °C, au congélateur à –80 °C ou en azote liquide. Le stockage doit être compartimenté en deux zones bien différenciées :

- la zone de quarantaine, qui permet la conservation des produits humains de la réception jusqu'à la validation de leur sécurité microbiologique et technique ;
- la zone de stockage de leur validation à la distribution.

### Distribution

La distribution est effectuée sur présentation d'une ordonnance médicale. Dans tous les cas, après greffe du tissu, le greffeur devra remplir un certificat d'implantation et le retourner à l'unité de conservation de tissus ou cellules.

### Transport

Les étapes de transport après prélèvement ou avant implantation doivent être sécurisées et répondre à des critères d'emballage et d'étiquetage très stricts. Ce transport est confié à des transporteurs agréés.

## Contrôles microbiologiques

Ces contrôles s'imposent pour assurer la sécurité du receveur. Un contrôle microbiologique est effectué à chaque étape du procédé (tableau 30.1).

Le premier contrôle est réalisé au moment de la réception dans la structure de conservation. Ce contrôle peut être réalisé sur une biopsie pratiquée au moment du prélèvement : biopsie osseuse de 1 à 2 $cm^3$, biopsie de peau, de vaisseau. Cette biopsie est recueillie à sec dans un flacon stérile et transportée à la banque dans les mêmes conditions que le tissu. Ces biopsies ne peuvent être réalisées que si elles n'affectent pas l'intégrité et les propriétés thérapeutiques du tissu. Ce type de contrôle ne peut donc pas être pratiqué sur une cornée. Pour les tissus conditionnés en milieu liquide au moment du prélèvement, le contrôle microbiologique est réalisé par ensemencement du milieu de transport (par exemple cornée, membrane amniotique). Pour les prélèvements de CSH, le contrôle est effectué en prélevant 1 à 2 ml de la suspension cellulaire sur la poche de prélèvement.

Un deuxième contrôle devra être effectué à chaque manipulation du produit humain. Un contrôle est réalisé sur le liquide de lavage utilisé pour la décongélation du produit (par exemple décongélation des vaisseaux, des CSH). La conservation des cornées impose un changement de milieu de conservation dans les 24 à 72 heures après leur réception à la banque de tissus, puis 48 à 72 heures avant la greffe. À chaque changement, 5 à 10 ml du milieu de conservation sont prélevés pour la réalisation du contrôle microbiologique.

Un ultime contrôle peut être réalisé au moment de l'utilisation thérapeutique du produit, par ensemencement du milieu de transport (cornée) ou des résidus du tissu (collerette cornéenne, peau, amnios, os), ou sur la poche de CSH.

Toutes les manipulations doivent être effectuées sous un poste de sécurité microbiologique type II.

### Mise en culture

La mise en culture pour les contrôles est réalisée soit directement au niveau des banques de tissus et des centres de thérapie cellulaire, soit au laboratoire de bactériologie qui prend en charge les différents contrôles selon le tableau 30.2. Dans les deux cas, l'ensemencement est effectué par du personnel habilité par le responsa-

**TABLEAU 30-2**

**Milieux à ensemencer suivant les prélèvements.**

| *Prélèvements reçus déjà ensemencés* | | *Prélèvements reçus à ensemencer au laboratoire* | | |
|---|---|---|---|---|
| Contrôle produits sanguins médecine nucléaire | – Cell Saver®<br>– Cornées<br>– CSP | – Liquides de conservation<br>– Liquides de rinçage<br>– Liquides de lavage<br>– Cornées souillées | – Os ou écouvillon os*<br>– Synoviales*<br>– Vaisseaux* | – Amnios** |
| Sur flacon aérobie (SA) | Sur flacons aérobie et anaérobie | – 1 flacon aérobie<br>– 1 flacon anaérobie | – 1 flacon aérobie<br>– 1 flacon anaérobie<br>– 1 gélose CLED<br>– 1 Polyvitex®<br>– 1 gélose au sang<br>– 1 gélose au sang anaérobie | – 1 flacon aérobie**<br>– 1 flacon anaérobie**<br>– 1 Schaedler** |

* – Pour les synoviales et vaisseaux : les couper en petits morceaux avec un scalpel. Ensemencer les boîtes avec un morceau. Mettre 10 ml d'eau distillée dans un pot, vortexer et ensemencer les flacons.
* – Pour les os : broyer un morceau d'os et/ou de tissu mou à l'aide d'un broyeur conique verre/téflon dont le calibre dépendra de la taille du fragment à broyer. Ajouter 10 ml d'eau stérile au broyat. Ensemencer les boîtes, puis les 2 flacons. Au bout de 10 jours, repiquer les flacons sur 2 nouveaux flacons d'hémoculture pour 10 jours supplémentaires.
– Pour les écouvillons d'os, ensemencer uniquement les boîtes à l'aide des écouvillons.
Les flacons sont incubés dans l'automate à hémocultures (35 °C sous agitation) pour une durée de 10 jours. Les autres milieux sont aussi conservés 10 jours.
** Flacon aérobie et 1 flacon anaérobie pour ensemencer le liquide d'amnios. Dans le Schaedler, mettre l'amnios lui-même.

ble du laboratoire de bactériologie et les manipulations effectuées sous un PSM. Pour toute biopsie, des milieux solides et liquides sont ensemencés tandis que, pour les milieux de transport, de conservation ou de lavage, ainsi que pour les suspensions cellulaires, seuls des milieux liquides sont ensemencés.

### *Milieux solides*

Les milieux solides sont ensemencés uniquement à partir des biopsies, deux géloses au sang de cheval ou de mouton, une gélose CLED et une gélose « chocolat » Polyvitex®. La première gélose au sang est incubée avec la gélose « chocolat » Polyvitex® à 37 °C sous $CO_2$ pendant 48 heures ; la gélose CLED est incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures, tandis que la deuxième gélose au sang est placée à 37 °C en anaérobiose pendant 5 jours.

### *Milieux liquides*

Quel que soit le prélèvement, solide ou liquide, deux flacons pour hémoculture, référencés et enregistrés à l'Afssaps, l'un pour l'aérobiose et l'autre pour l'anaérobiose, sont ensemencés. Ces milieux seront incubés à 37 °C pendant 10 jours, que la lecture soit faite à l'œil ou à l'aide d'un automate. En ce qui concerne les os, un repiquage systématique des flacons doit être réalisé quel que soit leur aspect en fin d'incubation.

## Résultats

Lorsque les milieux solides sont positifs, une identification et un antibiogramme des bactéries sont réalisés selon les procédures du laboratoire.

Lorsque les milieux liquides sont positifs, il convient de pratiquer :

- un examen direct après coloration de Gram ;
- un repiquage systématique des flacons sur :
  - une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures pour le flacon aérobie ;
  - une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures et une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en anaérobiose pendant 5 jours pour le flacon anaérobie.

En fonction de l'examen microscopique, le repiquage pourra être effectué sur tout autre milieu adapté.

Tout résultat positif est rapidement communiqué au service clinique concerné et à l'organisme chargé de la conservation.

À partir des repiquages, une identification et un antibiogramme seront réalisés selon les procédures du laboratoire et toutes les souches isolées seront conservées à –80 °C.

Quel que soit le résultat de la culture, négatif ou positif, un résu ltat définitif est transmis au service clinique concerné et à l'organisme chargé de la conservation.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Arrêté du 1er avril 1997 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques. Journal Officiel 6 avril 1997 ; 5275–80.

Arrêté du 16 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement, au transport, à la transformation, y compris la conservation, des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain et des cellules mononucléées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques. Journal Officiel 30 décembre 1998 ; 19824–43.

Arrêté du 29 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques. Journal Officiel 8 janvier 1999 ; 389–99.

Gain P, Thuret G, Chiquet C, et al. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. Br J Ophtalmol 2001 ; 85 : 1158–62.

CHAPITRE

# 31 Orientation générale

M.-C. Ploy, F. Denis

Il serait présomptueux de proposer un schéma simple, unique, dichotomique permettant, à partir de paramètres de base, de parvenir au diagnostic de famille, voire de genre et pourquoi pas d'espèce. En fait, une telle approche diagnostique est du domaine du rêve.

En attendant une approche diagnostique unique identifiant tous les germes et leur sensibilité aux antibiotiques, sans culture, directement sur produits pathologiques à l'aide de puces, le recours à différents paramètres même simples essentiels pour l'orientation est faillible du fait des microbiologistes et des bactéries.

Selon le produit pathologique traité, les milieux de culture utilisés (simples, riches, enrichis en facteurs de croissance, sélectifs), l'atmosphère et la température de culture, certains germes ou espèces seront favorisés ou handicapés.

La morphologie bactérienne constitue toujours une étape essentielle (fig. 31.1), qu'elle soit recherchée directement sur produit pathologique ou sur culture. L'aspect en cocci, bacilles droits ou spiralés, les groupements ou les caractères tinctoriaux peuvent varier ; ainsi, l'aspect n'est pas toujours tranché entre un cocci et un coccobacille. À partir du caractère tinctorial Gram, lui-même, il n'est pas toujours facile de classer les germes en positif ou négatif. Chacun se souvient de corynébactéries vite décolorées, de *Gardnerella* ou de *Bacillus* au Gram douteux.

Les traités classiques d'identification – *Bergey's Manual*, ouvrage de Cowan et Steel, ou de l'American Society for Microbiology – se gardent de proposer une approche simplifiée, abordant séparément, sur la base de la morphologie, les cocci, les bacilles selon leur caractère Gram positif ou négatif, le métabolisme respiratoire (oxydase, catalase) (fig. 31.2 et fig. 31.3), les caractères aérobies, anaérobies, aéro-anaérobies, les métabolismes des sucres oxydatifs, fermentatifs, oxydo-fermentatifs, etc., laissant à part les bactéries anaérobies strictes, les mycobactéries, les germes de culture difficile, exigeants, voire « fastidieux » – sacrifiant à un anglicisme, même si ces « fastidieux » sont souvenJt les plus intéressants.

Pour tenter d'aider les microbiologistes débutants, en ayant conscience des limites de cette approche, nous proposerons une approche dichotomique (peu scientifique, mais utile) concernant les cocci et les bacilles à Gram positif et à Gram négatif, permettant une orientation (bacilles à Gram négatif [fig. 31.4], bactéries à Gram positif [fig. 31.5], cocci à Gram négatif [fig. 31.6]), à l'exclusion des anaérobies stricts et des bacilles acido-alcoolo-résistants.

Ces tableaux ne sont pas exhaustifs et doivent se référer à chaque chapitre, traitant de la famille, du genre voire de l'espèce suspectée, ainsi que des sérotypes, des biotypes voire de l'approche diagnostique par d'autres voies génomiques, voire sérologiques.

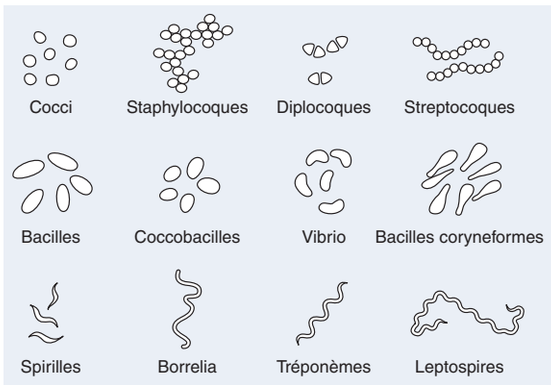



**Fig. 31.1.** – *Différents aspects de la morphologie bactérienne.*

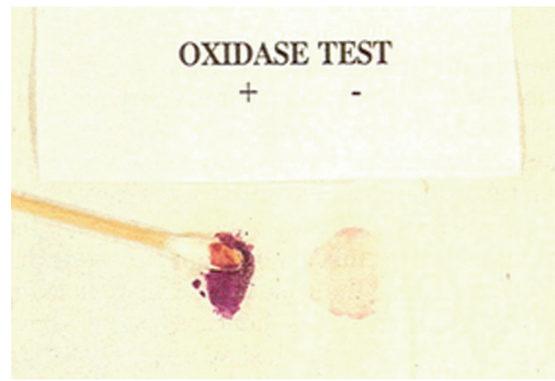



**Fig. 31.2.** – *Test de l'oxydase.*

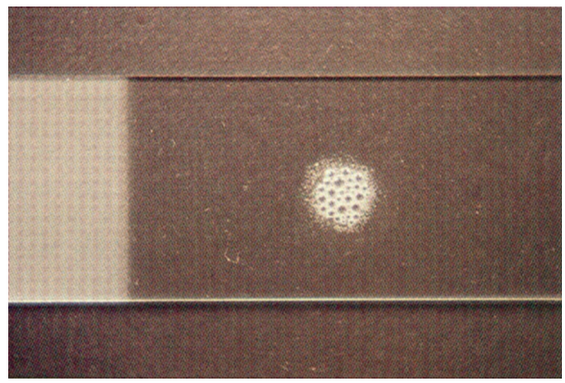


Fig. 31.3. – *Test de la catalase.*

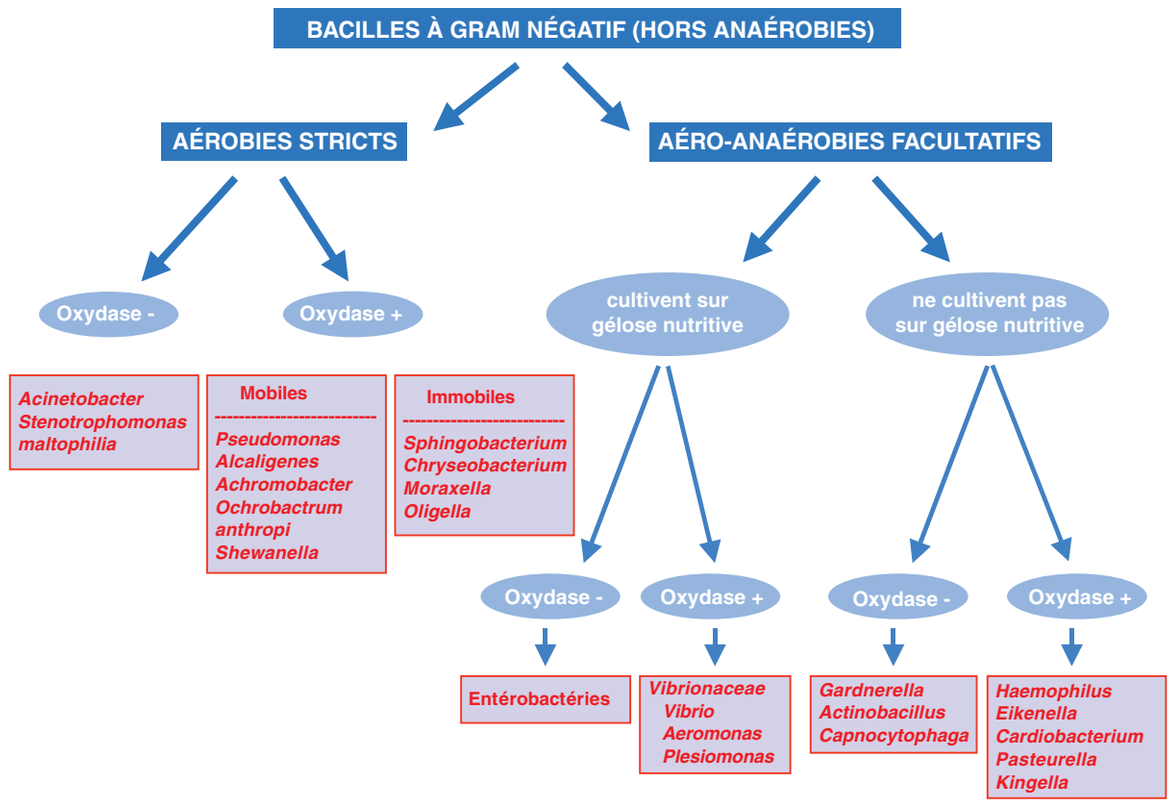



Fig. 31.4. – *Bacilles à Gram négatif.*

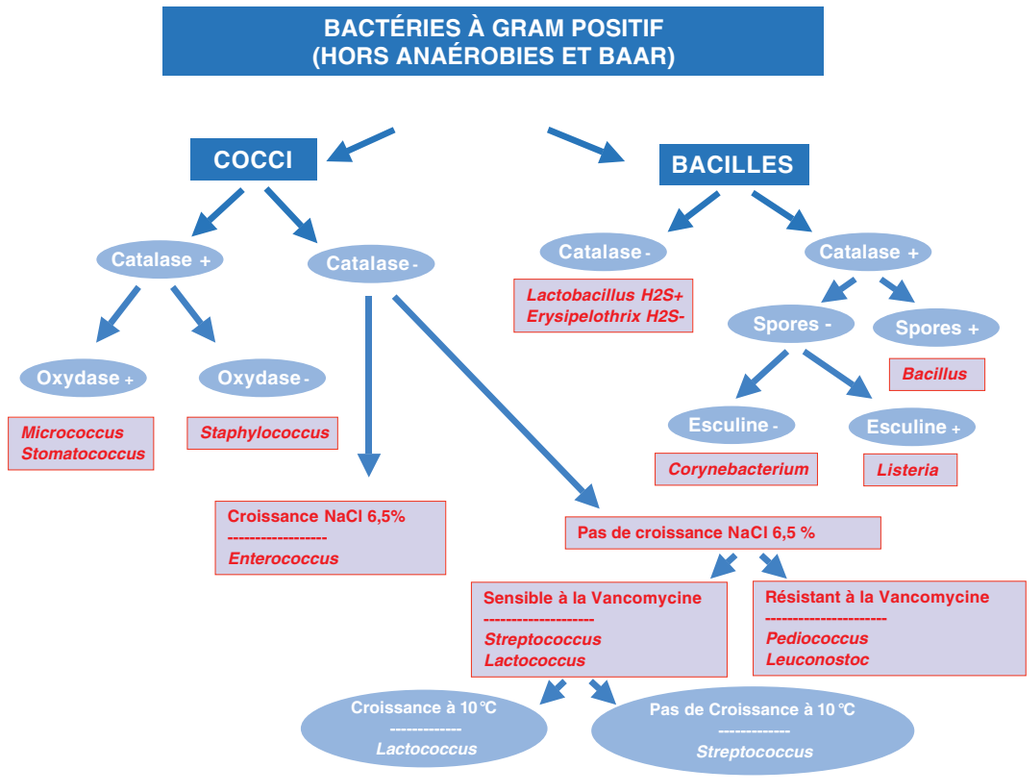



**Fig. 31.5.** – *Bactéries à Gram positif.*

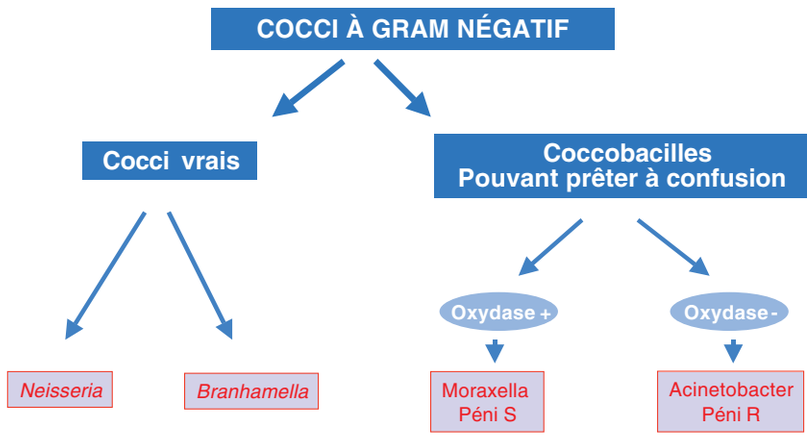



**Fig. 31.6.** – *Cocci à Gram négatif.*

CHAPITRE

32

# Cocci à Gram positif

F. Garnier, F. Denis

Les cocci à Gram positif font partie des flores commensales de la peau et des muqueuses chez l'homme. De ce fait, ils sont fréquemment isolés en bactériologie médicale, le problème étant de faire la part, lorsqu'une culture est positive, entre une situation pathogène et une contamination de l'échantillon par une bactérie commensale.

De nombreuses espèces sont maintenant bien définies ; elles peuvent être aérobies, anaérobies strictes, anaérobies-aérotolérantes ou bien aérobies-anaérobies facultatives.

Deux familles jouent un rôle majeur en pathologie ; ce sont les *Micrococcaceae* et les *Streptococcaceae*, qui peuvent être cultivées en atmosphère aérobie et différenciées notamment par deux caractères morphologique et enzymatique, la catalase (voir « Démarche de l'examen bactériologique ») (tableau 32.1). Il est à noter que les érythrocytes des géloses au sang possèdent une activité catalasique qui risque de donner une réaction faussement positive lorsque les colonies sont prélevées sur ce genre de milieu.

## Famille des *Micrococcaceae*

Bien que cette famille soit en pleine restructuration actuellement, nous garderons, pour plus de facilité, la classification retenue dans l'édition du *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* (1986). La famille des *Micrococcaceae* était alors composée de quatre genres : *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* et *Staphylococcus*. Les espèces retrouvées en pathologie humaine appartiennent presque exclusivement aux genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*.

### Différenciation des genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*

Il s'agit de cocci réguliers à Gram positif, le plus souvent disposés en amas. Ces germes cultivent très bien sur milieux ordinaires à 37 °C ; en 24 heures, les colonies de 1 à 2 mm de diamètre sont lisses, rondes, opaques et bombées. Les colonies peuvent être pigmentées en jaune doré ou jaune citrin et, sur gélose au sang, certaines souches sont hémolytiques. Les caractères présentés dans le tableau 32.2 permettent de différencier les deux genres.

### *Genre Micrococcus*

Les germes du genre *Micrococcus* sont retrouvés dans l'environnement. Leur pouvoir pathogène est extrêmement faible, mais des souches, considérées comme contaminantes, sont fréquemment isolées en bactériologie médicale. De rares cas d'infections à microcoques ont toutefois été décrits, notamment des endocardites ou des septicémies.

### Genre *Staphylococcus*

#### *Pouvoir pathogène et habitat*

Les germes appartenant au genre *Staphylococcus* sont des commensaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux.

*Staphylococcus aureus*, comme toute bactérie pyogène, est à l'origine d'infections suppuratives. Il s'agit le plus souvent d'auto-infections à partir de la flore endogène, mais l'origine peut aussi être exogène ; c'est le cas des toxi-infections. Les infections suppuratives impliquent une prolifération bactérienne, une invasion, une destruction des tissus de l'hôte et une réponse inflammatoire locale et systémique. Elles sont à l'origine :

- de staphylococcies cutanées, sous-cutanées et muqueuses qui peuvent être superficielles (impétigo, onyxis et folliculites) ou profondes (furoncles, abcès, hidrosadénites et anthrax) ;
- de septicémies ;
- de staphylococcies viscérales à partir de bactériémies, avec des localisations osseuses (ostéomyélites), pleuropulmonaires, urogénitales, neuroméningées ou cardiaques (endocardites).

Les infections nosocomiales à *S. aureus* ne sont pas exceptionnelles : infections du site opératoire, ostéoarticulaires, neurochirurgicales ou endophtalmiques. Les toxémies staphylococciques sont associées à la production de toxines :

- la leucocidine de Panton et Valentine au cours des pneumonies nécrosantes ;
- les exfoliatines A et B lors du syndrome d'exfoliation généralisée ;
- la toxine du choc staphylococcique lors du syndrome de choc toxique ou de tableaux scarlatiniformes ;
- les entérotoxines responsables de toxi-infections alimentaires.

Ces différentes toxines sont recherchées par le Centre national de référence (CNR) des Staphylocoques par une PCR multiplex (Jarraud *et al.,* 2002). Lorsqu'une souche isolée chez un patient présentant des manifestations toxiniques ne possède aucun des gènes d'entérotoxines connues, la recherche de superantigène dans le surnageant de la culture par activation lymphocytaire T peut aussi être

**TABLEAU 32-1**

**Caractères distinctifs entre les représentants des deux familles : *Micrococcaceae* et *Streptococcaceae*.**

| | *Morphologie* | *Catalase* |
|---|---|---|
| *Micrococcaceae* | Cocci groupés en amas ou en courtes chaînettes | Positive |
| *Streptococcaceae* | Cocci en diplocoques ou en longues chaînettes | Négative |

effectuée par le CNR des Staphylocoques afin de mettre en évidence une éventuelle nouvelle entérotoxine.

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN), longtemps considérés comme peu ou pas pathogènes, sont maintenant reconnus comme des bactéries pathogènes opportunistes, notamment les espèces *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. saprophyticus*. Les SCN peuvent être responsables de conjonctivites, d'endophtalmies, d'infections cutanées, d'infections urinaires (essentiellement *S. saprophyticus*), d'endocardites, de péritonites, d'infections osseuses et articulaires, de méningites postneurochirurgicales, d'infections sur matériel ou sur valves (endocardites et méningites), ainsi que de septicémies dont le point de départ peut être un cathéter.

## *Diagnostic direct en routine*

### Prélèvements et transport

Les staphylocoques sont suffisamment résistants à la dessiccation et au refroidissement pour qu'il n'y ait pas de conditions particulières de prélèvement et de transport. Les staphylocoques et notamment *S. aureus* peuvent se retrouver à partir de n'importe quel prélèvement. Mais les bonnes procédures de prélèvements doivent être strictement appliquées, notamment en ce qui concerne l'asepsie. En effet, il ne faut pas oublier les risques de contamination des échantillons du fait de la présence, au niveau de la peau et des muqueuses, de flores hébergeant de nombreux staphylocoques.

### Examen direct

Les staphylocoques sont des germes pyogènes et, dans les pus, on retrouve de nombreux polynucléaires plus ou moins altérés ainsi que des staphylocoques qui apparaissent comme des cocci à Gram positif de 0,8 à 1 µm de diamètre, isolés, ou en diplocoques, en courtes chaînettes voire classiquement en amas, l'aspect en grappe étant alors le plus caractéristique (fig. 32.1).

### Culture

Les staphylocoques sont des germes peu exigeants et peuvent être isolés en bouillon ou sur milieux solides simples tels que géloses ordinaires ou géloses au sang (annexe 32.1). Sur les milieux usuels, les colonies de staphylocoques, de taille variable (1 à 3 mm) sont circulaires, opaques, légèrement bombées ou aplaties (fig. 32.2). La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune ou au jaune orangé. À noter que *S. saprophyticus* produit à l'isolement primaire des colonies plus grandes (5 à 8 mm), pigmentées en jaune et légèrement plus bombées. Sur gélose au sang, les souches « typiques » de *S. aureus* peuvent produire des colonies de couleur jaune doré, entourées d'une hémolyse β (fig. 32.2). La plupart des espèces de SCN ne peuvent être différenciées entre elles après une culture de 24 heures ; aussi est-il recommandé d'attendre une incubation de 2 à

**TABLEAU 32-2**

**Caractères permettant de différencier les bactéries appartenants aux genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*.**

| | *Micrococcus* | *Staphylococcus* |
|---|---|---|
| Type respiratoire | Aérobie | Aéro-anaérobie |
| Culture à 45 °C | Négative | Positive |
| Fermentation du glucose[1] | Négative | Positive |
| Fermentation du glycérol[1] | Négative | Positive |
| Nitrofurantoïne (disque à 300 µg)[2] | Résistant (D ≤ 15 mm) | Sensible (D > 15 mm) |
| Composé O/129 (disque à 0,5 mg)[2] | Sensible (D ≥ 15 mm) | Résistant (D < 15 mm) |
| Bacitracine (disque à 0,002 U)[2] | Sensible (D = 10–25 mm) | Résistant |
| Lysozyme (disque à 50 µg)[2] | Sensible | Résistant |
| Lysostaphine (disque à 100 µg)[2] | Résistant | Sensible |

[1] La recherche de la fermentation du glucose et du glycérol s'effectue sur un milieu Hugh et Leifson.
[2] Chaque disque est déposé sur un milieu Mueller-Hinton ensemencé comme un antibiogramme.

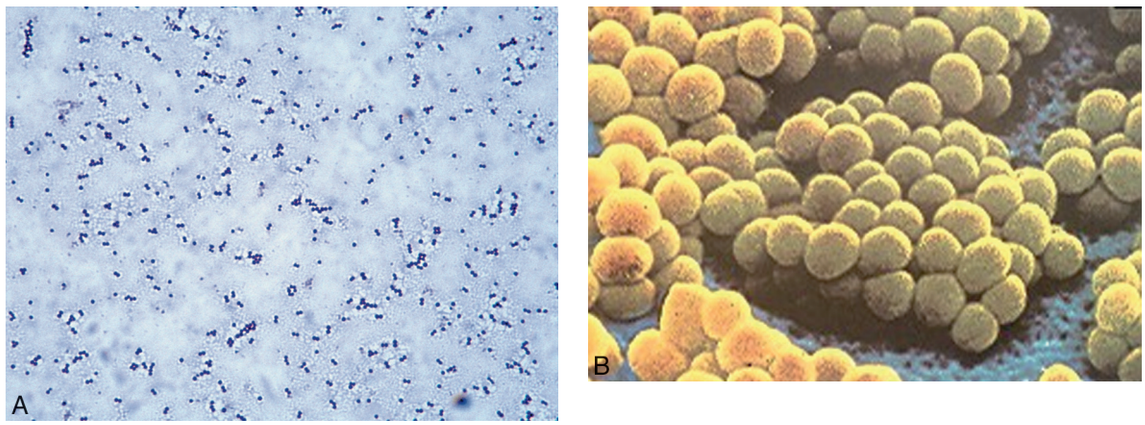



**Fig. 32.1.** – *A) Gram de* S. aureus*; B) Staphylocoques en microscopie à balayage.*

**Fig. 32.2.** – *Isolement sur gélose Columbia à 5 % de sang de mouton. A)* Micrococcus luteus*; B)* Staphylococcus aureus*; C)* Staphylococcus epidermidis*.*

3 jours pour distinguer les différentes colonies sur milieu gélosé.

Pour les produits pathologiques polymicrobiens, on a recours à des milieux sélectifs tels que :

- le **milieu de Chapman** qui est un milieu gélosé hypersalé (7,5 % de NaCl) contenant du mannitol ; il permet une culture abondante de *S. aureus* après une incubation de 24 à 48 heures. Ce milieu historique a un intérêt limité par manque de spécificité et un retard de croissance. Les colonies sont alors entourées d'un halo jaune puisqu'elles fermentent le mannitol, tout comme parfois *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* et *S. cohnii*. Les SCN donnent des colonies de plus petites tailles sans fermenter le mannitol (fig. 32.3). Toutefois, la pousse sur ce milieu ne constitue qu'une indication puisque d'autres germes tels que les entérocoques ou les *Proteus* peuvent cultiver dessus ;
- le **milieu de Baird-Parker** qui est à base de tellurite de potassium et de jaune d'œuf. Sur ce milieu, *S. aureus* se présente sous forme de colonies noires (réduction du tellurite) avec un halo clair autour (protéolyse) suivi d'une opacification tardive du halo (lipase). Ce milieu est surtout utilisé en bactériologie alimentaire ;
- les **milieux gélosés Columbia, CNA** (colistine et acide nalidixique) ou **CAP** (colistine et aztréonam) qui inhibent les bactéries à Gram négatif et permettent la culture des bactéries à Gram positif, cocci ou bacilles ;
- les milieux à **substrats chromogènes** : différents fabricants proposent des systèmes permettant l'identification directe des *S. aureus* en fonction de la positivité de la culture et de la couleur des colonies obtenues sur des milieux spécifiques (voir « Milieux chromogènes »).

**Fig. 32.3.** – *Culture sur milieu de Chapman.* S. aureus *(à gauche) et SCN (à droite).*

**TABLEAU 32-3**

**Caractères biochimiques distinctifs des principales espèces de *Staphylococcus* isolées chez l'homme.**

| | *S. aureus* | *S. epidermidis* | *S. haemolyticus* | *S. saprophyticus* | *Autres staphylocoques* |
|---|---|---|---|---|---|
| Coagulase | + | – | – | – | – |
| *Clumping factor* | + | – | – | – | – |
| Fermentation : | | | | | |
| Glucose | + | + | + | + | + |
| Mannitol | + | – | V | + | V |
| Xylitol | – | – | – | + | – |
| Phosphatase | + | + | – | – | V |
| Dnase | + | – | – | – | V |
| Novobiocine (5µg)* | S | S | S | R | V |

V : variable ; + : 90 % ou plus de souches positives ; – : 90 % ou plus de souches négatives.
* Le disque est déposé sur un milieu Mueller-Hinton ensemencé comme un antibiogramme, S pour sensible si le diamètre ≥ 16 mm et R pour résistant si le diamètre < 16 mm.

## Identification de l'espèce

L'espèce *S. aureus*, considérée le plus fréquemment comme pathogène pour l'homme, doit être identifiée et différenciée des SCN et tout particulièrement des espèces les plus impliquées en pathologie humaine, à savoir *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. saprophyticus* (tableau 32.3). En pratique, différents tests peuvent être utilisés pour le diagnostic différentiel entre *S. aureus* et les autres espèces.

Les **tests rapides d'orientation** sont les suivants.

- Recherche de la **coagulase libre :** la coagulase libre est présente chez *S. aureus*, mais peut aussi être produite par *S. intermedius* ou *S. hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur. Dans un tube à hémolyse, on mélange :
  - 0,5 ml de plasma de lapin reconstitué à partir d'un lyophilisat commercialisé par différents laboratoires ;
  - 0,5 ml d'une culture de 18 heures en bouillon pour staphylocoagulase (laboratoire BioRad) ou 0,5 ml d'une suspension dense du germe à étudier.

  Le mélange est placé à l'étuve à 37 °C et est incubé pendant 24 heures. Les souches de *S. aureus* provoquent la coagulation du plasma, le plus souvent lors des trois premières heures (> 1/2 h < 24 h). La prise en masse est généralement totale (fig. 32.4) mais parfois légère et plus tardive, et la réaction doit être considérée comme positive si le phénomène intervient avant la 24e heure. Le mélange est observé d'heure en heure car le coagulum peut être suivi d'une redissolution du caillot provoquée par la fibrinolysine.
- Recherche du **facteur d'affinité pour le fibrinogène** (coagulase liée ou *Clumping factor*) : il est présent chez *S. aureus,* mais peut aussi être retrouvé chez *S. lugdunensis* et *S. schleiferi*. Ce test consiste en la mise en évidence du facteur d'affinité pour le fibrinogène présent à la surface de *S. aureus*. Pour cette recherche, il faut éviter de prélever des colonies sur milieu de Chapman ; on conseille de partir plutôt de géloses au sang. Les suspensions de *S. aureus* réagissent avec des constituants du plasma humain dilué au 1/5e en entraînant une agglutination rapide. Aujourd'hui, il serait préférable de parler de facteurs agglutinants puisque des travaux récents ont montré que plusieurs protéines de surface ou retrouvées dans le surnageant de cultures de *S. aureus* interviendraient dans la fixation de la bactérie au fibrinogène.
- Recherche de la **protéine A :** cette protéine A peut être retrouvée chez *S. aureus*, mais aussi chez les souches de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, la plupart des souches de *S. hyicus* et de rares souches de *S. intermedius*. La protéine A est associée au peptidoglycane de 90 % des souches de *S. aureus* et a la propriété de fixer le fragment Fc des immunoglobulines (Ig) (fig. 32.5) de l'homme et du lapin. Ce test consiste à rechercher l'agglutination sur lame des staphylocoques mis en présence d'hématies de mouton sensibilisées par du sérum de lapin antihématies de

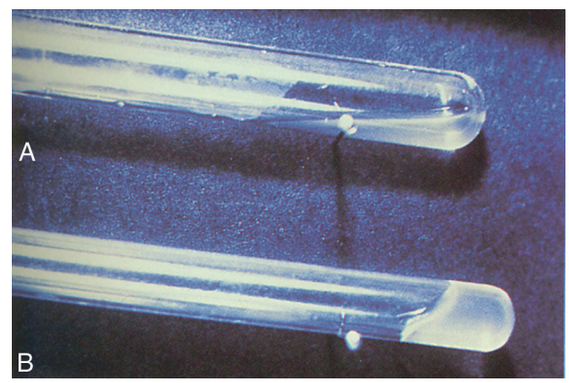



Fig. 32.4. – *Recherche de coagulase libre : A) négative ; B) positive.*

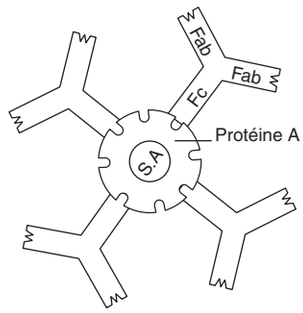



**Fig. 32.5.** – *Représentation schématique de la fixation de la protéine A à la fraction Fc des immunoglobulines.* S.A : *Staphylococcus aureus;* Fc : fraction Fc des immunoglobulines; A : protéine A, constitutive de la paroi de *S. aureus*.

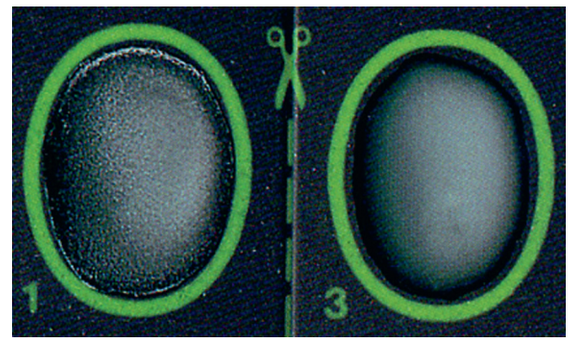



**Fig. 32.6.** – *Test rapide d'agglutination pour la caractérisation de* S. aureus : *1. test positif, 3. test négatif.*

mouton ou de particules de latex recouvertes d'IgG. Malheureusement, cette recherche peut rester négative, car la synthèse peut être inhibée par le milieu de culture et certaines souches ne sont pas productrices de protéine A, ce qui est le cas de certains sérotypes de *S. aureus* métiR, notamment 5 et 8.

Cependant, devant la sensibilité limitée de chacun de ces tests d'orientation et afin d'améliorer leur praticabilité, différents fabricants ont mis au point des tests d'agglutination permettant une identification présomptive de *S. aureus* par la recherche simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène, de la protéine A et de polysaccharides capsulaires de *S. aureus* (fig. 32.6) à l'aide d'anticorps dirigés contre les types 5 et 8 généralement. Ces réactifs sont constitués de latex ou d'hématies sensibilisés avec du fibrinogène, des IgG et des anticorps monoclonaux spécifiques de **polysaccharides capsulaires** de *S. aureus* (tableau 32.4). Quelques colonies de staphylocoques (éviter de prélever les colonies sur milieu de Chapman, sur gélose ANC ou sur gélose CAP) sont mises en suspension dans une goutte de latex ou d'hématies sensibilisés. Si une agglutination franche apparaît presque instantanément, la réaction est dite positive. Les performances des trousses permettant cette triple réaction ont été évaluées dans le diagnostic de l'espèce *S. aureus* et ont montré des valeurs allant de 88,9 à 100 % pour la sensibilité et de 91 à 99 % pour la spécificité.

- Recherche de la **nucléase thermostable :** cette thermonucléase est retrouvée chez *S. aureus*, mais aussi chez *S. intermedius, S. lugdunensis*, *S. hyicus* et parfois faiblement chez *S. epidermidis*. Le test consiste à

**TABLEAU 32-4**

**Tests d'agglutinations commercialisés permettant l'identification de *Staphylococcus aureus*.**

| | *Fabricant* | *Support* | *Recherche* |
|---|---|---|---|
| Slidex Staph Plus® | bioMérieux | Latex | Fibrinogène<br>Protéine A<br>Polysaccharides capsulaires |
| Pastorex Staph Plus® | Bio-Rad | Latex | Fibrinogène<br>Protéine A<br>Polysaccharides capsulaires |
| Staphytect Plus® | Oxoid | Latex | Fibrinogène<br>Protéine A<br>Polysaccharides capsulaires |
| Staph aureus Fumouze® | Fumouze | Hématies | Fibrinogène<br>Protéine A |
| Prolex® STAPH | i2a | Latex | Fibrinogène<br>Protéine A |
| ELITex Staph® | ELITechGroup | Latex | Fibrinogène<br>Polysaccharides capsulaires |
| Staphaurex® | REMEL | Latex | Fibrinogène<br>Protéine A |

**TABLEAU 32-5**

**Principaux caractères discriminants permettant le diagnostic d'espèce de *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative le plus souvent isolés chez l'homme.**

| | *Pigment* | *Uréase* | *Ornithine décarboxylase* | *Phosphatase alcaline* | *Pyrrolydonyl arylamidase* | *Arginine arylamidase* | *β-glucuronidase* | *β-galactosidase* | *Production d'acétoïne* | *Réduction des nitrates* | *Hydrolyse de l'esculine* | *N-acétylglucosamine* | *L-arabinose* | *D-cellobiose* | *α-lactose* | *Maltose* | *Mannitol* | *D-mannose* | *Raffinose* | *Saccharose* | *D-turanose* | *D-tréalose* | *D-xylose* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *S. aureus* | + | V | – | + | – | – | – | – | + | + | – | + | – | – | + | + | + | + | – | + | + | + | – |
| *S. auricularis* | – | – | – | – | V | + | – | – | V | V | – | – | – | – | – | + | – | – | – | V | V | + | – |
| *S. capitis* | – | – | – | – | – | – | – | – | V | V | – | – | – | – | – | V | + | + | – | + | – | – | – |
| *S. cohnii* | – | – | – | – | – | – | – | – | V | – | – | – | – | – | – | V | V | V | – | – | – | + | – |
| *S. epidermidis* | – | + | V | V | – | – | – | – | + | V | – | – | – | – | V | + | – | + | – | + | V | – | – |
| *S. haemolyticus* | V | – | – | – | + | – | V | – | + | V | – | + | – | – | V | + | V | – | – | + | V | + | – |
| *S. hominis* | V | + | – | – | – | – | – | – | + | + | – | V | – | – | V | + | – | – | – | + | + | V | – |
| *S. lugdunensis* | V | V | + | – | + | – | – | – | + | + | – | V | – | – | + | + | – | + | – | + | V | + | – |
| *S. saprophyticus* | V | – | – | – | V | – | – | + | + | – | – | V | – | – | V | + | V | – | – | + | + | + | – |
| *S. schleiferi* | – | – | – | + | + | – | – | V | + | V | – | V | – | – | – | – | – | + | – | – | – | V | – |
| *S. simulans* | – | + | – | V | + | – | V | + | V | + | – | + | – | – | + | + | + | V | – | + | – | V | – |
| *S. warneri* | V | + | – | – | – | – | V | – | + | V | – | V | – | – | V | + | V | – | – | + | V | + | – |

+ : 90 % ou plus de souches positives ; – : 90 % ou plus de souches négatives ; V (variable) : 11 à 89 % de souches positives.

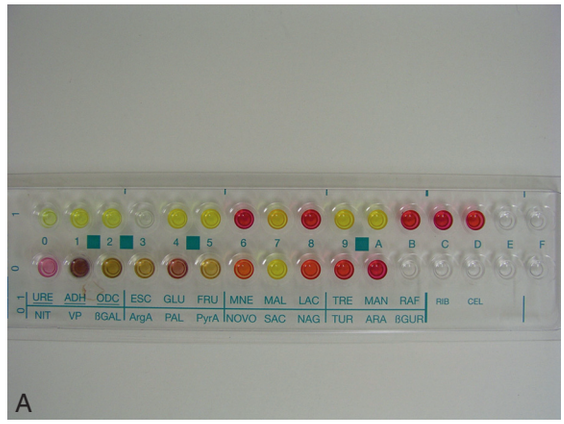
rechercher la présence de la désoxyribonucléase thermostable en partant d'une culture en bouillon cœur-cervelle incubée à l'étuve pendant 18 heures ou au bain-marie agité pendant 3 à 4 heures, et traitée par chauffage à 100 °C pendant 15 minutes. Puis on dépose le surnageant dans un puits creusé dans une gélose contenant de l'ADN et du bleu de toluidine (BioRad). La nucléase est alors détectée par l'apparition d'une zone rose autour du puits. Une simple recherche de la nucléase peut aussi être réalisée sur des géloses ADN commercialisées par différents laboratoires. Pour cela, on ensemence la souche à étudier en strie épaisse sur la gélose ADN en partant d'un bouillon de 24 heures ou d'une colonie isolée ; après 18 heures d'incubation à 37 °C, la gélose est inondée avec une solution d'acide chlorhydrique 1 M. Si un halo clair apparaît autour de la strie au bout de 5 à 10 minutes, la recherche est positive. La réaction peut aussi être inhibée spécifiquement à l'aide d'anticorps antinucléase thermostable.

Parmi ces tests rapides, si deux sont trouvés positifs, on peut considérer que l'identification de *S. aureus* est validée, mais toute discordance entre les deux tests utilisés nécessite une identification biochimique complète.

Pour l'**identification complète**, la **galerie d'identification**, on a recours à des galeries miniaturisées reposant sur des tests enzymatiques (zymogrammes), des tests d'acidification ou d'utilisation des sucres (auxanogrammes) ainsi que des tests de résistance à des substances inhibitrices (tableaux 32.3 et 32.5). Les différents systèmes utilisés en France sont (fig. 32.7) :

- API Staph® ou ID 32 Staph® (A1) et RAPIDEC Staph® (bioMérieux) (A2) ;
- système Vitek 2 avec les cartes Vitek 2 GP® (bioMérieux) (B) ;
- système BD Crystal GP® (Becton Dickinson) (C) ;
- système BD Phoenix avec les galeries PID® et PMIC/ID60® (Becton Dickinson) (D) ;
- système Taxiden® (i2a) avec la galerie STAPH® (E).

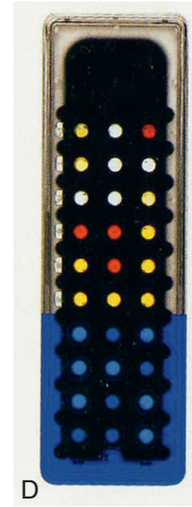
Ces systèmes sont partiellement ou entièrement automatisés et permettent une identification après 24 heures d'incubation. Afin d'obtenir un résultat fiable et reproductible, un respect des protocoles délivrés par les fournisseurs est fortement recommandé, notamment en ce qui concerne les inoculums, les temps et températures d'incubation, ainsi que les temps de réactions lors d'ajout des réactifs de révélation. L'inoculum nécessaire doit être prélevé sur une culture pure à partir de plusieurs colonies pour obtenir un résultat reproductible et éviter de sélectionner une sous-population. Pour une même souche, des modifications de profils pourront être observées suivant le nombre de subcultures et les milieux utilisés pour celles-ci. En effet, des enzymes pourront




ID 32 Staph® (bioMérieux)

RAPIDEC Staph® (bioMérieux)

VITEK 2 GP® (bioMérieux)




BD Crystal GP® (Becton Dickinson)

PID® (Becton Dickinson)

Taxiden® (i2a)

**Fig. 32.7.** – *Galeries d'identification des staphylocoques.*

être induites ou réprimées par certains constituants des différents milieux.

Les SCN ne sont pris en compte et identifiés que lorsque les circonstances de leur isolement indiquent qu'ils sont potentiellement pathogènes : souches identiques isolées simultanément ou à plusieurs jours d'intervalle à partir du même site, de plusieurs sites différents, d'hémocultures ou d'autres liquides biologiques.

## Sensibilités aux antibiotiques

### *Antibiogramme standard*

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques sur milieux gélosés s'effectue selon les recommandations du CA-SFM sur gélose Mueller-Hinton en atmosphère aérobie. À partir d'une culture de 18 à 24 heures sur milieu gélosé approprié, une suspension à 0,5 MacFarland en bouillon

Mueller-Hinton ou en solution saline est préparée. La suspension est diluée au 1/10e avant d'être ensemencée par écouvillonnage ou au 1/100e par inondation en respectant les mesures de sécurité nécessaires. Après séchage à l'étuve, les disques sont déposés sur la gélose. La lecture doit être réalisée en respectant les règles édictées par le Comité de l'antibiogramme.

Mais, pour certains antibiotiques ou familles d'antibiotiques, l'antibiogramme standard n'est pas suffisant et des tests complémentaires doivent être pratiqués avant une interprétation définitive.

### Recherche d'une pénicillinase

Aujourd'hui, près de 90 % des souches de staphylocoques résistent à la pénicilline G par production de pénicillinases extracellulaires, inductibles et codées par des plasmides. Elles inactivent les pénicillines G et V, les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. En revanche, elles ont peu d'affinité pour la méticilline, l'oxacilline, la cloxacilline et toutes les céphalosporines, mais elles sont inhibées par l'acide clavulanique. La production de pénicillinase est détectée sur l'antibiogramme standard en observant le diamètre autour d'un disque de pénicilline G. Toute souche dont le diamètre est strictement inférieur à 29 mm est considérée comme productrice de pénicillinase. Lorsque le diamètre est supérieur ou égal à 29 mm, l'absence de pénicillinase doit être confirmé par un test chromogénique : après avoir prélevé les colonies autour du disque d'oxacilline, de céfoxitine ou de moxalactam, on les dispose sur un disque de Céfinase® préalablement humidifié, et si une coloration brune apparaît dans un délai de 5 minutes, une pénicillinase est bien présente.

### Résistance à la méticilline chez S. aureus

Aujourd'hui, environ 30 % des souches hospitalières de *S. aureus* sont résistantes à la méticilline (SARM). Les SARM hébergent le gène *mecA* qui code pour une PLP2a additionnelle, protéine de liaison à la pénicilline de faible affinité, responsable de la résistance intrinsèque à toutes les β-lactamines, ainsi qu'aux inhibiteurs des β-lactamines. L'expression phénotypique de cette résistance peut être homogène (l'ensemble de la population apparaît résistante) ou hétérogène (une fraction plus ou moins importante de la population apparaît résistante). La recherche de la méticillinorésistance peut s'effectuer de plusieurs manières :

- un disque d'oxacilline à 5 µg placé sur une gélose Mueller-Hinton (MH) ensemencée avec un inoculum à 0,5 MacFarland dilué au 1/10e et incubée à 30 °C pendant 24 à 48 heures ;
- un disque d'oxacilline à 5 µg placé sur une gélose Mueller-Hinton (MH) hypersalée ensemencée avec un inoculum à 0,5 MacFarland dilué au 1/10e et incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Les souches sont considérées comme résistantes si le diamètre d'inhibition autour de l'oxacilline est strictement inférieur à 20 mm et/ou si on observe une croissance

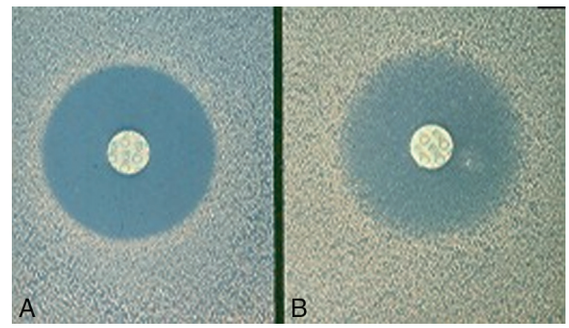



**Fig. 32.8.** – *Recherche de la méticillinorésistance chez* S. aureus.
*A) Souche apparemment sensible après 18 heures d'incubation à 37 °C sur Mueller-Hinton hypersalé. B) Souche résistante, microcolonies dans la zone d'inhibition après 48 heures d'incubation à 37 °C.*

partielle ou la présence de microcolonies dans la zone d'inhibition (fig. 32.8).

Depuis 2005, le CA-SFM préconise l'utilisation d'un disque de céfoxitine (30 µg) ou de moxalactam (30 µg) dans les conditions standard de l'antibiogramme (http://www.sfm.asso.fr). Les souches présentant un diamètre supérieur ou égal à 27 mm (céfoxitine) ou 24 mm (moxalactam) sont sensibles ; celles ayant un diamètre strictement inférieur à 25 mm (céfoxitine) ou 23 mm (moxalactam) sont résistantes. Entre les deux bornes, la présence du gène *mecA* doit être recherchée par PCR.

- **Test d'agglutination rapide pour la détection de la PLP2a :** après extraction des PLP à partir d'une culture de 24 heures sur milieu gélosé, la PLP2a est recherchée sur le surnageant d'extraction par agglutination avec des particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal dirigé contre la PLP2a (PLP2' test® d'Oxoid par exemple).

Un nouveau kit de génophénotypage vient de sortir pour la détection de la PBP2a, Clearview Exact PBP2a® (Inverness Medical Innovations). Il consiste à extraire quelques colonies de staphylocoques dans un tube à hémolyse à l'aide de deux réactifs, et ensuite à déposer une bandelette sur laquelle est placé un anticorps monoclonal anti-PBP2a et un anticorps de contrôle. Après 5 minutes de migration, on obtient le résultat, positif si on observe la présence de la bande spécifique. Les premières études montrent une bonne sensibilité du test.

- **Milieux chromogènes pour le dépistage des SARM :** parallèlement à l'identification directe des *S. aureus* sur milieux chromogènes, différents fabricants proposent des systèmes permettant la détection de la méticillinorésistance en rajoutant un antibiotique sélectionnant les souches résistantes à la méticilline (voir « Milieux chromogènes »).

Il est à noter que les systèmes automatisés peuvent manquer de fiabilité dans la détection d'une résistance hétérogène.

De plus, devant tout SARM sensible à la gentamicine et aux quinolones mais résistant à l'acide fucidique, il est maintenant recommandé de faire une recherche des

exfoliatines A et B, de la toxine du choc toxique staphylococcique (*toxic shock syndrome toxin* [TSST]) ainsi que de la toxine de Panton-Valentine.

### *Sensibilité des staphylocoques aux glycopeptides*

Depuis les années 1980, des souches de staphylocoques à coagulase négative de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont décrites. Au cours des années 1990, ce sont les premières souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée qui sont apparues. Les phénotypes de résistance suivants sont décrits :

- résistance homogène (GISA), pour laquelle les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la vancomycine et de la teicoplanine sont strictement supérieures à 2 mg/l (CA-SFM 2011) ;
- résistance hétérogène (hGISA) pour laquelle les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine sont inférieures ou égales à 2 mg/l alors que les clones hébergent une sous-population capable de croître en présence de vancomycine à des concentrations supérieures à 2 mg/l (CA-SFM 2011).

En routine, une souche de sensibilité diminuée aux glycopeptides est suspectée par la méthode par diffusion en milieu gélosé lorsque :

- le diamètre de la zone d'inhibition est < 17 mm autour du disque de l'un des deux glycopeptides ;
- le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de teicoplanine est inférieur d'au moins 3 mm comparé à celui de la vancomycine ;
- quelques colonies sont présentes dans la zone d'inhibition de l'un des deux glycopeptides.

Une méthode automatisée est aussi utilisée lorsque les souches sont catégorisées I ou R à au moins l'un des glycopeptides.

Il est à noter que la résistance hétérogène est difficile à détecter quelle que soit la méthode utilisée. Dès lors, différentes méthodes de *screening* ont été décrites dans la littérature, et le CA-SFM recommande :

- soit d'ensemencer 10 µl, en spot, d'une suspension à 2 MacFarland sur une gélose MH additionnée de 5 mg/l de teicoplanine et incubée à 35 à 37 °C. Après lecture à 24 à 48 heures, la présence d'au moins quatre colonies par spot fait suspecter une souche de sensibilité diminuée aux glycopeptides ;
- soit d'utiliser la diffusion en gradient (bandelettes) en macrométhode : une gélose cœur-cervelle est ensemencée par écouvillonnage à l'aide d'une suspension à 2 MacFarland et deux bandelettes de vancomycine et de teicoplanine y sont déposées. Après 48 heures d'incubation à 35 à 37 °C, si les CMI à la vancomycine et à la teicoplanine sont supérieures ou égales à 8 mg/l ou la CMI à la teicoplanine seule est supérieure ou égale à 12 mg/l, alors la souche est considérée comme étant de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Certains laboratoires ont développé des géloses contenant de la teicoplanine comme recommandé par le CA-SFM, la gélose GISA® d'AES par exemple.

Différentes études ont montré que seules les analyses de population (fig. 32.9), décrites par Hiramatsu en 1997, étaient fiables, mais malheureusement elles demandent à

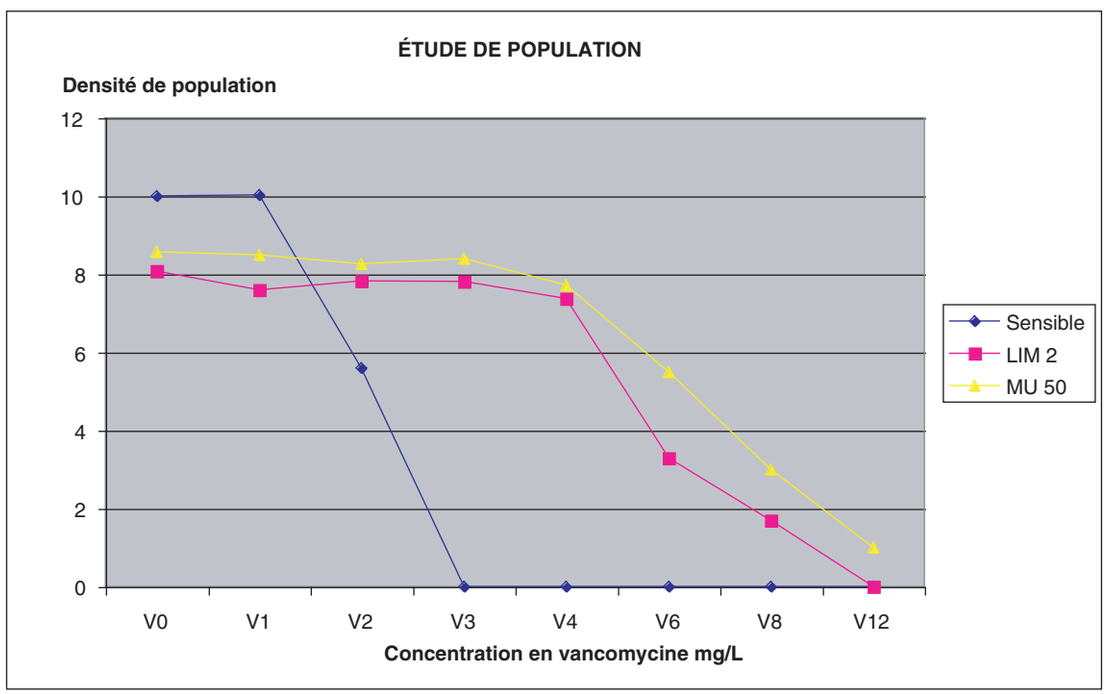



**Fig. 32.9.** – *Représentation graphique de l'étude de population.*
Sensible : souche sensible aux glycopeptides ; LIM 2 : souche hétéro-GISA LIM 2 ; MU 50 : souche hétéro-GISA MU 50.

la fois du personnel formé et du temps pour leur réalisation, les rendant ainsi difficilement utilisables dans les laboratoires de routine.

Il est à noter que, dernièrement, neuf souches de *S. aureus* résistantes aux glycopeptides (GRSA), avec des CMI à la vancomycine et à la teicoplanine > 16 mg/l ont été isolées aux États-Unis. L'opéron *vanA*, responsable de la résistance inductible à haut niveau aux glycopeptides chez les entérocoques, a été retrouvé chez chacune de ces souches.

## Techniques spéciales. Diagnostic génotypique

De nombreux travaux, réalisés ces dernières années, utilisent des techniques moléculaires d'identification reposant sur l'utilisation de sondes spécifiques, l'amplification génique (PCR) ou des techniques dérivées.

Plusieurs techniques ont été développées pour rechercher les staphylocoques et notamment les souches résistantes à la méticilline, directement à partir des prélèvements ou éventuellement sur hémocultures positives. Pour ce faire, il faut distinguer les **prélèvements nobles** (normalement stériles), tels que sang, LCR ou biopsies osseuses, et les **prélèvements polymicrobiens**. Pour ces derniers, des techniques d'identification spécifiques doivent être utilisées :

- l'amplification spécifique d'un fragment interne au gène codant la nucléase permet d'identifier les souches de *S. aureus*. L'amplification peut être réalisée par PCR normale ou par PCR en temps réel, technique où l'évolution de la fluorescence, caractérisant l'amplification du fragment, est suivie au cours du temps (voir « Biologie moléculaire »). Différents fabricants commercialisent maintenant des kits, notamment :
  - Cepheid : Xpert MRSA®, Xpert MRSA/SA SSTI® Xpert MRSA/SA BC® ;
  - Becton Dickinson : BD GeneOhm Staph SR®, BD GeneOhm MRSA ACP® ;
  - bioMérieux : Nuclisens EasyQ MRSA®.
- le système Génotype® (Hain Lifescience) : commercialisé par Biocentrics, il repose sur l'hybridation d'un fragment amplifié à l'aide d'oligonucléotides biotinylés avec des sondes fixées sur une membrane, la révélation s'effectuant par addition d'un conjugué streptavidine/phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromogénique :
  - génotype® *Staphylococcus* pour l'identification de *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri* et *S. simulans*, avec la détection en parallèle du gène *mecA* et du gène codant pour la leucocidine de Panton et Valentine ;
  - génotype® MRSA pour l'identification des *S. aureus* et *S. epidermidis* résistants à la méticilline ;
  - génotype® BC Gram positif pour la recherche des principaux cocci à Gram positif directement dans des hémocultures positives. De plus, ce système permet la détection des gènes *mecA*, *vanA*, *vanB*, *vanC1* et *vanC2*.

Pour les **prélèvements stériles**, non seulement les techniques décrites ci-dessus peuvent être utilisées, mais aussi des techniques moins spécifiques :

- gène codant l'ARN 16S ;
- gène codant la superoxyde dismutase ;
- gène codant la sous-unité β de l'ARN polymérase.

À partir d'un **isolement pur :**

- le kit Accuprobe® *S. aureus* (Gen-Probe®, bioMérieux) permet l'identification de l'espèce *S. aureus* à l'aide d'une sonde monocaténaire d'ADN ;
- l'amplification d'un fragment interne à un gène, couplée à la détermination de la séquence nucléotidique du produit d'amplification obtenu permet d'identifier les staphylocoques :
  - gène codant l'ARN 16S ;
  - gène codant la superoxyde dismutase ;
  - gène codant la sous-unité β de l'ARN polymérase.

En ce qui concerne la recherche de toxines directement sur colonie, elle s'effectue généralement à l'aide de techniques maison par PCR en point final ou en temps réel.

Le CNR des Staphylocoques propose la recherche d'un profil toxinique de la souche par PCR multiplexe qui permet la recherche :

- des entérotoxines (SE*, SEl*) : SEA, SEB, SEC, SED, SEH, SElK, SElL, SElM, SElO, SElP, SElQ, SelR ;
- de la TSST ;
- des exfoliatines A, B, D ;
- des toxines synergohyménotropes : lukM, et la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) ;
- du facteur EDIN (*epidermal cell differentiation inhibitor*) (A-C) ;
- de l'hémolysine β.

De plus, le polymorphisme du gène *agr* (*accessory gene regulator*) est identifié ainsi que le gène de résistance à la méticilline (*mecA*).

Si une caractérisation plus complète de la souche est recherchée, le CNR utilisera alors une puce à ADN ciblant 185 gènes et environ 300 allèles incluant les allèles *agr*, de nombreux facteurs de virulence (adhésines, exoprotéines, toxines, etc.) et la plupart des gènes de résistance aux antibiotiques pour *S. aureus*.

## *Marqueurs épidémiologiques*

Des souches de staphylocoques doivent être fréquemment comparées entre elles, notamment lors d'une intoxication alimentaire collective ou dans un contexte d'infections nosocomiales afin de déterminer les liens entre les isolats et l'origine de la contamination.

En épidémiologie, une méthode n'est utilisable que si elle est reproductible, que si elle permet de typer le plus grand nombre de souches et de distinguer deux souches non reliées épidémiologiquement.

Les systèmes de typage peuvent être classés en deux grandes catégories, les techniques phénotypiques (qui détectent des caractères exprimés par les micro-organismes) et les techniques génotypiques (qui s'appuient uniquement sur des caractères de l'ADN chromosomique ou extrachromosomique).

Les **techniques phénotypiques** sont les plus anciennes et, pour l'étude des staphylocoques, regroupent principalement :

- la **lysotypie**, qui consiste à typer les souches en fonction de leur sensibilité vis-à-vis de cinq phages. La lysotypie est standardisée et mondialement organisée avec un centre international de référence (PHLS, Colindale, Londres) ;
- la **sérotypie**, qui vise à détecter et à caractériser des déterminants antigéniques capsulaires à l'aide d'antisérums spécifiques ; ce typage est réservé à des laboratoires spécifiques.

Du fait des limites rencontrées dans le typage et du manque de reproductibilité des résultats et de pouvoir discriminant de ces méthodes phénotypiques, des **systèmes génotypiques** ont été introduits en utilisant la biologie moléculaire. Pour la comparaison de souches de staphylocoques, les principales techniques sont :

- la **ribotypie**, qui consiste à déterminer le profil d'hybridation des ARN ribosomiques des souches ;
- la ***random amplified polymorphic DNA*** (RAPD), qui consiste à amplifier arbitrairement des séquences et à comparer ensuite les différents profils obtenus par électrophorèse en gel d'agarose ;
- le **champ pulsé** (PFGE), qui consiste à digérer l'ADN total des souches à l'aide d'enzymes de restriction possédant un faible nombre de sites de coupures. De grands fragments sont ainsi obtenus et séparés par une électrophorèse en gel d'agarose en champ variable. Le PFGE s'est révélé être une des méthodes les plus discriminantes ;

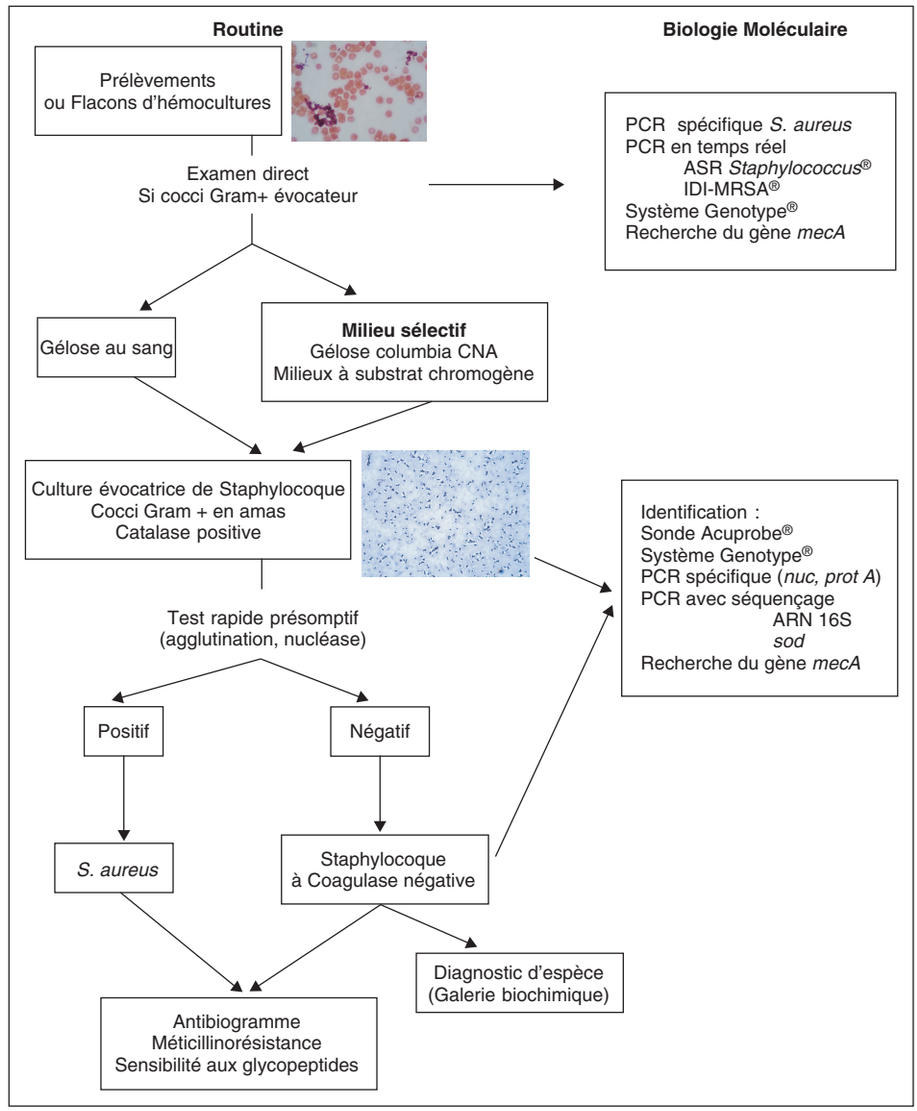



**Fig. 32.10.** – *Démarche diagnostique d'une infection à staphylocoque.*

- la ***multilocus sequence typing*** (MLST), qui repose sur l'analyse de la séquence de gènes de ménage. La combinaison des allèles des différents gènes analysés est unique pour une souche donnée (http://www.mlst.net). L'analyse d'une séquence interne d'environ 500 pb de 7 gènes sélectionnés qui codent la carbamate kinase (*arc*), la shikimate déshydrogénase (*aro*), la glycérol kinase (*glp*), la guanylate kinase (*gmk*), la phosphatase acétyltransférase (*pta*), la triosephosphate isomérase (*tpi*) et l'acétyle coenzyme A acétyltransférase (*yqi*) a été adoptée par consensus par les utilisateurs, et toute mutation relevée dans la séquence d'un de ces gènes définit un nouvel allèle. La MLST est une des dernières techniques décrites et semble être la plus discriminante et la plus reproductible d'un laboratoire à l'autre. Malheureusement, elle est très lourde pour un laboratoire de routine et, de ce fait, elle est réalisée seulement dans des laboratoires spécialisés, notamment au CNR des Staphylocoques à Lyon.

Au total, le diagnostic d'une infection à staphylocoque n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît, mais on peut résumer la démarche diagnostique de manière schématique (fig. 32.10). Certaines souches de *S. aureus* sont atypiques. Le pouvoir pathogène des staphylocoques à coagulase négative est accru sur des terrains fragilisés, ce qui nécessite des techniques parfois sophistiquées pour arriver au diagnostic d'espèce. De plus, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques nécessite, en plus des techniques standard, des approches spécifiques pour les β-lactamines et les glycopeptides notamment. Enfin, dans les infections graves, endocardites notamment, l'étude in vitro d'associations d'antibiotiques est nécessaire afin d'obtenir des synergies et une bactéricidie efficace.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of clinical microbiology. 9th ed., Washington DC : ASM Press ; 2007. p. 390–411.

Brun Y, Bes M, Vandenesch F. *Staphylococcus. In : Freney* J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, Eds. Précis de bactériologie clinique. 2e éd. Paris : ESKA–Alexandre Lacassagne ; 2007. p. 795–844.

Chesneau O, Allignet J, El Sohl N. Thermonuclease gene as a target nucleotide sequence for specific recognition of *Staphylococcus aureus*. Mol Cell Probes 1993 ; 7 : 301–10.

Clark NC, Weigel LM, Patel JB, Tenover FC. Comparison of Tn*1546*-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvannia. Antimicrob Agents Chemoter 2005 ; 49 : 470–2.

Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Antibiogramme, 2e éd. Paris : ESKA ; 2006.

Drancourt M, Raoult D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 1333–8.

Enright MC, Knox K, Griffiths D, Crook DWM, Spratt BG. Molecular typing of bacteria directly from cerebrospinal fluid. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000 ; 19 : 627–30.

Gauduchon V, Chalabreysse L, Étienne J, Célard M, Benito Y, Lepidi H, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 763–6.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997 ; 350 : 1670–3.

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun 2002 ; 77 : 631–41.

Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 2240–1.

Ploy MC, Grélaud C, Martin C, De Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 1998 ; 351 : 1212.

Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as target. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 4296–43301.

Regnault B, Grimont F, Grimont PAD. Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture. Res Microbiol 1997 ; 148 : 649–59.

Rober J, Tristan A, Cavalié L, Decousser JW, Bes M, Étienne J, et al. On behalf of ONERBA. Toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a French multicenter prospective study in 2008. Antimicrob Agents Chemoter 2010 ; 55 : 1734–9.

Ryding U, Espersen F, Söderquist B, Christensson B. Evaluation of seven different enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis 2002 ; 42 : 9–15.

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 407–15.

Weist K, Cimbal AK, Lecke C, Kampf G, Rüden H, Vonberg RP. Evaluation of six agglutination tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of meticillin-resistant *S. aureus* (MRSA). J Med Microbiol 2006 ; 55 : 283–90.

Welsh J, Mclelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1992 ; 18 : 7213–8.

**ADRESSE UTILE**

**Centre national de référence des Staphylocoques**
Centre de Biologie et de Pathologie Est – CBPE
Groupement Hospitalier Est
59, boulevard Pinel
69 677 Bron cedex
Tél. : 04 72 35 73 35

**ANNEXE 32-1**

### Milieux recommandés pour l'isolement et l'identification des cocci Gram positif *(Micrococcaceae)*

• **Milieu de Chapman** : milieu sélectif pour l'isolement des staphylocoques pathogènes
Composition (g/l) :
– extrait de viande de bœuf : 1 ;
– peptone : 10 ;
– mannitol : 10 ;
– chlorure de sodium : 75 ;
– rouge de phénol : 0,025 ;
– agar : 15.
Ajuster à pH 7,5 ± 0,2 puis autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.
Utiliser le milieu coulé en boîte de Pétri ou en tube avec une pente.

• **Milieu Baird-Parker**
Composition (g/l) :
– peptone de caséine : 10 ;
– extrait de viande de bœuf : 5 ;
– extrait de levure : 1 ;
– glycine : 12 ;
– chlorure de lithium : 5 ;
– pyruvate de sodium : 10 ;
– agar : 17.
Ajuster à pH 7 ± 0,2 puis autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.
Laisser refroidir à 45 à 50 °C, puis ajouter 10 ml de solution stérile à 1 % de tellurite de potassium et 50 ml d'émulsion stérile de jaune d'œuf, mélanger soigneusement et couler en boîtes de Petri.
Pour préparer l'émulsion de jaune d'œuf, diluer 15 ml de jaune d'œuf prélevé aseptiquement dans 35 ml d'eau physiologique stérile. Agiter fortement pour obtenir une émulsion homogène et vérifier sa stérilité en l'ensemençant sur un bouillon nutritif qui sera observé pendant 3 jours au moins.

• **Gélose Columbia CNA** : milieu sélectif pour l'isolement des bactéries à Gram positif
Composition (g/l) :
– peptone : 23 ;
– amidon : 1 ;
– chlorure de sodium : 5 ;
– agar : 10.
Ajuster à pH 7,3 ± 0,2 puis autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.
Laisser refroidir à 50 à 55 °C, puis ajouter pour 500 ml de préparation, 25 ml de sang défibriné de cheval et 5 ml d'une solution d'éthanol à 95 % contenant 7,5 mg d'acide nalidixique et 5 mg de sulphate de colistine. Mélanger doucement et couler en boîte de Petri.

• **Gélose DNAse** : mise en évidence d'une désoxyribonucléase
Composition (g/l) :
– tryptose : 20 ;
– acide désoxyribonucléique : 2 ;
– chlorure de sodium : 5 ;
– agar : 12.
Verser les 39 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Ajuster à pH 7,3 ± 0,2 puis autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes. Laisser refroidir à 45 à 50 °C et couler en boîte de Petri.
Ensemencer la gélose à l'aide d'une strie et incuber à 35 à 37 °C pendant 18 heures. Inonder ensuite la gélose avec une solution normale d'acide chlorhydrique. Les cultures qui élaborent une DNAse hydrolysent l'ADN et le milieu devient transparent autour de la strie.

## Famille des *Streptococcaceae*

La famille des *Streptococcaceae* regroupe un ensemble de cocci à Gram positif, se présentant sous forme de cellules ovoïdes ou sphériques de moins de 2 µm de diamètre. Ils sont dépourvus de catalase et de cytochrome oxydase. Ils produisent de l'acide lactique par fermentation du glucose et sont anaérobies-aérotolérants. Cette famille comportait autrefois trois genres : les streptocoques, les entérocoques et les lactocoques. Grâce aux données de taxonomie moléculaire, cette famille a été remaniée et comprend maintenant 160 espèces de streptocoques et germes apparentés qui sont regroupés en plus

de 20 genres différents : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Helcococcus*, *Vagococcus*, *Globicatella*, *Facklamia*, *Dolsigranulum,* etc. L'absence de catalase et l'aspect caractéristique en paires (diplocoques) ou en chaînettes lié aux divisions successives des cellules selon un même plan permettent de les distinguer des *Micrococcaceae*. Cependant, les *Gemella* peuvent former des paires, et les *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Helcococcus*, *Alloiococcus* et *Tetragenococcus* des tétrades en se divisant selon deux plans perpendiculaires. Les genres *Pediococcus* et *Leuconostoc* ne seront pas abordés ici.

Un ensemble de caractères morphologiques, culturaux, antigéniques, biochimiques et la sensibilité à la vancomycine permettent de distinguer assez facilement les streptocoques et les entérocoques des genres apparentés (tableau 32.6).

## Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* sont les plus impliquées en pathologie humaine. Mais il est à noter que des espèces des genres *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Alloiococcus* et *Gemella* sont de plus en plus fréquemment rencontrées chez l'homme (tableau 32.7). Dans la suite du chapitre, seuls les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* seront étudiés, avec une attention particulière pour *Streptococcus pneumoniae* qui sera traité à part.

Certains streptocoques et les entérocoques sont retrouvés partout, dans l'environnement ainsi qu'au niveau des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux où ils vivent à l'état commensal. Les entérocoques retrouvés dans l'environnement signent une contamination fécale. Les germes *Streptococcus* et *Enterococcus* sont responsables de nombreuses infections dont la nature et la gravité sont variables selon les espèces et les groupes antigéniques (tableau 32.8).

## Diagnostic direct en routine

### *Genre* Streptococcus

#### Prélèvements et transport

Bien que les streptocoques supportent assez bien la dessiccation, il est préférable d'acheminer les prélèvements au laboratoire le plus rapidement possible, en moins de 2 heures. Pour la gorge, le prélèvement doit être réalisé sous contrôle visuel (abaisse-langue et éclairage convenable). L'écouvillon en coton ou synthétique (type alginate) doit être frotté sur le pharynx et les amygdales en évitant de toucher la langue ou la luette, ou mieux sur des lésions pultacées. En ce qui concerne les lésions cutanées, les croûtes des pustules ou les chapeaux des vésicules doivent être éliminés stérilement afin de pouvoir frotter fermement un écouvillon sur la lésion. Les prélèvements de plaies seront réalisés de la même manière, après avoir éliminé, à l'aide d'une compresse imprégnée d'eau ou de sérum physiologique stériles, la flore superficielle contaminante.

Si la vésicule est fermée et contient du liquide, ou en cas de cellulite, le liquide inflammatoire est aspiré au niveau de la lésion après asepsie rigoureuse à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. On peut aussi pratiquer un écouvillonnage sur le fond des biopsies pour les cellulites ou les fasciites. Le liquide prélevé ou l'écouvillon sont ensuite transférés dans un tube stérile pour être transportés au niveau du laboratoire le plus rapidement possible (ne pas transporter de seringue avec son aiguille). Il est parfois nécessaire de reprendre la lésion avec du sérum physiologique stérile afin de récupérer suffisamment de produit pathologique.

Les autres prélèvements (hémocultures, LCR, urines, etc.) ne nécessitent pas de précautions particulières, tout en respectant les bonnes procédures de prélèvements recommandées par le laboratoire.

Si le délai d'acheminement du prélèvement risque de se prolonger, celui-ci peut alors être placé dans un milieu de transport, type Portagerm® (bioMérieux) ou dans des flacons d'hémocultures pour les liquides de ponction, tout en sachant que la qualité de l'examen microscopique sera alors compromise.

#### Examen direct

Les streptocoques sont des cocci sphériques ou ovoïdes à Gram positif de diamètre inférieur à 2 µm, groupés en diplocoques ou en chaînettes de taille variable (fig. 32.11), immobiles et asporulés. Une capsule est habituellement retrouvée chez *Streptococcus pneumoniae*, occasionnellement chez certaines souches de streptocoques du groupe A et C, et chez des espèces non groupables productrices de polymères (lévanes, dextranes, etc.). La capsule peut être mise en évidence par la technique à l'encre de Chine ; sur produits pathologiques, la capsule apparaît sous forme de halo autour des germes.

#### Culture

Les streptocoques ont un métabolisme anaérobie, mais la plupart des souches tolèrent l'oxygène et peuvent être cultivées en aérobiose in vitro. La température optimale de croissance est de 35 à 37 °C et leur croissance peut être favorisée par une atmosphère de $CO_2$ ou en anaérobiose. Ce sont des germes relativement exigeants sur le plan nutritif, se développant bien sur des milieux riches, type gélose Columbia, additionné de sang. En revanche, certaines espèces peuvent être sensibles à des variations de pH et nécessitent d'être cultivées dans des milieux tamponnés comme le bouillon glucosé tamponné et le bouillon Todd-Hewitt. La croissance des streptocoques peut s'accompagner d'un trouble homogène avec ou sans dépôt pour les groupes B et D, tandis qu'elle est granulaire avec un surnageant limpide ou légèrement trouble pour les groupes A, C, G et certains streptocoques oraux.

**TABLEAU 32-6**

**Caractères utilisés pour différencier entre eux les cocci à Gram positif, catalase négatifs, à l'exception des genres *Pediococcus* et *Leuconostoc*.**

| | *Abiotrophia* | *Aerococcus* | *Alloiococcus* | *Enterococcus* | *Gemella* | *Globicatella* | *Helcococcus* | *Lactococcus* | *Streptococcus* | *Tetragenococcus* | *Vagococcus* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Morphologie | Cocci, cocco-bacilles et pseudo-bacilles | Cocci | Cocci | Cocci et cocco-bacilles | Cocci | Cocci | Cocci | Cocci et cocco-bacilles | Cocci et cocco-bacilles | Cocci | Cocci |
| Groupement | Chaînettes | Paires, tétrades et amas | Paires, tétrades et amas | Paires et chaînettes | Paires, tétrades et amas | Paires et chaînettes | Paires, tétrades et amas | Paires et chaînettes | Diplocoques et chaînettes | Paires, tétrades et amas | Paires et chaînettes |
| Groupe de Lancefield | Ng ou H | Ng | Ng | D | Ng | Ng | Ng | N | A-H, K-M, O-V et Ng | Ng | Ng |
| Croissance en NaCl 6,5 % | – | + | + | + | – | V | + | V | –* | + | + |
| Test bile-esculine | – | V | – | + | – | V | – | + | V | + | + |
| Production de leucine amino-peptidase | + | V | + | + | + ou V | – | – | + | + | + | + |
| Production de pyrro-lidonyl-aryl-amidase | + | V | + | +[1] | + | + | + | V | –[2] | – | + |
| Sensibilité à la vanco-mycine | S | S | S | S* | S | S | S | S | S | S | S |

* Rares exceptions; Ng, non groupable; v, variable, 33 % de souches positives.
[1] Excepté *E. cecorum*, *E. columbae* et *E. saccharolyticus*.
[2] Excepté pour *S. pyogenes* et quelques souches de *S. pneumoniae*.
(d'après Schlegel et Bouvet)

TABLEAU 32-7

**Genres apparentés aux streptocoques rencontrés en pathologie humaine (d'après Schlegel et Bouvet).**

| *Genre* | *Hôte* | *Habitat* | *Pouvoir pathogène* |
|---|---|---|---|
| *Abiotrophia Granulicatella* | Homme | Rhinopharynx, intestin, voies génitales | Endocardites, infections osseuses, infections ophtalmiques |
| *Aerococcus* | Environnement | | Endocardites, septicémies, méningites, suppurations articulaires, plaies cutanées, infections urinaires, prostatites |
| *Alloiococcus* | Homme | | Pneumopathies, septicémies, suppurations |
| *Gemella* | Homme | Voies respiratoires supérieures et tube digestif | Endocardites, septicémies, pneumopathies, méningites, arthrites, ostéomyélites, suppurations péritonéales, abcès, surinfections de plaies cutanées |
| *Globicatella* | Animal | | Hémocultures |
| *Helcoccus* | Homme | Peau | Suppurations de plaies cutanées, abcès |
| *Lactococcus* | Environnement, produits laitiers | | Endocardites, septicémies, pneumopathies, ostéomyélites |
| *Vagococcus* | Poulet, eaux de rivières | | Septicémies, péritonites |

Un isolement sur gélose au sang permet d'observer l'hémolyse, trois sortes d'hémolyses pouvant être observées sur gélose Columbia à 5 % de sang de mouton ou de cheval (fig. 32.12) :

- β-hémolyse : hémolyse totale des hématies avec éclaircissement de la gélose autour de la colonie ;
- α-hémolyse ou *viridans* : hémolyse incomplète des hématies qui se manifeste par l'apparition, autour des colonies, d'une zone mal définie de décoloration verte du milieu ;
- absence d'hémolyse : aucune zone d'hémolyse ou de décoloration n'apparaît.

Pour une meilleure observation de cette hémolyse, les géloses ensemencées doivent être incubées, soit en anaérobiose, soit en atmosphère de 5 à 10 % de $CO_2$. En effet, l'hémolysine O, produite par un bon nombre de souches de streptocoques β-hémolytiques, est oxygénolabile et risque de passer inaperçue lorsque ces germes sont cultivés à la surface de la gélose en présence d'oxygène.

La taille et la morphologie des colonies obtenues sur gélose au sang, après incubation en atmosphère de $CO_2$, varient suivant les espèces :

- streptocoques des groupes A, C et G : colonies d'environ 0,5 mm de diamètre, sphériques, bombées, transparentes ou translucides, avec un pourtour bien défini, entourées d'une zone de β-hémolyse de diamètre 2 à 4 fois plus grand que celui de la colonie (fig. 32.13) ;

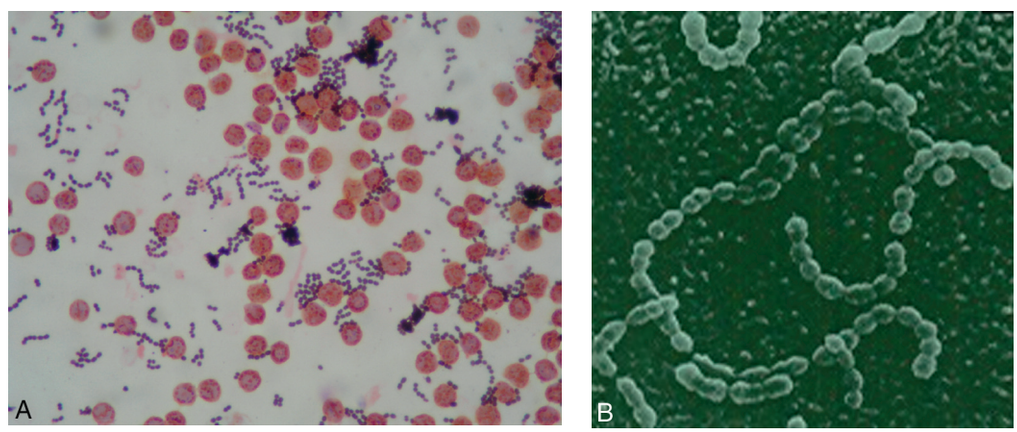



Fig. 32.11. – *a) Hémoculture positive à streptocoque. b) Streptocoque observé en microscopie à balayage.*

**TABLEAU 32-8**

**Principales caractéristiques physiopathologiques des streptocoques et des entérocoques rencontrés en pathologie humaine (d'après Schlegel et Bouvet).**

| *Espèce* | *Groupe* | *Hémolyse* | *Hôte* | *Habitat* | *Maladies* |
|---|---|---|---|---|---|
| *S. pyogenes* | A | β | Homme | Rhinopharynx, peau et intestin | Infections non invasives cutanées (impétigo, surinfection de plaies ou de brûlures) ou muqueuses (angines, pharyngites, otites, sinusites et vaginites) ; infections invasives cutanées (érysipèles, cellulites et fasciites), scarlatine, lymphangites, lymphadénites, septicémies avec localisations pleuropulmonaires, ostéoarticulaires, péritonéales, endophtalmiques, endocarditiques et cérébroméningées, syndrome de choc toxinique, complications poststreptococciques (rhumatisme articulaire aigu, glomérulonéphrite aiguë et chorée) |
| *S. agalactiae* | B | β | Bétail, homme | Tractus gastro-intestinal et génital, et rhinopharynx | Infections néonatales, infections urogénitales, endocarditiques, septicémies, arthrites, ostéomyélites, endophtalmies, pneumopathies |
| *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* | C ou G | β | Cheval, homme | Voies respiratoires | Infections pharyngées, ostéoarticulaires et des tissus mous, septicémies, méningites, pneumopathies, endocardites |
| *S. porcinus* | B ou Ng | β | Porc | Voies respiratoires et digestives | Infections fœtomaternelles |
| *S. mitis, S. oralis, S. sanguis, S. gordonii, S. parasanguis* | Non groupable | α ou non hémolytique | Homme et animal | Oropharynx et tractus intestinal | Endocardites, bactériémies et septicémies avec syndrome respiratoire, péricardites, médiastinites, méningites, ostéomyélites et pleuropneumopathies |
| *S. pneumoniae* | Non groupable | α | Homme | Oropharynx | Pneumonies franches lobaires aiguës, pleurésies purulentes, bactériémies, endocardites, méningites, otites et sinusites |
| *S. anginosus* | A, C, F, G ou non groupable | α, β ou non hémolytique | Homme | Muqueuses oropharyngés, intestinales et génitales | Suppurations pharyngées, cutanées, pleuropulmonaires, intestinales et génitales |
| *S. constellatus* | | | | Muqueuses oropharyngées et intestinales | |

(*Suite*)

**TABLEAU 32-8**

**Suite.**

| *Espèce* | *Groupe* | *Hémolyse* | *Hôte* | *Habitat* | *Maladies* |
|---|---|---|---|---|---|
| *S. intermedius* | Non groupable | α ou non hémolytique | | | Suppurations cérébrales et hépatiques mais aussi pharyngées, cutanées, pleuropulmonaires, intestinales et génitales |
| *S. mutans*<br>*S. sobrinus* | Non groupable | α ou non hémolytique | Homme | Oropharynx | Caries dentaires et endocardites |
| *S. vestibularis*<br>*S. salivarius* | Non groupable | α ou non hémolytique | Homme | Oropharynx | Bactériémies, endocardites et méningites |
| *S. bovis*<br>*S. equinus* | D | α ou non hémolytique | Homme et animal | Intestin | Endocardites, septicémies néonatales, méningites, arthrites, ostéomyélites vertébrales, abcès du cerveau, péritonites et tumeurs coliques |
| *S. gallolyticus* | D | | | | Endocardites |
| *S. alactolyticus* | D | | | | |
| *S. infantarius* | D | | | | |
| *S. intestinalis* | G ou non groupable | β ou non hémolytique | | | |
| *S. macedonicus* | F ou non groupable | α ou non hémolytique | | | |
| *S. iniae* | Non groupable | α et β | Poisson | | Cellulites, bactériémies, endocardites et méningites |
| *S. suis* | R, S ou T | α (sang de mouton)<br>β (sang de cheval) | Porc | Voies respiratoires | Méningites, septicémies, endocardites, pneumonies, uvéites, arthrites et diarrhées |
| *Enterococcus* | D | Non hémolytique | Homme et animal | Intestin, bouche, voies respiratoires, vagin et région périnéale | Bactériémies, infections du tractus urinaire, endocardites, infections inta-abdominales, sepsis néonatal et endophtalmies |

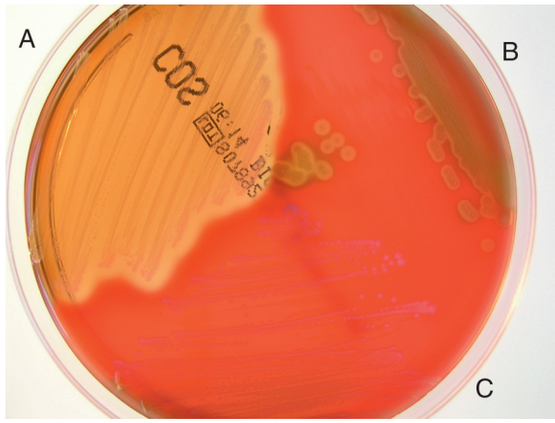



**Fig. 32.12.** – *Différents types d'hémolyse : A) β-hémolyse ; B) α-hémolyse ; C) absence d'hémolyse.*

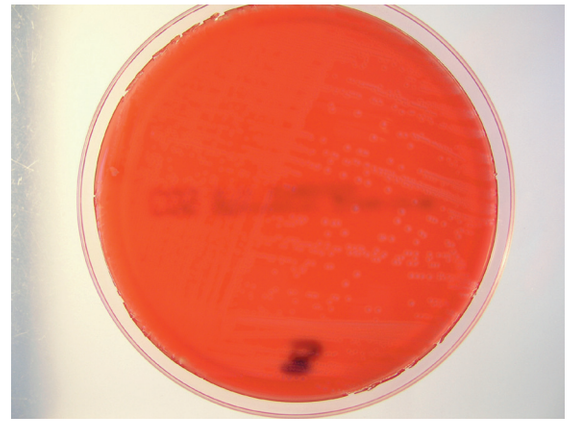
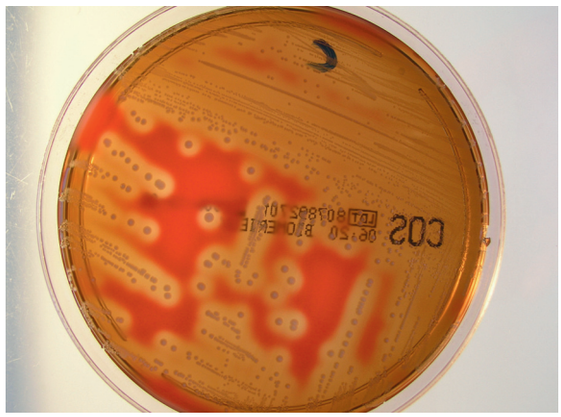


**Fig. 32.14.** – *Streptocoques de groupe B.*



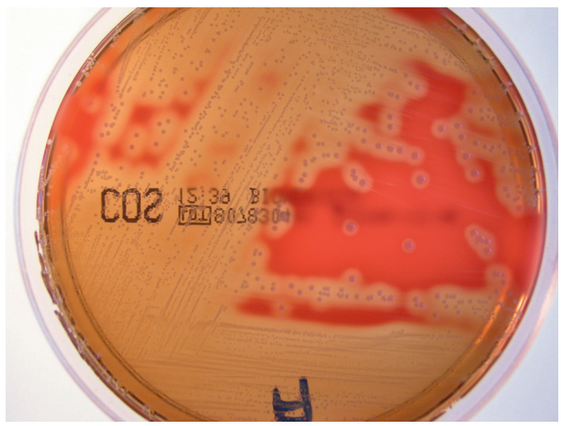


**Fig. 32.13.** – *Streptocoques de groupe A (en bas). Streptocoques de groupe C (en haut).*

**Fig. 32.15.** – *Streptocoques de groupe F.*

- streptocoques de groupe B : colonies plus grandes, d'environ 1 à 2 mm de diamètre, bombées, opaques avec une β-hémolyse incomplète plus petite (fig. 32.14), décelée parfois uniquement sous la colonie ; l'hémolyse est optimisée par le CAMP test dont il sera question plus loin. Certaines souches ne produisent pas d'hémolyse. Elles sont parfois pigmentées en jaune-orange en anaérobiose ;
- streptocoques de groupe F : colonies en forme de tête d'épingle, parfois difficiles à observer à l'œil nu, entourées d'une β-hémolyse semblable à celle des streptocoques du groupe A (fig. 32.15) ;
- streptocoques de groupe D : colonies plus grandes que celles des autres streptocoques, de couleur grise ou gris-blanc, bombées, ne produisant pas d'hémolyse (fig. 32.16) ;
- streptocoques oraux ou *viridans* : colonies souvent punctiformes de 0,1 à 0,5 mm de diamètre, entourées généralement d'une α-hémolyse, mais il arrive qu'elles ne présentent aucune zone d'hémolyse (fig. 32.17).

Beaucoup de prélèvements contenant des streptocoques sont polymicrobiens, il peut alors être utile de recourir à des milieux sélectifs :

- les milieux gélosés CNA (colistine et acide nalidixique) ou CAP (colistine et aztréonam) qui inhibent les bactéries à Gram négatif et permettent la culture des bactéries à Gram positif ;
- le milieu à l'azide de sodium qui inhibe les Gram négatif, et au cristal violet qui inhibe les staphylocoques.

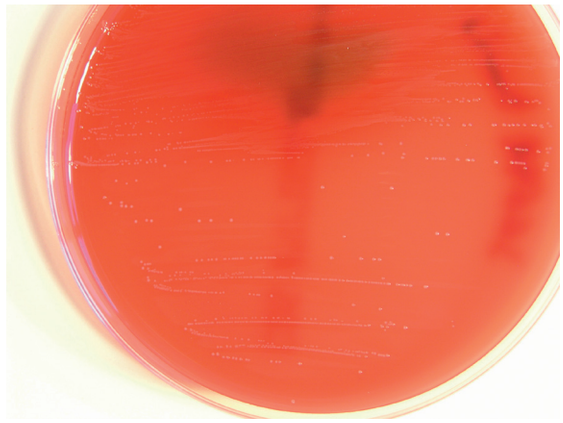


Fig. 32.16. – *Streptocoques de groupe D* (S. bovis).

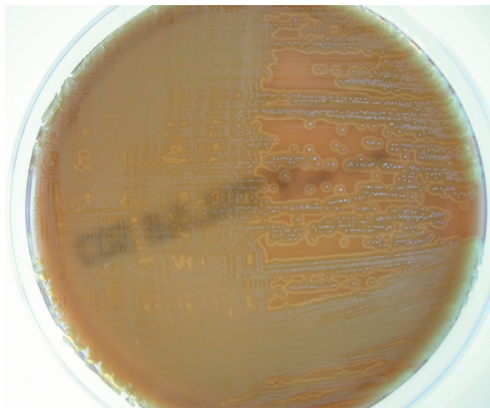


Fig. 32.17. – *Streptocoque du groupe* viridans (S. oralis).

Il est à noter que, pour le dépistage systématique du portage du streptocoque du groupe B au 8e mois de grossesse, des fabricants commercialisent soit des milieux chromogènes, à incuber en aérobiose, soit des milieux permettant la détection de la pigmentation rouge-orangé caractéristique du streptocoque du groupe B à incuber en anaérobiose (voir « Milieux chromogènes »).

## Identification de l'espèce

Avant l'avènement de la biologie moléculaire, la classification des streptocoques-entérocoques reposait essentiellement sur trois critères : l'hémolyse entourant les colonies sur gélose au sang, le groupe de Lancefield et les propriétés physiologiques ou biochimiques. En pratique courante, cette approche demeure valable et permet de distinguer les streptocoques pyogènes (généralement β-hémolytiques), des pneumocoques (α-hémolytiques), des streptocoques commensaux (α-hémolytiques ou non-hémolytiques) et des entérocoques.

**Groupe de Lancefield :** après extraction chimique ou enzymatique, on procède à la caractérisation des antigènes. La technique initiale consistait en une immunoprécipitation en milieu liquide ; actuellement, on utilise en routine des particules de latex sensibilisées par des immunoglobulines spécifiques qui, mélangées à l'antigène homologue, extrait préalablement, entraînent une agglutination. Plusieurs fabricants ont développé des coffrets pour groupage des streptocoques (groupes A, B, C, D, F et G).

- *Extraction enzymatique :* dans un tube, on place 0,4 ml d'enzyme d'extraction, puis on prélève 2 à 5 colonies avec une anse que l'on émulsionne dans la solution enzymatique et on met le tout à incuber durant 10 minutes à 37 °C.
- *Extraction chimique :* l'extraction est réalisée à l'aide d'acide nitreux modifié qui est ensuite neutralisé avant agglutination ; les colonies sont mises au contact des tampons d'extraction dans un tube à hémolyse selon les recommandations du fabricant.

Puis une goutte d'extrait est mélangée à une goutte de chaque latex spécifique (conservés à +4 °C et préalablement ramenés à température ambiante) à l'aide d'un petit agitateur dans les limites d'un cercle tracé sur une plaque ou un carton. On fait subir ensuite un mouvement de rotation au support. L'agglutination doit normalement apparaître sur un ou plusieurs cercles en 30 secondes. Le témoin positif doit être utilisé de la même manière pour vérifier la stabilité des suspensions de latex. La réaction est positive si une agglutination apparaît avec un des réactifs ou si l'agglutination est plus importante avec un des réactifs qu'avec les cinq autres.

Comme le montre le tableau 32.9, l'étude de six caractères d'orientation culturaux permet de procéder à une pré-identification des streptocoques :

- **bile-esculine :** le milieu bile-esculine contient 40 % de bile. La culture positive et le noircissement du milieu sont très spécifiques des streptocoques du groupe D, mais des souches positives peuvent aussi se rencontrer avec *S. mutans* ;
- **bouillon NaCl à 6,5 % :** le test de tolérance au NaCl permet de distinguer les entérocoques des streptocoques du groupe D ; toutefois, environ 80 % des streptocoques du groupe B présentent ce caractère ;
- **sensibilité à la bacitracine :** pour que le test soit valable, il faut partir d'une culture pure uniquement de streptocoques β-hémolytique, car il y a des streptocoques α-hémolytiques, tel le pneumocoque, qui sont sensibles à la bacitracine. Le disque doit être chargé à 0,04 UI de bacitracine et la gélose au sang doit être ensemencée avec un inoculum régulier et dense. La sensibilité se traduit par un diamètre d'inhibition >15 mm. Les streptocoques du groupe A sont sensibles à cet antibiotique, mais aussi certains groupes B, C et G ;
- **hydrolyse de l'hippurate de sodium :** à partir de colonies β-hémolytiques, inoculer une solution d'hippurate de sodium à 1 % et incuber la solution à 37 °C pendant 2 heures, ajouter 2 ml du réactif à la ninhydrine, bien

TABLEAU 32-9

**Caractères permettant une pré-identification des streptocoques.**

| | Groupe | | | | Groupe D | | Streptocoques oraux | S. pneumoniae |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | G | Enterococcus | Streptococcus | | |
| Hémolyse | β | β | β | β | Nh, α | α | Nh, α | α |
| Bile-esculine | — | — | — | — | + | + | — * | — |
| NaCl 6,5 % | — | +* | — | — | + | — | — | — |
| Bacitracine | S | R* | R* | R* | R | R | S* | S* |
| Hippurate | — | + | — | — | — * | — | — * | — |
| Optochine | R | R | R | R | R | R | R | S* |
| Capsule | — * | — | — * | — | — | — | — | + |

* Il existe quelques exceptions.
S, sensible ; R, résistant ; Nh, non hémolytique.

mélanger et incuber à 37 °C pendant 10 à 15 minutes. Une coloration violacée dans la partie supérieure du tube signe la positivité de la réaction. Les souches de streptocoques du groupe B sont positives ainsi que quelques rares souches d'entérocoques et de streptocoques oraux ;

- **sensibilité à l'optochine (chlorhydrate d'éthylhydrocupréine) :** ensemencer un inoculum régulier et dense sur une gélose au sang et placer au centre un disque d'optochine à 5 µg ; la gélose est alors incubée 18 à 24 heures en atmosphère de $CO_2$. Si une zone d'inhibition d'au moins 15 mm apparaît autour du disque, le test est alors considéré comme positif (sensibilité de la souche). Ce test permet de différencier les pneumocoques, souches sensibles, des streptocoques oraux, souches résistantes (fig. 32.18). Néanmoins, 0,5 à 5 % des pneumocoques présentent une résistance à l'optochine et certains streptocoques oraux sont, eux, sensibles.

Fig. 32.18. – *Sensibilité à l'optochine.*
A) *Streptococcus pneumoniae* muqueux (sensible) ;
B) *Streptococcus pneumoniae* non muqueux (sensible) ;
C) *Streptococcus salivarius* (résistant).

### *Streptocoques β-hémolytiques*

La plupart des espèces de streptocoques, notamment les streptocoques β-hémolytiques, possèdent dans leur paroi un polyoside C dont la composition et les propriétés antigéniques permettent de définir des groupes sérologiques. La classification de Lancefield distingue 20 sérogroupes, de A à H et de K à W. Certaines espèces sont dépourvues de ce polysaccharide ; ce sont souvent des souches non hémolytiques ou donnant une α-hémolyse.

L'identification des streptocoques β-hémolytiques est souvent réalisée par sérogroupage dans le système de Lancefield. Néanmoins, on peut faire appel à des épreuves d'identification biochimique complémentaires (tableau 32.10) en cas de doute :

- **hydrolyse du L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide (PYR) :** ce test consiste en la mise en évidence de la pyrrolidonyl-arylamidase, présente chez les souches de streptocoque du groupe A, les streptocoques « déficients » dépendants du pyridoxal (*Abiotrophia*) et chez plus de 99 % des entérocoques. L'hydrolyse du PYR par la pyrrolidonyl-arylamidase libère la β-naphthylamine qui peut alors être détectée par du N,N-diméthylaminocinnamaldéhyde. Ces réactifs sont commercialisés sous différentes formes, notamment des disques imprégnés, par le laboratoire Oxoid ;
- **réaction de Voges-Proskauer (VP) :** réaction modifiée qui permet de mettre en évidence la production d'acétoïne caractéristique de *Streptococcus anginosus* et *constellatus*. On ensemence 2 ml de milieu VP que l'on incube 5 à 6 heures à 37 °C. On ajoute 0,5 ml d'une solution à 6 % d'alpha-naphtol dans l'alcool à 90° et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16 %. Puis on agite et on attend 30 minutes ; si la souche étudiée produit de l'acétylméthylcarbinol (acétoïne) alors le milieu se colore en rouge ;
- **test de Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP-test) :** les streptocoques du groupe B produisent une substance, le facteur CAMP, qui exalte les propriétés

**TABLEAU 32-10**

**Principaux caractères différentiels des streptocoques β-hémolytiques.**

| | *Groupe sérologique* | *PYR* | *CAMP test* | *VP* |
|---|---|---|---|---|
| *S. pyogenes* | A | + | – | – |
| *S. agalactiae* | B | – | + | – |
| *S.* du groupe C | C | – | – | – |
| *S.* du groupe G | G | – | – | – |
| *S. anginosus*<br>*S. constellatus* | A, C, F, G<br>ou aucun | – | – | + |

PYR : hydrolyse du L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide ; VP : Voges-Proskauer ; + : réaction positive ; – : réaction négative.

hémolytiques de l'hémolyse élaborée par la plupart des souches de *S. aureus.* Sur une gélose au sang, on pratique une strie de *S. aureus*. On effectue ensuite, avec le germe que l'on veut identifier, une strie perpendiculaire à la première en s'assurant que les deux stries ne se touchent pas ; il doit y avoir un espace d'environ 2 mm entre les deux stries. La gélose est placée 18 à 24 heures à 37 °C en aérobiose ; une incubation en atmosphère de $CO_2$ pourrait rendre le test positif avec certaines souches de streptocoque du groupe A. Lorsque l'épreuve est positive, il se produit, à la jonction des deux stries, une zone d'hémolyse plus grande que la zone habituelle induite par le seul *S. aureus* (fig. 32.19).

***Streptococcus pyogenes*** (groupe A) : *S. pyogenes* possède l'antigène de groupe A. Pour un diagnostic de certitude, afin de le différencier de *S. anginosus* et *S. constellatus*, l'hydrolyse du PYR et la sensibilité à la bacitracine sont d'excellents tests présomptifs, ainsi que la réaction de VP que l'on retrouve positive pour *S. anginosus* et *S. constellatus*, mais pas pour *S. pyogenes*.

***Streptococcus agalactiae*** (groupe B) : *S. agalactiae* possède l'antigène de groupe B. L'épreuve de CAMP constitue un excellent moyen d'identification présomptive. Il est à noter que *Listeria monocytogenes* produit aussi des colonies β-hémolytiques semblables à celle de *S. agalactiae* et donne également un CAMP positif avec certaines colonies de *S. aureus*. En cas de doute, il convient de réaliser une catalase et un Gram. *L. monocytogenes* est catalase positive et se présente sous forme de petits bacilles à Gram positif. De plus, l'hydrolyse de l'hippurate reste un test spécifique du streptocoque du groupe B parmi les streptocoques β-hémolytiques. *S. porcinus*, streptocoque β-hémolytique pouvant être confondu avec *S. pyogenes*, donne des réactions croisées avec l'antigène du groupe B. Toutefois, il se distingue du streptocoque du groupe B par sa capacité d'hydrolyser l'esculine.

Il est à noter que soit des milieux chromogènes incubés en aérobiose, soit des milieux permettant la détection de la pigmentation rouge-orangé caractéristique du streptocoque du groupe B après incubation en anaérobiose peuvent être utilisés pour l'identification des streptocoques du groupe B (voir « Milieux chromogènes »).

***Streptococcus des groupes C et G* :** ce sont des streptocoques β-hémolytiques qui possèdent peu de caractères spécifiques mais qui se distinguent de *S. anginosus* et *constellatus* par la réaction de VP qui est négative.

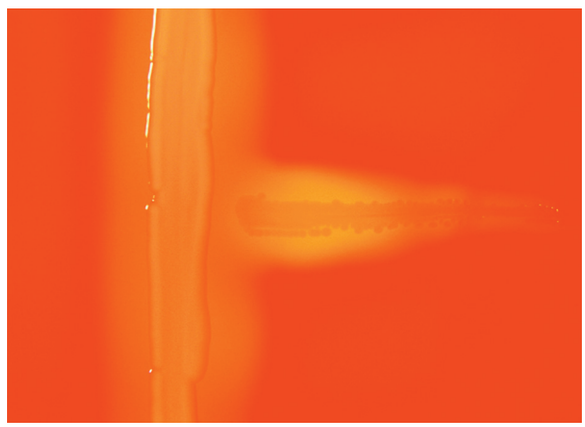


Fig. 32.19. – *CAMP test positif.*
a) Strie verticale de *S. aureus.*
b) Strie horizontale de streptocoque du groupe B.

## Streptococcus *du groupe D*

Cet ensemble hétérogène appelé complexe *S. bovis/S. equinus* doit être différencié des entérocoques qui possèdent aussi l'antigène de groupe D. Ils sont positifs à l'épreuve de la bile-esculine comme les entérocoques, mais contrairement à eux, les streptocoques du groupe D ne poussent pas en milieu NaCl à 6,5 %.

La classification de ce groupe complexe a évolué. La nouvelle classification ainsi que des caractères d'identification des streptocoques du groupe D sont présentés dans le tableau 32.11.

### *Streptocoques oraux*

Les streptocoques oraux sont α-hémolytiques ou non hémolytiques et ne possèdent généralement pas d'antigène de groupe. Ils sont négatifs vis-à-vis des différents tests décrits précédemment, à l'exception du test de VP qui est positif pour *S. anginosus* et *constellatus*. Bien que des caractères d'identification existent pour les streptocoques oraux (tableau 32.12), l'orientation vers

**TABLEAU 32-11**

**Nouvelle classification et caractères d'identification des streptocoques du groupe D (d'après Bouvet, Schlegel et Loubinoux).**

| *Dénomination actuelle* | *S. bovis/ S. equinus* | *S. gallolyticus subsp.* | | | *S. infantarius subsp.* | | *S. alactolyticus* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *gallolyticus* | *pasteurianus* | *macedonicus* | *infantarius* | *coli* | |
| *Dénomination ancienne* | *S. equinus* | *S. bovis biotype I* | *S. bovis biotype II.2* | *S. macedonius* | *S. bovis biotype II.1* | | *S. alactolyticus* |
| Hydrolyse de l'esculine | + | + | + | – | V | + | + |
| Production de α-galactosidase | ± | + | V | V | + | + | + |
| Production de β-galactosidase | – | – | + | V | – | – | – |
| Production de β-glucosidase | + | + | + | – | V | + | + |
| Production de β-glucuronidase | – | – | + | – | – | – | – |
| Production de β-mannosidase | – | V | + | – | – | – | – |
| Hydrolyse du gallate | – | + | – | – | – | – | – |

(*Suite*)

**TABLEAU 32-11**

**Suite.**

| *Dénomination actuelle* | *S. bovis/ S. equinus* | *S. gallolyticus subsp.* | | | *S. infantarius subsp.* | | *S. alactolyticus* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *gallolyticus* | *pasteurianus* | *macedonicus* | *infantarius* | *coli* | |
| *Dénomination ancienne* | *S. equinus* | *S. bovis biotype I* | *S. bovis biotype II.2* | *S. macedonius* | *S. bovis biotype II.1* | | *S. alactolyticus* |
| Fermentation de l'amidon | ± | + | – | – | + | V | V |
| Fermentation du glycogène | ± | + | – | – | + | – | – |
| Fermentation de l'inuline | V | + | – | – | – | – | – |
| Fermentation du lactose | ± | + | + | + | + | + | – |
| Fermentation du mannitol | – | + | – | – | – | – | V |
| Fermentation du mélibiose | V/– | V | – | V | + | – | V |
| Fermentation du méthyl-β-D-glucopyranoside | + | + | + | – | V | + | + |
| Fermentation du pullulane | V/– | + | – | – | + | – | – |
| Fermentation du raffinose | ± | V | V | + | + | V | + |
| Fermentation du tréhalose | V | + | + | – | – | – | – |

+ : plus de 85 % de souches positives ; – : moins de 15 % de souches positives ; V : caractère variable selon les souches.

**Caractères d'identification des principales espèces de streptocoques oraux isolées en pathologie humaine, d'après Bouvet, Schlegel et Loubinoux.**

| | *S. anginosus* | *S. constellatus* | *S. gordonii* | *S. intermedius* | *S. mitis* | *S. mutans* | *S. oralis* | *S. parasanguinis* | *S. salivarius* | *S. sanguinis* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hémolyse | α, β ou Nh | α, β ou Nh | α ou Nh | α, β ou Nh | α ou Nh | α ou Nh | α ou Nh | α ou Nh | α ou Nh | α ou Nh |
| Production d'acétoïne | + | + | – | + | – | + | – | – | + | – |
| Hydrolyse de : | | | | | | | | | | |
| Arginine | + | + | V | + | – | – | – | V | – | + |
| Esculine | + | – | + | + | – | + | – | V | – | V |
| Production de : | | | | | | | | | | |
| Pyrrolidonyl arylamidase | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Phosphatase alcaline | + | + | + | + | V | – | V | V | V | V |
| N-acétyl-β-glucosaminidase | – | – | – | + | – | – | V | – | – | – |
| α-galactosidase | V | – | V | – | V | V | V | V | – | V |
| β-galactosidase (substrat β-GAL) | V | – | – | V | V | – | V | + | V | – |
| β-galactosidase (substrat β-GAR) | V | – | + | + | V | – | V | + | V | – |
| β-glucosidase | + | – | + | + | – | + | – | V | + | V |
| β-glucuronidase | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| β-mannosidase | – | – | + | V | – | – | – | + | – | – |
| Fermentation : | | | | | | | | | | |
| Raffinose | V | – | – | – | V | V | V | V | + | V |
| Mannitol | V | – | – | – | – | + | – | – | – | V |
| Sorbitol | – | – | – | – | – | + | – | – | V | V |
| Inuline | – | – | + | – | – | + | – | – | V | V |
| Groupe de Lancefield | A, C, F, G, ou Ng | A, C, F, G, ou Ng | H ou Ng | Ng | K, O ou Ng | E ou Ng | Ng | F ou Ng | H, K ou Ng | H, ou Ng |

+ : plus de 85 % de souches positives; – : moins de 15 % de souches positives; V : caractère variable selon les souches; Ng : non groupable.

ces streptocoques se fait donc essentiellement par un diagnostic d'exclusion. Pour une identification d'espèce, indispensable dans un contexte d'endocardite, le microbiologiste fait appel aux galeries biochimiques ou à une identification génotypique.

## *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures. L'un des éléments majeurs de virulence du pneumocoque repose sur la capsule. Elle est constituée de macromolécules polyosidiques et, classiquement, seules les souches capsulées possèdent un pouvoir pathogène expérimental. La structure antigénique de la capsule permet un sérotypage des souches (classification de Lund) ; plus de 90 sérotypes sont actuellement décrits.

### Prélèvements et transport

Le pneumocoque étant une bactérie fragile, les prélèvements doivent arriver rapidement au laboratoire. Toutefois, avec l'emploi de milieux de transport, type Portagerm®, l'acheminement peut être différé.

Pour le diagnostic des infections respiratoires, l'examen du crachat, bien que contaminé par une flore endogène oropharyngée, reste un examen fiable s'il est réalisé correctement avec une bactériologie quantitative. Cependant, les méthodes invasives par fibroscopie ou ponction transtrachéale sont préférables. Il est à noter que de nombreuses infections dues à des pneumocoques sont accompagnées d'une bactériémie (notamment pneumopathies et méningites) ; des hémocultures sont donc recommandées en cas de suspicion d'infection pneumococcique.

Pour les autres prélèvements, hémocultures, LCR, liquide de ponction pleurale ou péritonéale et pus de paracentèse, on doit seulement respecter les procédures de prélèvements et de transport recommandées par le laboratoire.

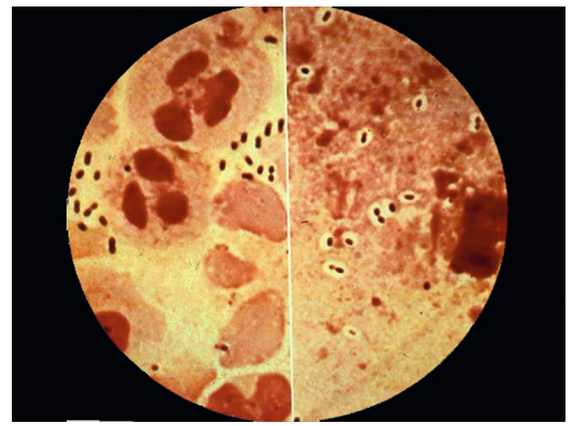


**Fig. 32.20.** – *Gram d'un LCR positif à* S. pneumoniae.

### Examen direct

Au Gram, les pneumocoques présentent une morphologie caractéristique ; ce sont des cocci à Gram positif, groupés en diplocoques, lancéolés et capsulés en forme de 8 ou présentant un aspect en « flamme de bougie ». Dans les produits pathologiques tels que LCR, autres liquides de ponction ou prélèvements pulmonaires, la présence de cocci à Gram positif en diplocoques entourés d'un halo intra- ou extraleucocytaire (fig. 32.20) est en faveur d'une infection à pneumocoque.

Des aspects atypiques peuvent être observées (Gram douteux, formes pseudobacillaires) sur des produits pathologiques après mise sous traitement (fig. 32.21).

### Culture

La culture des pneumocoques nécessite des facteurs de croissance ; les géloses trypticase-soja ou Columbia enrichies en sang (5 %) sont les plus utilisées. La gélose « chocolat » Polyvitex® représente aussi un

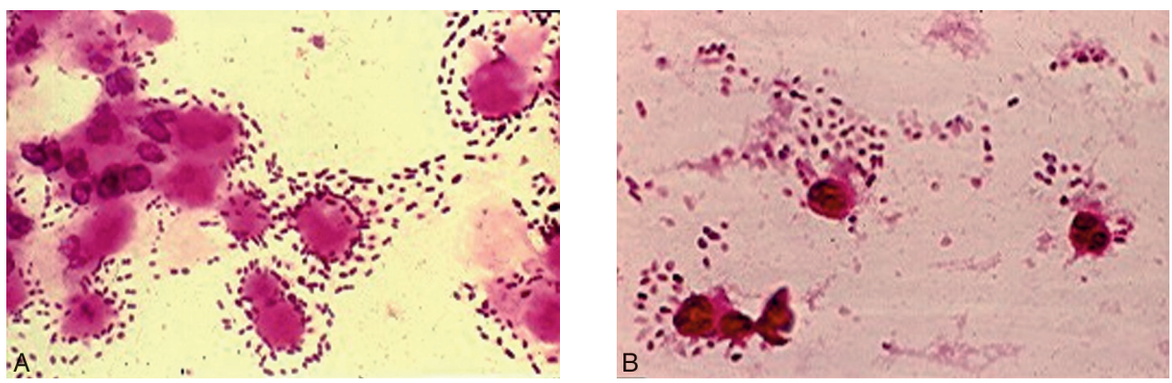



**Fig. 32.21.** – *Examen direct d'un LCR de méningite à* S. pneumoniae.
A) Avant traitement (aspect caractéristique). B) Après traitement (Gram douteux, protoplastes).

milieu favorable à la culture des pneumocoques. Comme pour les autres streptocoques, une atmosphère enrichie en $CO_2$ (5 à 10 %) voire une atmosphère anaérobie favorisent la croissance des pneumocoques et l'expression de l'hémolysine. L'hémolyse est généralement α, mais en anaérobiose on peut observer une hémolyse β.

Les milieux gélosés CNA (colistine et acide nalidixique) ou CAP (colistine et aztréonam) qui inhibent les bactéries à Gram négatif peuvent être ensemencés en cas de prélèvements polymicrobiens.

Les colonies des bactéries capsulées sont lisses (*smooth*) tandis que celles ayant perdu leur capsule sont rugueuses (*rough*).

Les colonies ont généralement une taille de 0,5 à 1,5 mm et sont entourées d'une α-hémolyse ; elles sont opaques ou grisâtres, à bord régulier, et bombées. En primoculture, les colonies en forme de dôme se creusent au centre sous l'action d'autolysines pour donner un aspect en anneau déprimé en son centre. Cette forme ombiliquée est spécifique du pneumocoque. Le sérotype 3 présente des colonies muqueuses, semblables à celles de *Klebsiella pneumoniae*, du fait d'une exubérance de la capsule (fig. 32.22).

En bouillon nutritif, les pneumocoques ne peuvent survivre qu'en milieu glucosé tamponné ; sinon, la fermentation du glucose en acide lactique abaisse le pH, rendant le milieu hostile. La croissance du pneumocoque est granulaire, avec un surnageant limpide voire légèrement trouble.

### Identification de l'espèce

Différents tests spécifiques permettent d'identifier de façon rapide et présomptive les pneumocoques (tableau 32.9) :

- **sensibilité à l'optochine :** seuls les pneumocoques sont sensibles à l'optochine, tout en sachant que 5 % des souches peuvent être résistantes ;
- **solubilité dans la bile :** parmi les streptocoques, seuls les pneumocoques sont solubles dans la bile. Le test consiste à préparer une suspension dense à partir d'une culture pure de 24 heures sur gélose au sang. À 500 µl de cette solution, ajouter deux gouttes d'une solution de désoxycholate de sodium à 10 %. Après 30 minutes à 37 °C, on note, en cas de positivité, un éclaircissement de la solution par comparaison avec une suspension témoin où le désoxycholate de sodium est remplacé par de l'eau ;
- **agglutination** : l'agglutination avec des particules de latex sensibilisées avec des pools d'anticorps anticapsulaires peut permettre de confirmer l'identification du pneumocoque (Slidex pneumo-Kit® de bioMérieux ou Pneumo Dryspot® d'Oxoid par exemple).

En cas de doute, la biologie moléculaire peut permettre de confirmer rapidement l'identification de la souche. Elle consiste en l'utilisation d'une PCR spécifique, maison ou trousse développée par différents fabricants, dont les deux cibles les plus usitées sont le gène *ply* de la pneumolysine ou le gène *lytA* de l'autolysine, le gène *lytA* étant plus spécifique.

Après avoir porté le diagnostic d'espèce *S. pneumoniae*, on peut déterminer le sérotype selon la classification de Lund (gonflement capsulaire, agglutination, biologie moléculaire, etc.)

## *Genre* Enterococcus

Le genre *Enterococcus* regroupe actuellement 27 espèces du fait de leurs caractéristiques biochimiques, physiologiques, antigéniques et génétiques. Les infections à entérocoques sont essentiellement dues à *E. faecalis* (80 % des cas) et *E. faecium* (5 à 10 % des cas). D'autres espèces d'entérocoques sont rencontrées plus rarement en pathologie humaine : *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii,* et *E. raffinosus*.

### Prélèvements et transport

Les entérocoques sont suffisamment résistants à la dessiccation et au refroidissement pour qu'il n'y ait pas de conditions particulières de prélèvement et de transport. Seules les bonnes pratiques de prélèvements élaborées par le laboratoire doivent être respectées.

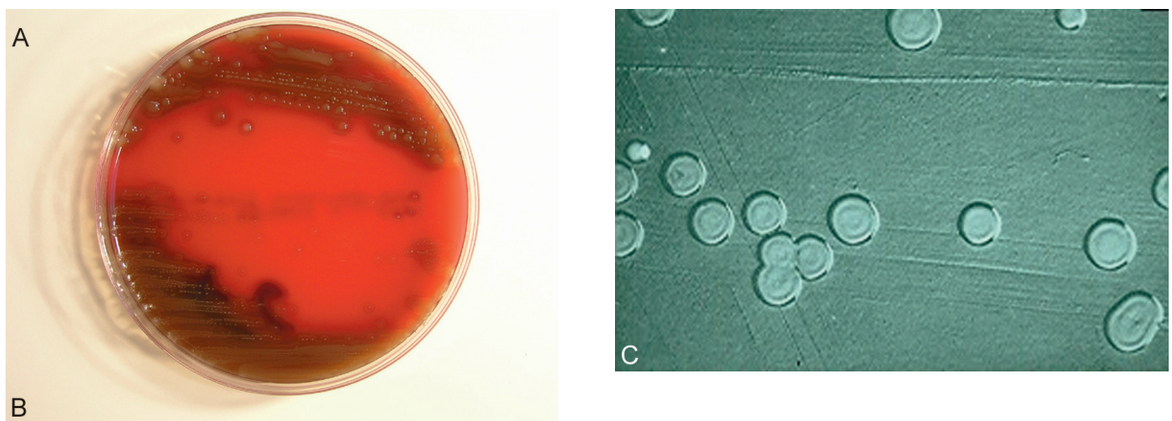



Fig. 32.22. – *Deux souches de* S. pneumoniae : *A) muqueuse (sérotype 3) ; B) non muqueuse ; C) colonies ombiliquées.*

## Examen direct

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif, ovoïdes disposés par paires ou en courtes chaînettes.

## Culture

Les entérocoques cultivent bien sur milieux ordinaires, tels que gélose trypticase additionnée de sang. Les colonies sont assez larges (0,5 à 1,5 mm), légèrement bombées, blanches ou gris-blanc. La majorité des souches appartenant à ce genre sont non hémolytiques (fig. 32.23) ; toutefois, après 48 à 72 heures d'incubation, on note parfois une faible hémolyse α. *E. faecalis* et *E. durans* peuvent occasionnellement produire une β-hémolyse faible. Les entérocoques ne nécessitent pas une atmosphère de $CO_2$ pour leur culture, même si cette atmosphère favorise la pousse de certaines espèces.

Certains milieux sélectifs peuvent être utilisés pour sélectionner les entérocoques à partir de prélèvements polymicrobiens :

- les milieux à base de bile, d'esculine et d'azide de sodium : les entérocoques apparaissent de couleur noire du fait de l'hydrolyse de l'esculine, tandis que les bactéries à Gram négatif sont inhibées par l'azide ;
- le milieu gélosé contenant de la céphalexine, de l'aztréonam et de l'arabinose pour l'isolement d'*E. faecium* ;
- les milieux gélosés **CNA** et **CAP** qui inhibent les bactéries à Gram négatif et permettent la culture des bactéries à Gram positif ;
- des milieux gélosés contenant 6 mg/l de vancomycine permettant l'isolement, de façon spécifique, d'une des trois espèces d'entérocoques résistants à la vancomycine (phénotype VanC), *E. gallinarum*, *E. flavescens* ou *E. casseliflavus*, sont commercialisés.

Pour l'identification présomptive des entérocoques à partir des urines, certains fabricants ont développé des milieux chromogéniques (voir « Milieux chromogènes »).

En bouillon nutritif, les entérocoques peuvent donner un trouble homogène avec ou sans dépôt.

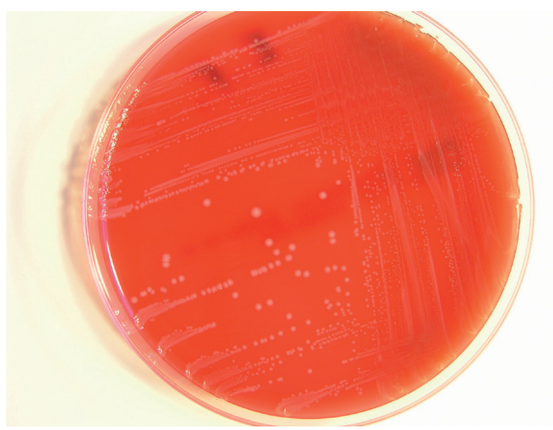


Fig. 32.23. – *Culture sur gélose au sang d'*E. faecalis.

## Identification de l'espèce

La plupart des espèces d'entérocoques possèdent l'antigène de groupe D de Lancefield et, comme les streptocoques du groupe D (tableau 32.13), ils poussent en présence de bile à 40 % en hydrolysant l'esculine (milieu bile-esculine), ils sont résistants à la bacitracine et à l'optochine ; ils n'hydrolysent pas l'hippurate de sodium et ne possèdent pas de capsule. En revanche, ils s'en distinguent par une croissance en milieu hostile (tableau 32.13), à 10 et 45 °C, ainsi qu'en milieu à NaCl à 6,5 %, et par une hydrolyse du PYR (tableau 32.10).

Une identification permettant de préciser l'espèce repose sur l'étude de différents caractères phénotypiques (tableau 32.13).

### *Identification complète : galeries biochimiques*

En plus des caractères précédents, il est parfois nécessaire de recourir à des galeries biochimiques plus complètes (fig. 32.24).

L'identification de la plupart des espèces de la famille des *Streptococcaceae* est réalisable à l'aide de galeries biochimiques manuelles ou automatisées. Les principaux systèmes utilisés en France sont :

- API 20 Strep® ou rapid ID 32 Strep® (bioMérieux) ;
- système Vitek 2 avec les cartes Vitek 2 GP® (bioMérieux) ;
- système BD Crystal GP® (Becton Dickinson) ;
- système BD Phoenix™ avec les galeries PID® et SMIC/ID9® pour les streptocoques et les pneumocoques ou PMIC/ID/6® pour les entérocoques (Becton Dickinson) ;
- système Taxiden® (i2a) avec la galerie STREP.

Ces systèmes sont partiellement ou entièrement automatisés et permettent une identification après 24 heures d'incubation. Afin d'obtenir un résultat fiable et reproductible, un respect des protocoles délivrés par les fournisseurs est fortement recommandé, notamment en ce qui concerne les inoculums, les délais et températures d'incubation, ainsi que les temps de réaction lors d'ajout des réactifs de révélation. L'inoculum nécessaire doit être prélevé sur une culture pure à partir de plusieurs colonies pour obtenir un résultat reproductible et éviter de sélectionner une sous-population. Pour une même souche, des modifications de profils pourront être observées suivant le nombre de subcultures et les milieux utilisés. En effet, des enzymes pourront être induites ou réprimées par certains constituants des différents milieux.

## *Genres* Abiotrophia *et* Granulicatella

Ces genres ont été séparés du genre *Streptococcus* du fait de leur distance génétique au niveau de l'ARN 16S. Les deux genres ont en commun d'être des cocci à Gram positif disposés en paires ou en chaînette, ovoïdes ou pseudobacillaires. Ils sont catalase négative et homofermentaires. Leur croissance se fait par satellitisme ou sur milieux supplémentés en facteur de croissance. Ils produisent une pyrrolidonyl arylamidase. Les deux espèces

**TABLEAU 32-13**

**Caractères phénotypiques des entérocoques les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine (d'après Loubinoux, Schlegel et Bouvet).**

| | *E. avium* | *E. casseliflavus* | *E. durans* | *E. faecalis* | *E. faecium* | *E. gallinarum* | *E. hirae* | *E. mundtii* | *E. raffinosus* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mobilité | – | + | – | – | – | + | – | – | – |
| Pigmentation jaune | – | + | – | – | – | – | – | + | – |
| Résistance au téllurite de potassium | – | – | – | + | – | – | V | – | – |
| Production d'acétoïne | V | V | + | + | + | V | + | + | V |
| Hydrolyse de l'arginine | – | V | + | + | + | + | + | + | – |
| Hydrolyse du pyruvate | + | V | – | + | – | – | – | – | + |
| Fermentation de l'arabinose | + | + | – | – | + | + | – | + | + |
| Fermentation du lactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fermentation du mannitol | + | + | – | + | + | + | – | + | + |
| Fermentation du méthyl-α-D-glucopyranoside | V | + | – | – | – | + | – | – | V |
| Fermentation du raffinose | – | + | – | – | V | + | + | + | + |
| Fermentation du saccharose | V | + | – | + | + | + | + | + | + |
| Fermentation du sorbitol | + | V | – | + | – | – | – | V | + |
| Fermentation du sorbose | + | – | – | – | – | – | – | – | + |

+ : plus de 85 % des souches positives ; – : moins de 15 % des souches positives ; V : entre 15 et 85 % de souches positives.

**Fig. 32.24.** – *Galeries d'identification des streptocoques.*
A) VITEK 2 GP® (bioMérieux) ; B) rapid ID 32 Strep® (bioMérieux) ; C) BD Crystal GP® (Becton Dickinson) ; D) PID® (Becton Dickinson) ; E) Taxiden (i2a).

les plus fréquentes sont *A. defectiva* et *G. adiacens*. Ces germes sont responsables chez l'homme d'infections invasives, souvent persistantes, telles que des endocardites ou des infections osseuses.

## Sensibilité aux antibiotiques

### *Antibiogramme standard*

L'étude de sensibilité aux antibiotiques sur milieu gélosé s'effectue selon les recommandations du CA-SFM sur gélose Mueller-Hinton au sang en atmosphère aérobie (sans $CO_2$) pour les streptocoques et les pneumocoques, sur gélose Mueller-Hinton en atmosphère aérobie pour les entérocoques. À partir d'une culture de 18 à 24 heures sur milieu gélosé approprié, une suspension à 0,5 MacFarland est préparée en bouillon Mueller-Hinton ou en solution saline. Pour un ensemencement par écouvillonnage, la suspension est diluée au 1/10e pour les entérocoques, et utilisée pure pour le pneumocoque et les streptocoques, tandis que pour un ensemencement par inondation, la dilution est au 1/10e pour le pneumocoque et les streptocoques et au 1/100e pour les entérocoques. Après séchage à l'étuve, les disques sont déposés sur la gélose. L'interprétation se fait selon les recommandations du CA-SFM. Toutefois, des tests complémentaires peuvent être utiles pour certains antibiotiques ou certaines familles d'antibiotiques.

### *Recherche de la sensibilité aux β-lactamines*

Il existe un manque de corrélation entre les diamètres obtenus sur milieu gélosé et les CMI en ce qui concerne notamment les β-lactamines, et tout particulièrement la pénicilline G pour les streptocoques et les pneumocoques. De plus, les protéines liant la pénicilline (site d'action des β-lactamines) étant différentes d'une molécule à l'autre, il est impossible d'extrapoler une diminution de sensibilité à la pénicilline G aux autres β-lactamines. De ce fait, le CA-SFM préconise d'étudier la sensibilité à la pénicilline G des streptocoques et des pneumocoques à l'aide d'un disque d'oxacilline à 5 µg :

- pour les streptocoques, si le diamètre est supérieur ou égal à 21 mm, la souche est alors considérée comme sensible à la pénicilline G et aux autres β-lactamines ;
- pour les pneumocoques, si le diamètre est supérieur ou égal à 26 mm, alors la souche est considérée comme sensible à la pénicilline G et aux autres β-lactamines.

Lorsque les diamètres sont inférieurs à ceux cités précédemment, les CMI doivent être déterminées afin de confirmer ou d'infirmer la diminution de sensibilité. Pour les streptocoques, seules les CMI vis-à-vis de la pénicilline G et de l'amoxicilline sont déterminées, alors que pour les pneumocoques, les CMI vis-à-vis de la pénicilline G, de l'amoxicilline et du céfotaxime voire de la ceftriaxone sont nécessaires. Cette détermination se fait normalement par la méthode de référence, dilution en milieu solide, méthode lourde en routine. Pratiquement, les CMI sont souvent déterminées par la méthode de l'E-Test® en respectant scrupuleusement les recommandations du fabricant.

## Diagnostic direct rapide par recherche d'antigènes de groupe ou d'espèce

Voir le chapitre « Diagnostic rapide en bactériologie par recherche d'antigènes ».

La recherche d'antigènes de groupe ou d'espèce dans certains prélèvements s'avère très utile pour un diagnostic bactériologique rapide. Cette recherche est pratiquée en routine pour trois espèces :

- streptocoques du groupe A (*S. pyogenes*) : suite aux recommandations de l'Afssaps, la recherche d'antigènes polyosidiques de streptocoques du groupe A s'effectue sur un prélèvement de gorge en cas de suspicion d'angine puisque, normalement, en pratique quotidienne, seules les angines dues à *Streptococcus pyogenes* relèvent d'un traitement par des antibiotiques. Ces « docteurs tests » comportent les deux étapes d'extraction des antigènes et de détection. Différents kits fondés sur des tests immunochromatographiques sont disponibles, tels que STREPTOP A® ou STREPTATEST®, distribué par ALL.DIAG, ou Strepto test®, distribué par Dectra Pharma ;
- streptocoques de groupe B (*S. agalactiae*) : en cas de suspicion de méningite chez les nouveau-nés suite à une infection maternofœtale, la recherche d'antigènes solubles du streptocoque du groupe B peut être effectuée directement dans le LCR à l'aide des kits latex spécifiques seulement lorsque des germes sont vus à l'examen direct. Par ailleurs, des tests rapides immunochromatographiques sont développés et applicables aux prélèvements génitaux maternels ou du nouveau-né ;
- *Streptococcus pneumoniae* : la recherche d'antigènes capsulaires peut être effectuée sur les prélèvements des foyers infectieux, mais aussi dans le sang et les urines où ils diffusent du fait qu'il s'agit d'antigènes solubles. La recherche des antigènes capsulaires peut s'effectuer par agglutination de particules de latex sensibilisées, Slidex Meningite Kit® (bioMérieux) ou Wellcogen *S. pneumoniae*® (Wellcom), sur LCR et sérum après chauffage ou sur urines après concentrations de celles-ci, voire directement sur le surnageant d'hémocultures positives. Un test unitaire immunochromatographique permet la mise en évidence du polyoside C ; Now® *Streptococcus pneumoniae* (Oxoid) a été commercialisé pour la recherche des antigènes de pneumocoques dans les urines. Ce test est maintenant aussi validé pour les LCR et serait, d'après la littérature, très performant pour les prélèvements pleuraux et le sang. Il est à noter qu'une recherche d'antigènes pneumococciques dans les urines n'est pas à réaliser chez les enfants, du fait qu'un portage rhinopharyngé suffit pour induire une positivité des urines indépendamment de toute infection.

## Diagnostic indirect, sérodiagnostics

La recherche d'anticorps spécifiques n'est pratiquée actuellement que dans les infections à streptocoques du groupe A devant un tableau clinique évocateur d'une maladie poststreptococcique, d'un rhumatisme articulaire aigu ou d'une glomérulonéphrite aiguë. Des anticorps spécifiques dirigés contre des enzymes produites par *S. pyogenes* comme les antistreptolysines O (ASLO), les antistreptodornases (ASD) ou éventuellement les antistreptokinases (ASK) peuvent être recherchés à l'aide de différents kits de diagnostic. L'interprétation des résultats peut être délicate du fait de la variation des taux significatifs en fonction des trousses, mais aussi à cause d'autres facteurs qui influencent le résultat, tels l'âge, l'origine ethnique du patient ou la zone géographique. Comme pour tout diagnostic sérologique, l'interprétation est facilitée en comparant les taux d'anticorps sur deux prélèvements réalisés à au moins 15 jours d'intervalle, avec observation de l'accroissement ou non du titre.

Le dosage des anticorps antipneumococciques (anticapsulaires) ne fait pas partie de la routine ; il n'est actuellement pratiqué qu'en contrôle postvaccinal. Le dosage des antipolyosides C aurait un certain intérêt.

## Techniques spéciales

### *Diagnostic génotypique*

De nombreux travaux réalisés ces dernières années utilisent des techniques moléculaires d'identification reposant sur l'utilisation de sondes spécifiques, l'amplification génique (PCR) ou des techniques dérivées.

#### À partir d'un isolement pur

L'hybridation spécifique se fait à l'aide d'une sonde monocaténaire d'ADN avec les trousses :

- Accuprobe® *S. agalactiae* (Gen-Probe®) pour l'identification de l'espèce *S. agalactiae* ;
- Accuprobe® *S. pyogenes* (Gen-Probe®) pour l'identification de l'espèce *S. pyogenes*.

L'amplification spécifique d'un fragment interne à un gène, par PCR normale ou par PCR en temps réel, est une technique où l'évolution de la fluorescence caractérisant l'amplification du fragment est suivie au cours du temps (voir le chapitre « Biologie moléculaire ») :

- gène *ddl* codant la D-alanine ligase pour identifier *E. faecium* et *E. faecalis* ;

- gènes *vanC1* et *vanC2/C3* codant les D-alanine ligases apparentées VanC1 et VanC2/C3 pour l'identification d'*E. gallinarum* et d'*E. casseliflavus* respectivement ;
- gène *ply* codant la pneumolysine, gène *cpsA* impliqué dans la synthèse de la capsule et gène *lytA* codant l'autolysine pour l'identification de *S. pneumoniae*.

L'amplification d'un fragment interne à un gène, couplée à la détermination de la séquence nucléotidique du produit d'amplification obtenu, permet d'identifier les streptocoques :

- gène codant l'ARN 16S ;
- gène codant la superoxyde dismutase.

Le système Genotype® (Hain Lifescience) commercialisé par Biocentrics repose sur l'hybridation d'un fragment amplifié à l'aide d'oligonucléotides biotinylés avec des sondes fixées sur une membrane, la révélation s'effectuant par addition d'un conjugué streptavidine/phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromogénique :

- Genotype® *Enterococcus* pour l'identification d'*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus,* et la recherche des gènes de résistance aux glycopeptides, *vanA*, *vanB*, *vanC1* et *vanC2/C3*.

### À partir d'un prélèvement

La détection génomique de *S. pneumoniae* a été largement évoquée sur LCR, sang, liquides pleuraux dans le chapitre « Biologie moléculaire ».
À partir d'un prélèvement normalement stérile, les identifications par amplification citées précédemment sont utilisables.

Le système Génotype® (Hain Lifescience) commercialise la trousse GénoType® BCgrampositive qui permet d'identifier, à partir de flacons d'hémocultures positives, un panel de cocci à Gram positif comprenant des staphylocoques, des streptocoques, des pneumocoques et des entérocoques. Parallèlement, ce système permet aussi de détecter les gènes *mecA*, *vanA*, *vanB*, *vanC1* et *vanC2*.

De plus, différentes trousses de PCR en temps réel sont maintenant sur le marché pour le dépistage systématique du portage du streptocoque du groupe B au 8e mois de grossesse à partir d'un écouvillon. Différentes études ont montré que ces techniques étaient plus sensibles que la culture, quelle que soit la gélose utilisée.

Enfin, en cas d'infection maternofœtale à streptocoque du groupe B, la souche isolée doit être envoyée au CNR des Streptocoques afin que celui-ci recherche par PCR s'il s'agit du clone hypervirulent ST17 qui est responsable en France d'une majorité des infections maternofœtales.

## *Marqueurs épidémiologiques*

En épidémiologie, une méthode n'est utilisable que si elle permet de typer le plus grand nombre de souches, de distinguer deux souches non reliées épidémiologiquement, et que si elle est reproductible.

Les systèmes de typage peuvent être classés en deux grandes catégories : les techniques phénotypiques (qui détectent des caractères exprimés par les micro-organismes) et les techniques génotypiques (qui se fondent uniquement sur des caractères de l'ADN chromosomique ou extrachromosomique).

### Techniques phénotypiques

Les techniques phénotypiques sont les plus anciennes et, pour l'étude des streptocoques, seule la sérotypie est encore utilisée pour le typage des streptocoques du groupe A et du groupe B, de *S. pneumoniae* et de certains streptocoques oraux. La sérotypie est fondée sur la présence ou l'absence de déterminants antigéniques somatiques ou capsulaires et de leur réaction avec des antisérums spécifiques.

La diversité antigénique de la capsule polysaccharidique des streptocoques du groupe B a permis la description de neuf sérotypes différents : Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII et VIII. Les sérotypes Ia, II, III et V prédominent en Europe et aux États-Unis. Dans le cadre des infections maternofœtales, le sérotype III est le plus souvent rencontré. Ce sérotypage est réalisé en routine à l'aide de particules de latex sensibilisées, Pastorex® Strepto BI, BII, BIII de Bio-Rad.

Quant aux pneumocoques, la diversité capsulaire a permis de définir plus de 90 sérotypes différents. Les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 22F et 23F prédominent chez les adultes, alors que chez les enfants ce sont les 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F et 23 F. L'étude de la prévalence des sérotypes dans la population a permis de définir la composition des vaccins : le vaccin polysaccharidique 23-valent contenant tous les sérotypes prédominants chez l'adulte et le vaccin heptavalent conjugué réservé aux enfants, contenant les sérotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F. Depuis peu, un nouveau vaccin conjugué avec 13 valences est commercialisé avec, comme valences supplémentaires par rapport à l'heptavalent, les sérotypes 1, 3, 5, 6A, 7F et 19A.

La sérotypie peut être réalisée à l'aide des sérums (pools et monovalents) produits par le Statens Serum Institute de Copenhague, par gonflement capsulaire ou, mieux, par contre-immunoélectrophorèse (en dehors des types 7 et 14 non chargés électriquement), voire par agglutination de particules de latex (latex pools et monovalents). Depuis quelques années, différentes études montrent la possibilité et l'intérêt d'utiliser la biologie moléculaire pour déterminer le sérotype des souches. Ce sérotypage est intéressant sur le plan épidémiologique et du fait de la fréquente association des souches de sensibilité diminuée aux β-lactamines avec certains sérotypes (6, 9V, 14, 15, 19 et 23F).

### Techniques génotypiques

Du fait des limites rencontrées dans le typage, des systèmes génotypiques ont été introduits en utilisant la biologie moléculaire. Pour la comparaison de souches de streptocoques et d'entérocoques, les principales techniques sont :

- la **ribotypie** qui consiste à déterminer le profil d'hybridation des ARN ribosomiques des souches ;
- la ***random amplified polymorphic*** DNA (RAPD) qui consiste à amplifier arbitrairement des séquences et

à comparer ensuite les différents profils obtenus par électrophorèse en gel d'agarose ;

- le **champ pulsé** (PFGE) qui consiste à digérer l'ADN total des souches à l'aide d'une enzyme de restriction possédant un faible nombre de sites de coupures. De grands fragments sont ainsi obtenus et séparés par une électrophorèse en gel d'agarose en champ variable. Le PFGE s'est révélé être une des méthodes les plus discriminantes ;
- la ***multilocus sequence typing*** (MLST) repose sur l'analyse de la séquence de gènes de ménage ; la combinaison des allèles des différents gènes analysés est unique pour une souche donnée (http://www.mlst.net). L'analyse d'une séquence interne d'environ 500 pb de 7 gènes sélectionnés a été adoptée par consensus par les utilisateurs et toute mutation relevée dans la séquence d'un de ces gènes définit un nouvel allèle. La MLST est une des dernières techniques décrites et semble être la plus discriminante et la plus reproductible d'un laboratoire à l'autre. Malheureusement, elle est très lourde pour un laboratoire de routine et, de ce fait, elle est réalisée seulement dans des laboratoires spécialisés.

Pour les streptocoques du groupe A, le typage de la protéine M par séquençage de la partie variable 5' du gène *emm* reste la méthode de référence. Ce typage peut être réalisé par le CNR des Streptocoques. De plus, certaines souches produisent des toxines ou superantigènes, SpeA, SpeC, SpeD, SpeF, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeL, SpeM, SSA et SMEZ. La recherche des gènes codant ces superantigènes par amplifications spécifiques peut aussi contribuer à la caractérisation des souches de streptocoques du groupe A.

La famille des *Streptococcaceae* est extrêmement vaste, et la classification des genres et des espèces est complexe et fluctuante. Malgré ces difficultés, la recherche et l'identification des streptocoques-entérocoques et apparentés font partie du quotidien des laboratoires (fig. 32.25) et tout biologiste doit arriver à diagnostiquer pneumocoques, streptocoques β-hémolytiques, streptocoques oraux et entérocoques en allant plus ou moins loin, selon le tableau clinique et la compétence du laboratoire. La fréquence de ces infections et la gravité de certaines d'entre elles (méningites, septicémies, endocardites, cellulites, etc.) font tout l'intérêt de cette famille.

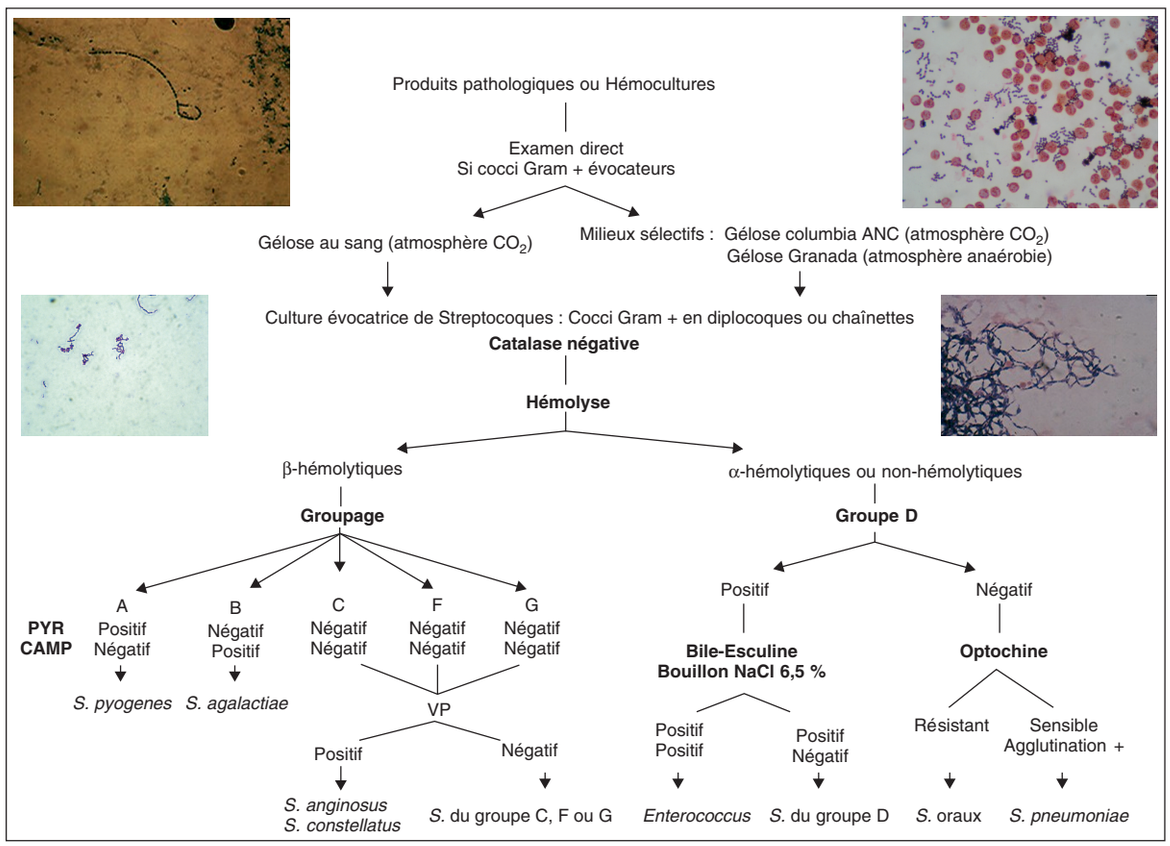



Fig. 32.25. – *Démarche diagnostique d'une infection à streptocoque.*

## SAVOIR PLUS


Bouvet A, Schlegel L, Loubinoux J. *Streptococcaceae : Streptococcus, Abiotrophia, Granulicatella, Enterococcus* et autres genres apparentés. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA/ Alexandre Lacassagne ; 2007. p. 845–97.

Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 2378–84.

Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Antibiogramme. 2e Paris : ESKA ; 2006.

Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 5857–60.

Enright MC, Knox K, Griffiths D, Crook DWM, Spratt BG. Molecular typing of bacteria directly from cerebrospinal fluid. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000 ; 19 : 627–30.

Gauduchon V, Chalabreysse L, Étienne J, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 763–6.

Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 41–7.

Poyart C, Quesne G, Trieu-Cuot P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 415–8.

Regnault B, Grimont F, Grimont PAD. Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture. Res Microbiol 1997 ; 148 : 649–59.

Salo P, Örtqvist A, Leinonen M. Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. J Infect Dis 1995 ; 171 : 479–82.

Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC : ASM Press ; 2007. p. 412–29.

Teixera LM, Carvalho MGS, Facklam RR. *Enterococcus*. In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC : ASM Press ; 2007. p. 430–42.

Thierry J, Perrier-Gros-Claude JD, Ros A. *Streptococcus pneumoniae*. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA–Alexandre Lacassagne ; 2007. p. 899–909.

Welsh J, Mclelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1992 ; 18 : 7213–8.


## ADRESSES UTILES

**Centre national de référence des Pneumocoques**
Laboratoire de microbiologie, Hôpital européen Georges Pompidou
20, rue Leblanc
75 908 Paris cedex 15
E-mail : Emmanuelle.Varon@hop.egp.ap-hop-paris.fr

**Statens Serum Institute**
5 Artillerivej
2300 Copenhague (Danemark)

**Centre national de référence des Streptocoques**
Groupe hospitalier Cochin-SVP, Service de bactériologie
27, rue du Faubourg-Saint-Jacques
75679 Paris cedex 14
E-mail : secretariat.bacterio@cch.aphp.fr

**Laboratoire associé Entérocoques et résistances particulières des streptocoques**
CHU de Caen
Laboratoire de bactériologie
Avenue de la Côte-de-Nacre
14033 Caen cedex

CHAPITRE

# 33 Cocci à Gram négatif

F. Garnier, M.-C. Ploy, F. Denis

Les cocci à Gram négatif aérobies pathogènes pour l'homme se regroupent en deux genres : *Neisseria* et *Branhamella*.

Ce sont des cocci à Gram négatif « en grains de café », aérobies stricts, oxydase positif, catalase positif.

Les deux principales espèces de *Neisseria* pathogènes sont *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Il existe cependant des porteurs sains de *N. meningitidis,* mais ce n'est pas le cas pour *N. gonorrhoeae*. Les autres espèces de *Neisseria* sont pour la plupart des commensales de l'homme ou des animaux, mais peuvent devenir des pathogènes opportunistes.

*Branhamella catarrhalis* est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures, mais peut être responsable d'infections, notamment respiratoires.

La taxonomie de la famille des *Neisseriaceae* a beaucoup évolué au cours du temps et comprend de nombreux genres en plus de celui des *Neisseria*. *Branhamella catarrhalis* appartient à la famille de *Branhamaceae*.

## Habitat, pouvoir pathogène

Parmi les *Neisseria* pathogènes, à côté de *N. meningitidis* et de *N. gonorrhoeae*, on retrouve le plus souvent *N. lactamica* et *N. polysaccharеae*.

Le réservoir de *N. meningitidis* (méningocoque) est spécifiquement humain. Il existe en effet 5 à 10 % de porteurs sains au niveau de la paroi postérieure du rhinopharynx. Le taux de colonisation peut même atteindre 40 % des sujets dans certains cas de promiscuité.

Le portage peut être transitoire, intermittent ou persistant (5 à 6 mois). La transmission interhumaine du méningocoque se fait par voie aérienne (gouttelettes de Pflügge).

L'infection méningococcique se développe à partir du nasopharynx où la bactérie vit à l'état commensal. La bactérie peut rester au niveau nasopharyngé, mais elle peut aussi franchir la muqueuse, passer dans le sang (bactériémie), et bien souvent franchit ensuite la barrière hématoméningée. L'incubation est de 3 à 10 jours.

Les conditions de pathogénicité sont mal connues. Le passage d'un état commensal à l'état pathogène est probablement le résultat de différents facteurs dont la spécificité d'hôte (déficits en complément, etc.) et la virulence de la souche. Une infection virale respiratoire constitue un facteur favorisant l'infection méningococcique (grippe notamment).

Le méningocoque peut être à l'origine de différentes manifestations cliniques :

- méningite cérébrospinale : le méningocoque a franchi la barrière hématoméningée après un passage dans la circulation générale ;
- purpura fulminans (fig. 33.1*)* : il s'agit d'un choc septique d'apparition brutale, d'évolution rapide et très sévère. Le patient présente des lésions purpuriques qui peuvent être discrètes ou très nombreuses. Les purpura fulminans sont plus fréquents avec le sérogroupe C qu'avec le sérogroupe B. Le pronostic du purpura fulminans est amélioré avec la précocité du traitement antibiotique ;
- d'autres formes cliniques moins fréquentes ont été décrites : infections pulmonaires, ostéomyélites, arthrites, cellulites, péricardites, péritonites, endophtalmies. Plus rarement, des infections génitales ont été rapportées chez l'homme et la femme, probablement consécutives à des pratiques orogénitales ;

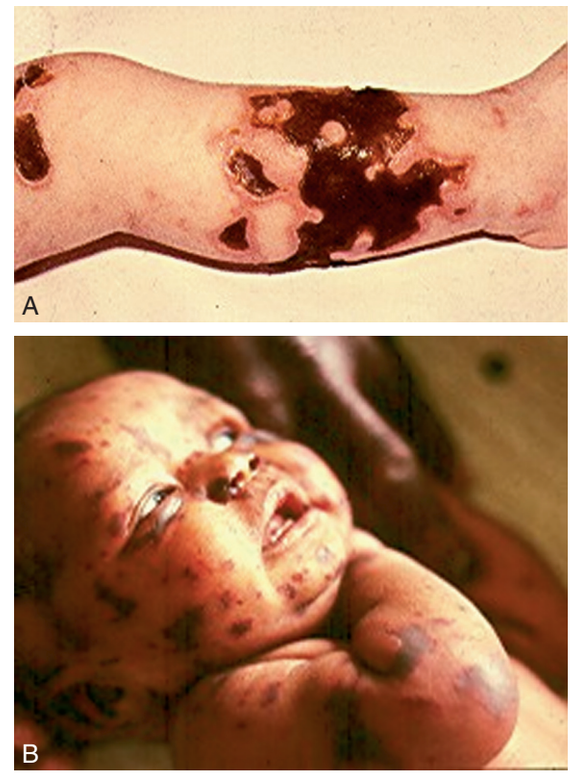



**Fig. 33.1.** – *Nécrose tissulaire extensive (A) et purpura fulminans (B).*

- exceptionnellement, il peut y avoir des infections chroniques à méningocoque accompagnées de faibles bactériémies.

La mortalité globale est de l'ordre de 11 % ; elle est 4 fois plus élevée en présence de purpura.

En France, les infections invasives à méningocoque sont des maladies à déclaration obligatoire. Celle-ci peut être effectuée par le clinicien ou le biologiste. Les critères de déclaration sont définis dans la circulaire de la Direction générale de la santé (n° DGS/5C/2006/458 du 23 octobre 2006 relative à la prophylaxie des infections invasives à méningocoque).

Ces critères de déclaration sont (au moins 1 des 4 critères suffit) :

- isolement bactériologique de méningocoques ou PCR positive à partir d'un site normalement stérile (LCR, sang, etc.) ou à partir d'une lésion cutanée purpurique ;
- diplocoques à Gram négatif à l'examen direct microscopique du LCR (fig. 33.2) ;
- LCR évocateur de méningite purulente (à l'exclusion de l'isolement d'une autre bactérie) *et* soit présence d'éléments purpuriques cutanés quel que soit leur type, soit présence d'antigènes solubles méningococciques dans le LCR, le sérum ou les urines ;
- présence d'un purpura fulminans.

Les méningocoques circulent continuellement dans la population à l'état de portage, et sont à l'origine de cas sporadiques de méningites dus à des sérogroupes variés, avec toutefois une prédominance des sérogroupes B, C, Y et W135 dans les pays industrialisés. En France, en 2009, il y a eu 628 infections méningococciques invasives déclarées. La répartition des sérogroupes (culture + PCR) était la suivante : A : 0 %, B : 72 %, C : 22 %, Y : 3 %, W135 : 3 %. Quand plusieurs cas ont été observés dans un intervalle de moins de 3 mois, on parle alors de cas groupés. En Afrique subsaharienne en revanche, les infections à méningocoque évoluent sur un mode endémo-épidémique avec des bouffées épidémiques régulières en saison sèche, dues surtout aux sérogroupes A et W135.

En 2009, le taux d'incidence en France, corrigé pour la sous-notification, était de 1,1 pour $10^5$. Les taux d'incidence les plus élevés ont été observés chez les enfants de moins de 1 an (11,4/$10^5$) et les 12–18 ans (3,5/$10^5$ à 18 ans).

Depuis 2003, il existe une situation hyperendémique d'infections invasives à méningocoque de sérogroupe B en Seine-Maritime avec une incidence de 4/100 000 habitants, avec un purpura fulminans dans 32,7 % des cas. Cette hyperendémicité est surtout marquée dans la zone de Dieppe ; elle est due à une souche de sérogroupe B appartenant au complexe clonal ST2.

*N. gonorrhoeae* (gonocoque) est un pathogène obligatoire, responsable de blennorragie. Chez l'homme, les manifestations cliniques sont à type d'urétrite avec dysurie douloureuse et écoulement purulent au niveau du méat urétral (fig. 33.3). Chez la femme, il s'agit d'une infection endocervicale avec urétrite concomitante dans 70 à 90 % des cas. Cliniquement, on retrouve des leucorrhées parfois sanglantes et plus rarement des douleurs abdominales. La durée d'incubation est de 2 à 7 jours chez l'homme et de 8 à 10 jours chez la femme. La transmission se fait par voie sexuelle. La gonococcie de la femme enceinte peut être responsable d'avortement spontané, de chorioamniotite ou de rupture prématurée des membranes. Le gonocoque peut aussi être responsable d'infections ascendantes : salpingites, endométrites, abcès ovariens (10 à 20 % des cas). Ces infections peuvent avoir des conséquences graves : stérilité ou grossesses extra-utérines à répétition. Le nouveau-né peut aussi s'infecter lors du passage dans la filière génitale maternelle et développer une conjonctivite (fig. 33.4).

Le gonocoque peut aussi être responsable d'infections anorectales et pharyngées ; ces dernières sont souvent asymptomatiques. Dans de très rares cas (1 à 3 %), l'infection peut être disséminée et bactériémique. Les infections disséminées sont de moins en moins fréquentes (1 à 3 % des malades). Elles se manifestent le plus souvent par des polyarthralgies associées à une dermatite. Sans traitement, cela peut évoluer vers une ou plusieurs arthrites septiques pouvant toucher toutes les articulations. Ces manifestations disséminées peuvent s'accompagner d'endocardites ou de méningites.

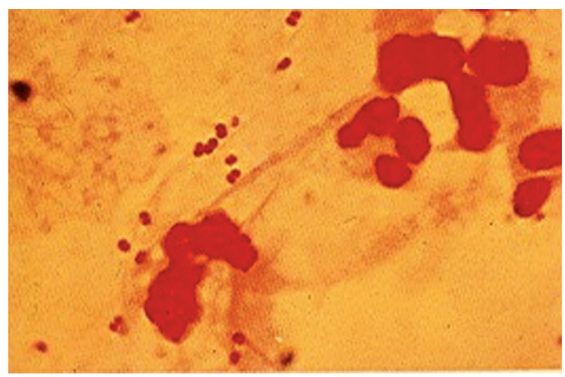


**Fig. 33.2.** – *Examen direct après coloration de Gram à partir d'un LCR : présence de polynucléaires et de diplocoques à Gram négatif (méningite à méningocoque) × 1000.*

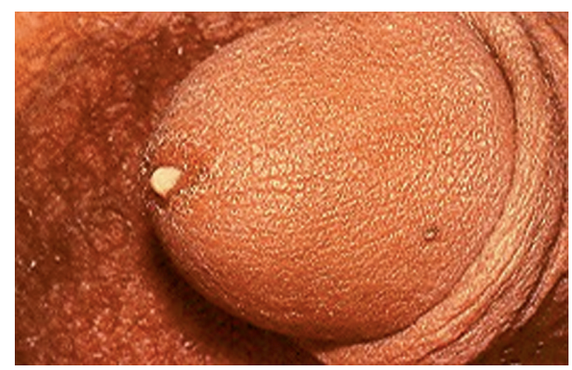


**Fig. 33.3.** – *Écoulement purulent au niveau du méat urétral, évocateur d'une urétrite gonococcique.*

Fig. 33.4. – *Dépistage de conjonctivite à gonocoque chez le nouveau-né.*

Les infections à gonocoque en France sont répertoriées par l'Institut national de veille sanitaire à travers le réseau Renago. Le nombre de souches isolées annuellement est de plusieurs centaines (417 en 2003). Cette infection sexuellement transmissible aurait progressé de 52 % entre 2008 et 2009, et touche annuellement 15 à 20 000 hommes ; les fréquences des formes asymptomatiques chez les femmes rendent difficiles les estimations.

Les autres espèces de *Neisseria* font partie de la flore normale du rhinopharynx et de l'appareil urogénital. Elles peuvent être considérées comme pathogènes quand elles sont isolées d'un site normalement stérile, de prélèvements bronchopulmonaires protégés par exemple. À noter que le portage de *N. lactamica*, qui est un commensal du rhinopharynx, entraîne la production d'anticorps protecteurs contre l'infection à méningocoque. Certaines autres *Neisseria* ont été impliquées dans des septicémies, des méningites, des endocardites, des bartholinites, des ostéites, ou encore des endophtalmies.

*B. catarrhalis* est un hôte des voies respiratoires supérieures et n'a été considéré pendant longtemps que comme un commensal. Cependant, *B. catarrhalis* a été isolé de pus d'otites, de sinusites, de bronchites et de pneumonies. Les infections des voies respiratoires supérieures sont plus fréquentes chez l'enfant et celles des voies inférieures chez l'adulte, surtout chez les personnes âgées et les immunodéprimés. D'autres atteintes ont été décrites, mais sont plus rares (endocardites, septicémies, méningites, infections oculaires, péritonites chez les dialysés, arthrites septiques, etc.).

## Diagnostic bactériologique direct

### Prélèvements

Pour le diagnostic des infections à méningocoque, les prélèvements seront : liquide céphalorachidien (LCR), hémocultures, lésions purpuriques et sang total et/ou sérum pour une recherche spécifique par PCR. Les lésions purpuriques sont prélevées en injectant une petite quantité de sérum physiologique avec une seringue intradermique ou en écouvillonnant les lésions après scarification. Le prélèvement du nasopharynx est discuté, le méningocoque pouvant être un commensal (tableau 33.1). D'autres prélèvements peuvent être effectués : liquides péritonéaux, oculaires (notamment chez les nouveaux-nés), articulaires, etc.

Afin de poser le diagnostic d'infection invasive à méningocoque en cas de décès précoce, des prélèvements post mortem peuvent être effectués plusieurs heures après le décès (lésions purpuriques, nasopharynx, ponction intracardiaque, etc.), avec de bonnes chances de mettre le méningocoque en évidence, en culture ou par PCR.

Pour la recherche de gonocoque, les prélèvements sont variés. Les prélèvements à l'écouvillon emploieront des modèles en Dacron®. Chez la femme, le gonocoque peut être recherché au niveau du col utérin (prélèvement d'endocol), des glandes de Bartholin, mais aussi en peropératoire au niveau des trompes et de l'endomètre. Chez les jeunes filles prépubères, la recherche peut se faire au niveau vaginal. Dans les deux sexes, le gonocoque peut être recherché au niveau urétral. D'autres prélèvements peuvent aussi être effectués : nasopharynx, anorectaux, liquides articulaires, lésions cutanées, oculaires, prélèvements gastriques du nouveau-né, etc., mais la présence du gonocoque dans des hémocultures est également possible.

Pour *B. catarrhalis*, les prélèvements seront pratiqués en fonction de la pathologie. Le plus souvent, il s'agira de prélèvements bronchopulmonaires, de préférence protégés, de pus de sinus ou d'oreille.

### Transport et stockage

Le méningocoque et le gonocoque sont des germes fragiles, sensibles aux variations de température, à la dessiccation et ne persistant pas dans l'environnement. De plus, ils présentent une autolyse spontanée. Les prélèvements devront être acheminés immédiatement au laboratoire en les protégeant des températures extrêmes, surtout basses. En cas de délai d'acheminement trop long, des milieux de transport pourront être utilisés, notamment pour le gonocoque et le méningocoque.

### Manipulation

L'ensemencement au laboratoire devra être immédiat, de préférence sur des milieux préchauffés à 37°C.

Les manipulations ont lieu dans un poste de sécurité microbiologique à l'aide du matériel stérile adapté. De plus, lors de la réalisation de réactions d'agglutination sur lame, des gants, un masque et des lunettes de protection doivent être portés par le manipulateur.

Les différentes approches diagnostiques sont résumées dans le tableau 33.1.

### Examen direct

En cas de suspicion d'infection invasive à méningocoque, l'examen direct des prélèvements de LCR, des lésions

**TABLEAU 33-1**

**Prélèvements et diagnostic bactériologique des infections invasives à *Neisseria meningitidis*.**

| | *LCR* | *Hémocultures* | *Pétéchies* | *Gorge* | *Sang total sérum* |
|---|---|---|---|---|---|
| Examen direct | +++ | – | ± | – | – |
| Culture | +++ | +++ | ++ | +* | – |
| Recherche Ag de groupe – Agglutination latex (ABCW135XY) | ++ si germes à l'examen direct | + si positives à cocci à Gram négatif en grain de café | – | – | – |
| Recherche génome *Polymerase chain reaction* | +++ | + si positives à cocci à Gram négatif en grain de café | ++ | +* | +++ |

* Sans intérêt, sauf si recherche Ag ou génome + et culture – sur LCR et/ou hémoculture.

purpuriques, doit être réalisé en urgence. L'absence de leucocytes dans le LCR ne doit pas faire écarter une méningite et l'examen direct après coloration de Gram doit être effectué systématiquement, surtout si le clinicien signale une situation grave ; il faut signaler le fait que, dans les méningites cérébrospinales, le LCR est souvent paucimicrobien et l'examen direct doit être très attentif. Un examen direct sera aussi pratiqué sur tout site où le méningocoque n'est pas habituellement commensal. Dans le cas du gonocoque, les examens directs des prélèvements génitaux ou liquides articulaires devront être pratiqués.

Les *Neisseria* sont des cocci à Gram négatif en diplocoques avec fréquemment un aspect caractéristique en « grains de café », mais ils peuvent aussi se présenter en tétrades (voir fig. 33.2 et fig. 33.5). Les *Neisseria* résistent parfois à la décoloration. Les gonocoques et les méningocoques sont souvent intracellulaires. Certaines *Neisseria* présentent un aspect bacillaire, notamment *N. elongata* (surtout après traitement par la pénicilline) ainsi que l'espèce récemment décrite : *N. bacilliformis*.

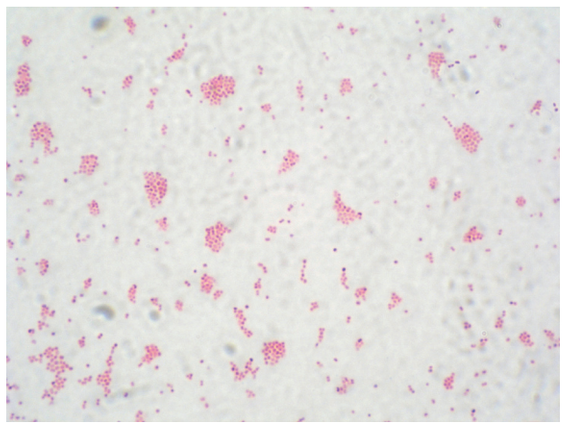


**Fig. 33.5.** – *Examen direct après coloration de Gram de* Neisseria meningitidis.

Le diagnostic différentiel est parfois difficile avec les bactéries des genres *Moraxella* et *Acinetobacter* qui peuvent apparaître comme des cocci à Gram négatif. On peut alors effectuer une coloration de Gram sur les bactéries isolées à la périphérie de la zone d'inhibition autour d'un disque de pénicilline. Les *Moraxella* et *Acinetobacter* prendront alors un aspect filamenteux ou en massue, alors que les *Neisseria* ou *Branhamella* resteront sphériques.

## Milieux de culture

Les gonocoques sont des germes fragiles nécessitant une culture sur milieux riches et la présence de $CO_2$.

Les autres *Neisseria* et *Branhamella*, y compris *N. meningitidis*, ne sont pas aussi exigeants et peuvent être cultivés à 37 °C sans $CO_2$ sur gélose au sang ou Mueller-Hinton. Cependant, une atmosphère enrichie en $CO_2$ est recommandée, notamment pour la primoculture car elle favorise la croissance en 24 heures. Afin d'éviter des contaminations du personnel, les prélèvements seront manipulés sous hotte à flux laminaire.

Seront ensemencés au minimum :

- une gélose « chocolat » au sang cuit additionnée d'un supplément vitaminique ;
- une gélose au sang.

Pour le cas des sites potentiellement plurimicrobiens, on pourra ensemencer une gélose sélective pour l'isolement du méningocoque et du gonocoque. Il s'agit d'une gélose « chocolat » avec supplément vitaminique, additionnée de vancomycine, de colimycine, de triméthoprime et d'un agent antifongique. Cependant, certaines *Neisseria* commensales (*N. lactamica* et *N. polysaccharea*e) peuvent pousser sur ces milieux, de même que des espèces *Shigella* et *Kingella* et certaines souches de *B. catarrhalis*.

Certaines souches de gonocoque peuvent être inhibées par la vancomycine et le triméthoprime et ne pas pousser

sur ces milieux ; aussi doit-on utiliser en parallèle pour les prélèvements génitaux le même milieu sans inhibiteurs.

Les *Neisseria* et *Branhamella* sont des cocci à Gram négatif, immobiles, aérobies stricts et oxydase positif.

Les colonies de méningocoque mesurent de 1 à 2 mm, en 18 à 24 heures, à 37 °C et présentent des bords réguliers. Elles sont blanches, grisâtres, plus ou moins muqueuses. Les colonies de gonocoques apparaissent au bout de 24 à 48 heures, avec plusieurs morphologies évoquant une culture polymicrobienne avec des tailles variables et un bord irrégulier. *Branhamella catarrhalis* apparaît sous forme de colonies blanches à bord net, caractérisées par le fait que les colonies glissent sur la gélose quand on essaie de les prélever (comme un palet de hockey).

Les autres colonies de *Neisseria* sont lisses ou rugueuses, souvent pigmentées en jaune. S'il y a une suspicion de gonocoque ou de méningocoque, les colonies peuvent être repiquées sur milieu sélectif à condition de prélever des colonies issues d'une culture jeune (18 à 24 heures) pour éviter l'autolyse.

## Diagnostic d'espèce

La catalase est positive sauf pour *N. elongata*.

Certains caractères biochimiques sont spécifiques d'espèce :

- hydrolyse de la tributyrine et production d'une DNAse pour *B. catarrhalis* ;
- hydrolyse de l'ONPG pour *N. lactamica* ;
- présence d'une gamma-glutamyl transférase (γGT) pour *N. meningitidis* et les *Neisseria* commensales *N. sicca, N. subflava, N. flava, N. macacae*.

Les souches de gonocoque et de méningocoque sont glucose positives mais se différencient par l'acidification du maltose et la présence de γGT, deux caractères positifs pour le méningocoque mais négatifs pour le gonocoque.

Le tableau 33.2 résume les caractères biochimiques des différentes espèces.

Différentes galeries peuvent être utilisées, comme l'API NH® de bioMérieux (résultat en 2 heures), la galerie Vitek NH® de bioMérieux (résultat en 6 à 8 heures) ou la galerie Neisseria 4H® de Sanofi Pasteur (résultat en 4 heures). Toutes ces galeries sont ensemencées avec des inoculums lourds.

Il faut noter que des souches de méningocoque déficientes (glucose et/ou maltose) ont été décrites.

## Typages immunologiques et génétiques de N. meningitidis

*N. meningitidis* est une espèce bactérienne hautement variable génétiquement, du fait de sa compétence naturelle à la transformation. Des échanges horizontaux d'ADN entre les différentes souches de méningocoques et entre différentes *Neisseria* sont à l'origine de la structure en mosaïque qui caractérise beaucoup de gènes chez le méningocoque. L'utilisation de techniques de typages génétiques permet de suivre et de surveiller l'épidémiologie des infections méningococciques. Le principe de toutes ces techniques est d'analyser le polymorphisme de plusieurs loci chromosomiques. Les souches sont soumises à la caractérisation de certains constituants de la structure identifiés à l'aide de techniques historiquement immunologiques et de plus en plus génomiques (fig. 33.6). Certaines de ces techniques sont réalisables par les laboratoires de bactériologie classiques (sérogroupes voire certains typages génétiques), d'autres seulement par le Centre national de référence (CNR). Les souches de méningocoques isolées des porteurs asymptomatiques sont très hétérogènes, alors que les souches invasives se regroupent de manière plus évidente selon des profils génétiques particuliers définissant des complexes clonaux.

Les souches peuvent être caractérisées par une formule fruit des différents typages, avec un exemple de *N. meningitidis* (fig. 33.7).

### Détermination du sérogroupe

Le méningocoque a la particularité de posséder une capsule polysaccharidique qui a des propriétés antigéniques permettant de classer les souches de méningocoque en 12 sérogroupes : A, B, C, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K, L.

Il est possible d'identifier le sérogroupe soit par agglutination d'une suspension bactérienne en présence d'antisérums (vendus par différents fabricants), soit à l'aide de particules de latex sensibilisées avec des antisérums. Il est préférable de réaliser l'agglutination à partir de colonies de 18 à 24 heures sur milieu de Mueller-Hinton qui permet un bon développement du polyoside capsulaire. Les réactions peuvent être difficiles à lire à partir de la gélose « chocolat ». Si l'identification du sérogroupe est difficile, on peut refaire le test après avoir chauffé une suspension bactérienne dense réalisée en eau physiologique pendant 30 minutes à 60 °C. Il existe des réactions croisées entre *N. meningitidis* sérogroupe B et *Escherichia coli* K1.

### Détermination de l'immunotype

L'immunotype est déterminé uniquement au niveau du CNR à l'aide d'anticorps monoclonaux.

### Détermination du sérotype

La détermination du sérotype est généralement réalisée par le CNR, soit à l'aide d'anticorps monoclonaux, soit par détermination de la séquence nucléotidique de deux régions variables, VR1 et VR2, du gène *porA* qui code PorA, une porine de type 1 qui est un constituant majeur de la membrane externe.

### Détermination du sous-type

La détermination du sous-type est aussi généralement réalisée par le CNR, soit à l'aide d'anticorps monoclonaux, soit par détermination de la séquence nucléotidique du gène *porB* qui est aussi une porine de la membrane externe.

**TABLEAU 33-2**

**Caractères différentiels des espèces du genre *Neisseria*.**

| *Espèces* | *Morphologie bactérienne* | *Fréquence d'isolement* | *Croissance milieu sélectif* | *Pigment* | *Acidification* | | | | | *γGT* | *Synthèse de polysaccharides* | $NO_3^-$ | $NO_2^-$ | *DNase* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | *GLU* | *MAL* | *LEV* | *SAC* | *LAC* | | | | | |
| Groupe I | | | | | | | | | | | | | | |
| *N. gonorrhoeae* | C | F | + | G | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| *N. meningitidis* | C | F | + | G | + | + | – | – | – | + | – | – | ± | – |
| *N. lactamica* | C | F | + | (+)J | + | + | – | – | + | – | – | – | + | – |
| *N. polysaccharеae* | C | F | + | (+)J | + | + | – | ± | – | – | + | – | + | – |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| Groupe II | | | | | | | | | | | | | | |
| *N. subflava* | C | F | – | +J | + | + | – | – | – | + | – | – | + | – |
| *N. flava* | C | F | – | +J | + | + | + | – | – | + | – | – | + | – |
| *N. perflava* | C | F | – | ±J | + | + | + | + | – | ± | + | – | + | – |
| *N. sicca* | C | F | – | ±J | + | + | + | + | – | + | + | – | + | – |
| *N. mucosa* | C | F | – | ±J | + | + | + | + | – | + | + | + | + | – |
| *N. cinerea* | C | AF | – | (+)J | – | – | – | – | – | – | – | – | + | – |
| *Neisseria* exceptionnelles | | | | | | | | | | | | | | |
| *N. canis* | C | R | – | (+)J | ± | – | – | – | – | – | – | + | – | – |
| *N. denitrificans* | C | E | – | G | + | – | + | + | – | – | + | – | + | – |
| *N. flavescens* | C | E | – | +++J | – | – | – | – | – | ± | + | – | + | – |
| *N. macacae* | C | E | – | G | + | + | + | + | – | + | + | – | + | – |
| *N. elongata* | B | R | – | O | ± | – | – | – | – | – | – | – | + | – |
| *B. catarrhalis* | B | F | –* | – | – | – | – | – | – | – | – | + | + | + |

GLU : glucose ; MAL : maltose ; LEV : lévulose ; SAC : saccharose ; LAC : lactose ; γGT : gamma-glutamyltransférase.
C : coques ; B : bâtonnets ; F : fréquent ; AF : assez fréquent ; R : rare ; E : exceptionnel ; G : grisâtre ; J : jaune.
Toutes les espèces décrites dans ce tableau sont tributyrinase et désoxyribonucléase négatives.
* +10 % ; (+) : faible ; ± : certaines souches négatives, d'autres positives.

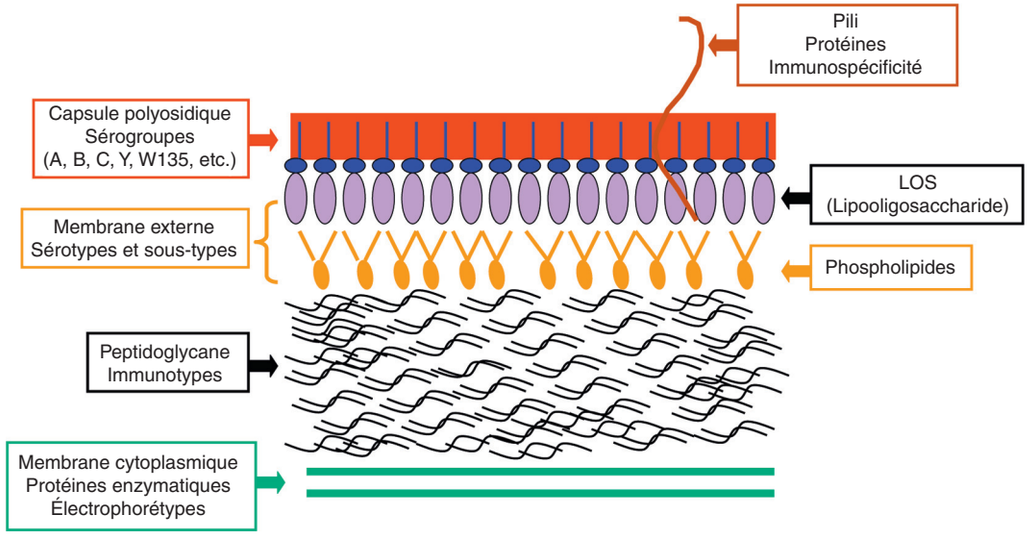



**Fig. 33.6.** – *Paroi de* N. meningitidis *et marqueurs épidémiologiques (adapté d'E. Bingen).*

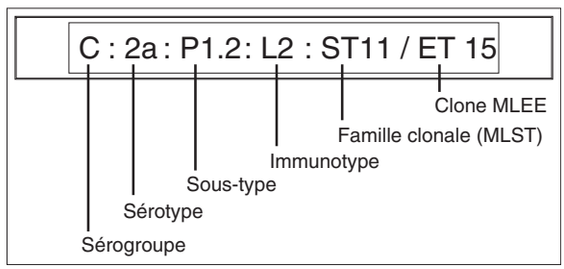



**Fig. 33.7.** – *Exemple de caractérisation complète d'une souche de* N. meningitidis *groupe C.*
MLEE : multilocus enzyme electrophoretype; MLST : multilocus sequence typing.

### *Détermination de la famille clonale et du clone MLEE*

Les souches épidémiques sont groupées dans un nombre limité de complexes clonaux. Ils sont souvent désignés par ET et/ou ST (électrotype selon la technique d'électrophorèse des iso-enzymes, ou *multilocus enzyme electropherotype* [MLEE], ou séquence type selon la technique de *multilocus sequence typing* [MLST]), respectivement. La technique MLEE consiste à analyser les variations d'enzymes métaboliques en mesurant la mobilité électrophorétique sur gel des protéines enzymatiques étudiées. Cette technique a permis la mise en évidence de complexes clonaux hyperinvasifs responsables d'infections graves. Cette technique est longue et peu comparable d'un centre à l'autre. Elle est maintenant remplacée par la MLST. Cette technique consiste à analyser une séquence de 400 à 500 paires de bases interne à sept gènes codants des protéines de ménage. Les séquences obtenues sont alors transférées sur le site http : //pubmlst.org/neisseria/ qui leur donne un numéro d'allèle. Les sept allèles alors obtenus pour une souche donnent la séquence type (ST) de la souche. Différentes souches peuvent ainsi être comparées grâce à leur ST. En Europe, on trouve essentiellement des souches du complexe ET-5/ST32 ou du lignage III/ST41-44 (qui comportent en majorité des souches de sérogroupe B), des souches appartenant au complexe ET-37/ST11 (majoritairement des souches de sérogroupe C et du sérogroupe W135). En France, au sein du groupe B, on a observé en 2009 la baisse des souches du complexe ST-32 qui sévissait en Seine-Maritime, mais l'émergence du complexe ST-269, en particulier dans les Landes.

Les souches de méningocoque isolées dans des infections invasives méningococciques et les souches de gonocoque doivent être envoyées aux CNR respectifs en charge de ces deux pathogènes.

Les CNR confirment l'identification des souches pour les méningocoques et les gonocoques. Pour les méningocoques, le milieu le mieux adapté pour le transfert est le milieu gélosé dit VDK décrit par Vandekerkove.

## Diagnostic sans culture

### *Recherche d'antigènes solubles*

La recherche d'antigènes solubles des principaux sérogroupes du méningocoque peut être effectuée dans le LCR et/ou le sérum. On trouve commercialisés des latex permettant la recherche des antigènes capsulaires de *N. meningitidis* : A, B et C. Il est à noter que cette recherche n'est pas très sensible et qu'en cas de faible quantité de prélèvements, il vaut mieux privilégier la détection par biologie moléculaire.

### Recherche directe du génome par biologie moléculaire

La recherche du génome de méningocoque par PCR, point final ou temps réel, permet d'identifier des cas d'infections invasives à méningocoque pour lesquelles la culture reste négative (fig. 33.8). Deux cibles sont généralement utilisées, le gène *ctrA* qui code une protéine de la membrane externe impliquée dans le transport de la capsule, ou le gène *crgA* qui code une protéine impliquée dans la régulation de l'adhésion de la bactérie aux cellules. On caractérise ainsi des séquences spécifiques de l'espèce *N. meningitidis*. Mais on peut aussi réaliser directement sur l'échantillon une identification du sérogroupe en pratiquant des PCR portant sur les gènes *siaD* pour les groupes B, C, Y, W135, ou *orf* 2, *myn A* pour le groupe A. La positivité de la PCR ne saurait préjuger de la viabilité du germe. Cette technique reste la plus performante, mais ne permet pas d'isoler la souche. Elle est soit développée localement en recourant à une technique dite « maison », soit réalisée à l'aide de kits de détection mis sur le marché par différentes firmes. Un contrôle interlaboratoire d'ADN bactérien réalisé en 2009 a montré une identification correcte de *N. meningitidis* dans 81 % des laboratoires et respectivement dans 80, 65 et 70 % des cas pour les sérogroupes A, B et C. Cette analyse peut être effectuée sur LCR, sérum ou à partir de lésions purpuriques.

Au CNR en 2008, les diagnostics de sérogroupes avaient été portés dans 487 cas sur souche et dans 143 cas par PCR.

## Sensibilité aux antibiotiques

Les *Neisseria* et *Branhamella* sont normalement sensibles à la pénicilline et aux autres β-lactamines, aux aminosides, phénicolés, macrolides, tétracyclines, quinolones, sulfamides, rifampicine. Elles sont naturellement résistantes à la vancomycine, teicoplanine et au triméthoprime.

*N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* sont résistantes à la colistine ainsi qu'aux lincosamides, de même que *B. catarrhalis*. L'étude de la sensibilité par la méthode de diffusion en milieu gélosé sera effectuée sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton, selon les recommandations du CA-SFM.

Les céphalosporines de troisième génération sont les molécules recommandées pour le traitement de première intention des **méningites à méningocoque**, les CMI de la ceftriaxone ou du céfotaxime étant très basses (0,002 à 0,008 mg/l).

Cependant, le méningocoque a su développer des résistances aux antibiotiques auxquels il est habituellement sensible. Des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline G ont été décrites (CMI ≥ 0,125 µg/l) et représentent 22 % des souches isolées d'infections invasives en 2008. Le méningocoque est une bactérie naturellement compétente et peut donc acquérir facilement et à tout moment des fragments d'ADN étranger. Ainsi, des échanges génétiques entre *N. meningitidis* et des *Neisseria* commensales naturellement résistantes à la pénicilline G ont abouti à la formation de gènes de protéines de liaison à la pénicilline (PLP) modifiés. Ces

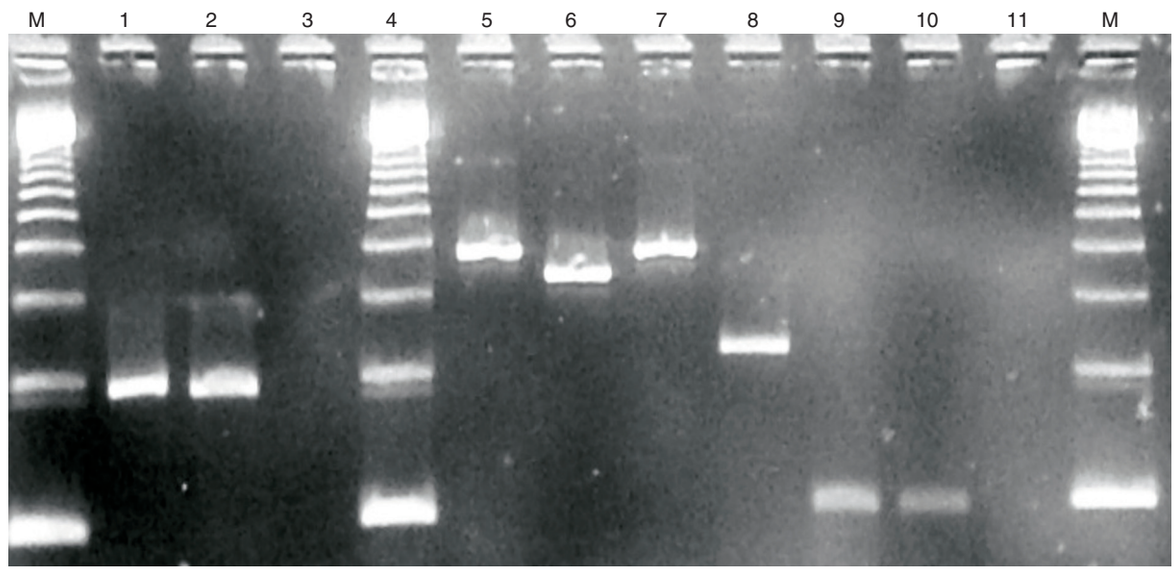



**Fig. 33.8.** – *Photographie d'une électrophorèse sur gel d'agarose de PCR pour la recherche du génome du méningocoque et la détermination du sérogroupe.*
M : marqueur de taille. Puis 1 à 3, identification du méningocoque ; 1 : patient ; 2 : témoin positif ; 3 : témoin négatif. Puis 5 à 11, détermination du sérogroupe ; 5 : patient ; 6 à 10 : témoins positifs de sérogroupes A, B, C, W135 et Y respectivement ; 11 : témoin négatif.

gènes dits « mosaïques » codent des PLP dont l'affinité pour la pénicilline G est diminuée. C'est le cas du gène *penA* qui code la PLP2.

Des souches productrices de β-lactamase plasmidique (de type TEM-1) ont été décrites chez des méningocoques mais sont exceptionnelles. La recherche d'une pénicillinase à l'aide d'un test chromogénique est cependant recommandée. Pour l'instant, en France, aucune souche de ce type n'a été décrite.

Pour dépister les souches de sensibilité diminuée, le CA-SFM recommande d'utiliser un disque d'oxacilline à 1 ou 5 µg. Si le diamètre d'inhibition est < 11 mm autour du disque d'oxacilline à 1 µg, et < 18 mm pour le disque à 5 µg, la souche est considérée comme de sensibilité diminuée à la pénicilline G et il convient de déterminer les CMI de la pénicilline G et de l'amoxicilline à l'aide d'E-tests® en respectant les recommandations du CA-SFM.

Des résistances aux autres antibiotiques ont aussi été décrites : sulfamides (> 50 % des souches résistantes), chloramphénicol, tétracyclines, macrolides (notamment spiramycine) et rifampicine. Ces deux derniers antibiotiques étaient utilisés jusqu'en 2006, uniquement en prophylaxie chez les sujets contacts. De rares souches intermédiaires ou résistantes à la rifampicine ont été décrites, avec des mutations dans le gène *rpo*B codant la sous-unité β de l'ARN polymérase. En revanche, depuis quelques années, les souches résistantes à la spiramycine sont en nette augmentation.

L'antibiogramme des méningocoques selon le CA-SFM (2010) doit tester au minimum la pénicilline G ou l'amoxicilline, le chloramphénicol, la rifampicine et la spiramycine. Cette liste standard peut être accompagnée des tests concernant le céfotaxime ou la ceftriaxone.

Les **infections à gonocoque** sont généralement traitées en dose unique. Différentes molécules peuvent être utilisées : cefixime per os, spectinomycine en intramusculaire (IM), fluoroquinolones per os, ceftriaxone IM.

Des souches de gonocoques résistantes à la pénicilline par production d'une β-lactamase plasmidique (de type TEM-1) ont été décrites et ont déjà été isolées en France. Cette résistance doit faire l'objet d'une détection par un test chromogénique.

Une résistance aux β-lactamines par mutation chromosomique a aussi été décrite et sera détectée par mesure de la CMI de la pénicilline G.

Des souches de gonocoques résistantes aux tétracyclines, fluoroquinolones, macrolides, chroramphénicol, spectinomycine ont été décrites. La résistance aux quinolones sera détectée en testant l'acide nalidixique ; si le diamètre d'inhibition est < 25 mm, les CMI de l'ofloxacine ou de la ciprofloxacine seront déterminées. L'antibiogramme des gonocoques selon le CA-SFM doit tester au moins la pénicilline, l'amoxicilline, la ceftriaxone, la spectinomycine, la tétracycline et l'acide nalidixique. Il est aussi possible de tester le chloramphénicol, l'érythromycine et la ciprofloxacine ou l'ofloxacine.

Pour *B. catarrhalis,* 90 % des souches produisent une β-lactamase qui est difficile à détecter par les techniques classiques d'antibiogramme et qui doit être recherchée par un test chromogénique. Les pénicillines et céphalosporines de 1re et 2e générations ne sont alors plus actives. Les souches résistantes aux tétracyclines sont rares, de même qu'aux macrolides, à la rifampicine et aux sulfamides.

## Prise en charge et prophylaxie des infections invasives à méningocoque

Les infections invasives à méningocoque sont une urgence thérapeutique. Selon le Conseil supérieur d'hygiène publique de France, tout malade présentant des signes infectieux et à l'examen clinique, lorsqu'il a été totalement dénudé, un purpura comportant au moins un élément nécrotique ou ecchymotique de diamètre ≥ 3 mm, doit immédiatement recevoir une première dose d'un traitement antibiotique approprié aux infections à méningocoque (céphalosporine de 3e génération le plus souvent), si possible par voie intraveineuse, sinon par voie intramusculaire, et ce quel que soit l'état hémodynamique du patient.

Dans l'entourage du patient, une prophylaxie des sujets contacts doit être réalisée afin de limiter les cas secondaires. Sont définies comme sujets contacts des personnes ayant eu des contacts répétés et rapprochés avec le patient. Cette prophylaxie repose sur :

- la chimioprophylaxie : la molécule de première intention est la rifampicine pendant 2 jours. En cas de contre-indication et/ou de résistance documentée, la ciprofloxacine per os ou la ceftriaxone par voie injectable, en dose unique, peuvent être utilisées. La spiramycine n'est plus recommandée. Cette chimioprophylaxie doit être réalisée le plus tôt possible et n'a pas d'intérêt au-delà de 10 jours après le dernier contact avec le cas ;
- la vaccination : des vaccins polysaccharidiques n'existent que pour les sérogroupes A, C, Y et W135. Il n'existe pas de vaccin polysaccharidique, mais des vaccins protéiques sont développés contre des clones particuliers pour le sérogroupe B.

Un vaccin polysaccharidique A, C, Y, W135 est resté longtemps le seul disponible.

Puis, on a disposé de vaccins conjugués, notamment pour le groupe C, le polysaccharide étant conjugué soit avec la protéine $CRM_{197}$ de *Corynebacterium diphtheriae*, soit avec de l'anatoxine tétanique ; ce vaccin conjugué C fait l'objet depuis 2010 d'une vaccination systématique pour les nourrissons de 12 à 24 mois, avec extension jusqu'à l'âge de 24 ans avec une seule dose.

Depuis 2010 également, un vaccin quadrivalent A, C, Y, W135 conjugué avec la protéine $CRM_{197}$ est aussi disponible et recommandé dès l'âge de 11 ans.

## POUR EN SAVOIR PLUS


Avis du Haut Conseil de la Santé publique relatif à la vaccination par le vaccin méningococcique conjugué de sérogroupe C. BEH 2010 ; n° 14–15 : 138–41.

Bingen E. Méningites bactériennes communautaires. Paris : Elsevier ; 2001.

Diggle MA, Clarke SC. Molecular methods for the detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. Expert Rev Mol Diagn 2006 ; 6 : 79–87.

Guide des vaccinations 2008. La vaccination contre les méningocoques www.sante.gouv.fr/index.html. www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html-X Nassif. Neisseria.

Jolley KA, Brehony C, Maiden MCJ. Molecular typing of meningococci : recommendations for target choice and nomenclature. FEMS Microbiol Rev 2007 ; 31 : 89–96.

Parent du Chatelet I, Taha MK, Lepoutre A, Deghmane AE, Maine C, Levy-Bruhl D. Les infections invasives à méningocoque en France en 2008. BEH 2009 ; 46–47 : 489–93.

Taha MK. Simultaneous approach of non culture PCR based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 855–7.

Taha MK, Alonso JM. *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2e ed Paris : ESKA ; 2007. p. 931–8.

www.pasteur.fr/sante/cire/cadrecnr/meningo-index.html.


## ADRESSES UTILES


**Centre national de référence des méningocoques**
Dr Mohamed Taha
Centre national de référence des *Neisseria*
Institut Pasteur, Unité des *Neisseria*
25–28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83 30 ou 01 40 61 31 08
E-mail : meningo@pasteur.fr.

CHAPITRE

# 34 Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies

## Chapitre 34.1

# Généralités

F. Denis, M.-C. Ploy

Les bacilles à Gram négatif sont rencontrés très fréquemment en pathologie. Dans ce groupe figurent des familles bactériennes très variées sur le plan du type respiratoire et du caractère oxydase positif ou négatif, de même que pour leur exigence de culture.

Leur habitat est varié. Certaines espèces sont strictement humaines (*Salmonella* Typhi, *Haemophilus influenzae*), d'autres humaines et animales (nombreuses salmonelles, *Escherichia coli*, etc.), voire à dominante animale, l'homme n'étant qu'un hôte accidentel (*Brucella*, *Pasteurella*, etc.) ; d'autres, enfin, ont pour réservoir principal le milieu extérieur essentiellement hydrique (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*), à l'état libre ou associé à des amibes (*Legionella*).

La transmission peut se faire, selon les espèces, par simple contact, par morsure, griffure ou piqûre, par ingestion, par inhalation, etc.

Les pathologies dues à ces bacilles sont très diverses et si certaines espèces ont une spécificité syndromique méningée (*Haemophilus influenzae* b, *Escherichia coli* K1, etc.), entérique (*Escherichia coli*, *Salmonella*, etc.), génitale (*Gardnerella*), septicémique, endocardique, etc. d'autres ont un spectre pathogène très large.

Ces pathologies peuvent être isolées ou survenir dans un contexte épidémique nécessitant parfois de véritables enquêtes policières (typhoïde, diarrhées à *Escherichia coli* entérohémorragiques, choléra, légionellose, brucellose, etc.).

Devant ces différences d'habitat, de mode de transmission, de pouvoir pathogène, mais aussi de fragilité et d'exigence nutritive, il est évident que l'on ne dispose pas de milieu ou de technique polyvalente pour les rechercher, d'autant plus que certaines espèces font partie de la flore normale de l'homme (exemple des entérobactéries). Aussi, il est nécessaire d'avoir une approche syndromique en utilisant, selon la situation, des techniques de culture plus ou moins complexes ou de détection antigénique, voire de biologie moléculaire ou même de sérologie pour relier avec une forte présomption, si ce n'est une certitude, un tableau clinique à une bactérie donnée. Ces considérations viennent renforcer la nécessité d'un dialogue clinicobiologique permanent.

## Chapitre 34.2

# *Enterobacteriaceae* (à l'exception du genre *Yersinia*)

P. Bidet, E. Bingen

## Généralités

Les *enterobacteriaceae* sont des bacilles à Gram négatif, le plus souvent courts (1 à 6 µm), droits, immobiles ou mobiles par une ciliature péritriche, de culture aisée, aéro-anaérobies facultatifs, fermentaires, oxydase négative, catalase positive, nitrate réductase positive (rares exceptions).

### Pouvoir pathogène et habitat

Il s'agit d'une très vaste famille qui représente près des trois quarts des isolements d'un laboratoire de bactériologie médicale. Ce sont pour la plupart des hôtes du tractus digestif mais certaines, telles les *Serratia*, sont rencontrées d'une manière prépondérante dans le milieu extérieur.

Les entérobactéries sont responsables de deux grands types de manifestations pathologiques : une pathologie spécifique telle la typhoïde avec *Salmonella* Typhi, ou une pathologie opportuniste, notamment dans le cadre d'infections nosocomiales.

Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella, Yersinia*. D'autre genres peuvent être isolés rarement ou exceptionnellement chez l'homme : *Cedecea, Ewingella, Erwinia, Kluyvera, Leclercia, Leminorella, Pantoea, Rahnella, Tatumella, Yokenella*.

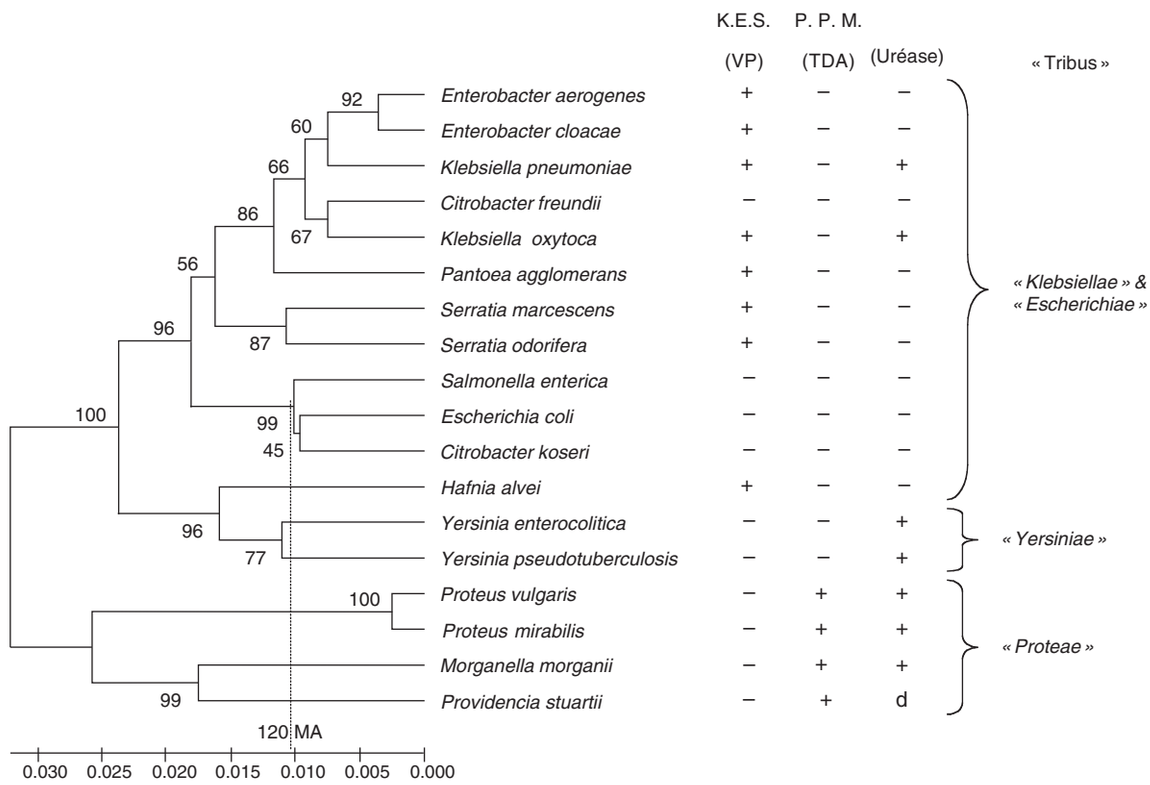
## Classification

L'ère de la génomique (hybridations ADN-ADN, gènes des ARN ribosomiques, *rpoB*, MLST, séquençage complet) a bouleversé la taxonomie des entérobactéries. De nouveaux genres tels *Hafnia* et *Pantoea* sont apparus (issus du genre *Enterobacter*). À l'opposé, des genres et des espèces ont été réduits à l'état de sous-espèces ou de sérovars.

Les souches de *Yersinia pestis* appartiennent au *genomospecies Y. pseudotuberculosis* et les souches du genre *Shigella* au *genomospecies Escherichia coli*. Cependant, du fait de leur pouvoirs pathogènes particuliers, elles ont été maintenues comme espèces à part entière. De même, l'agent de la donovanose, anciennement *Calymmatobacterium granulomatis*, bien que non cultivable sur les milieux usuels, est maintenant inclus au sein du genre *Klebsiella* (*K. granulomatis*).

La classification traditionnelle en « tribus » fondée sur quelques caractères biochimiques (VP, TDA) est actuellement caduque sur le plan taxonomique. Néanmoins, elle a le mérite d'offrir au microbiologiste un moyen pratique de s'orienter dans l'identification d'une entérobactérie. La figure 34.2.1 présente en parallèle la phylogénie des principales entérobactéries d'intérêt médical et la classification traditionnelle.

*Plesiomonas shigelloides* est maintenant considéré comme une entérobactérie proche du genre *Proteus*. Cependant, du fait de ses caractères divergents (oxydase positive, sensibilité au composé vibriostatique O/129), nous ne l'inclurons pas dans ce chapitre.




Arbre phylogénétique construit selon la méthode UPGMA à partir des séquences d'ARNr16S (1440 bases). Les valeurs de bootstraps sur 100 réplications sont indiquées à chaque nœud. Échelle de temps (MA : millions d'années) d'après : Ochman et Wilson. Evolution in bacteria : evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. J Mol Evol. 1987;26:74-86.

**Fig. 34.2.1.** – *Relation entre la phylogénie des principales entérobactéries d'intérêt médical et la classification traditionnelle en tribus.*

## Caractères bactériologiques et technologie générale

### *Caractères culturaux*

L'ensemble de ces bactéries pousse habituellement très aisément sur milieux ordinaires. La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37 °C, à l'exception des *Yersinia* (30 à 37 °C), des *Pantoea* et des *Erwinia* (27 à 30 °C), certaines ne poussant pas à 37 ° C.

Elles sont toutes aéro-anaérobies facultatives, encore que certaines *Erwinia* puissent donner une culture plus lente en anaérobiose.

L'aspect général des colonies de ces bactéries sur gélose nutritive est florissant : colonie de 1 à 3 mm de diamètre généralement bombées, lisses et brillantes. Il existe de nombreuses exceptions :

- colonies petites pour *Shigella dysenteriae, Salmonella* Typhisuis, *Yersinia* ;
- envahissement de la gélose en voile, montrant des vagues successives pour *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*.

Le plus souvent, ces colonies sont opaques et blanchâtres, mais il en est de plus transparentes telles les *Salmonella*, des pigmentées telles les *Serratia* en rouge ou les *Erwinia* en jaune.

Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes.

Enfin, des dissociations peuvent s'observer entre variants : muqueux, lisse ou *smooth* (S), rugueux ou *rough* (R).

### *Caractères biochimiques*

L'identification par des techniques issues de la biologie moléculaire n'est pas encore à la portée de tous les laboratoires. La recherche des caractères généraux de la famille et la recherche des caractères biochimiques demeurent les moyens d'identification couramment mis en œuvre.

C'est dans le domaine des *Enterobacteriaceae* que l'évolution technologique a été la plus importante en bactériologie médicale. L'ère des galeries d'identification en tubes est presque révolue en pratique quotidienne pour faire place à celle des systèmes prêts à l'emploi.

Quelques remarques doivent néanmoins être apportées quant à l'utilisation de ces systèmes prêts à l'emploi.

- le mode opératoire doit être rigoureusement suivi ;
- les caractères déterminés n'ont de signification que confrontés aux tableaux fournis par le fabricant.

Bien souvent d'ailleurs, le principe d'identification proposé est établi à partir d'une méthode probabiliste qui consiste à traduire numériquement la séquence des caractères positifs trouvés et à confronter le profil trouvé au catalogue des profils recensés par le fabricant.

Globalement, plus de 90 % des souches sont correctement identifiées d'emblée par ces systèmes prêts à l'emploi.

Les difficultés surgissent quand le profil numérique ne figure pas dans le catalogue ou conduit à une discrimination insuffisante entre plusieurs espèces ou genres.

Il faut en particulier éviter de vouloir faire « coller » le profil trouvé à un profil voisin. Il faut impérativement reprendre le problème à la base, s'assurer d'abord que la culture est pure et qu'il s'agit bien d'un bacille à Gram négatif oxydase négative.

Ces quelques vérifications simples permettent d'éliminer rapidement une partie des problèmes. Une fois celles-ci effectuées, il faudra reprendre une démarche traditionnelle :

- vérifier l'ensemble des caractères de définition de la famille en sachant que *Shigella dysenteriae* type I est catalase négative et que quelques souches, en particulier au sein des *Yersinia* et des *Erwinia*, n'ont pas de nitrate réductase ;
- placer la souche dans une des tribus constituant la famille des *Enterobacteriaceae* ;
- enfin, déterminer le genre et l'espèce au sein de ces tribus.

On pourra tenir compte pour cette démarche traditionnelle des réactions obtenues avec les systèmes prêts à l'emploi. Il sera prudent cependant d'effectuer une deuxième détermination.

Il n'existe, avec les systèmes les plus évolués, qu'un petit nombre de réactions faussement positives ou négatives par rapport aux méthodes traditionnelles. Ces erreurs ne sont pas toujours dues au système lui-même, mais à l'ensemencement ou à l'incubation ; par exemple, la réaction de Voges-Proskauer n'est parfois positive qu'à 22 °C mais toute la galerie est incubée à 37 °C ; il est de plus impératif de bien respecter le temps d'attente après ajout des réactifs, une lecture trop rapide de la galerie pouvant conclure à une réaction de Voges Proskauer faussement négative.

Toutes les réactions douteuses ainsi que toutes les réactions paraissant incompatibles avec un diagnostic probable devront être refaites par les méthodes conventionnelles. Certains caractères métaboliques peuvent être de nature plasmidique telles la production d'$H_2S$ chez *Escherichia coli*, la fermentation du lactose chez *Proteus*.

Bien que le concept de tribu soit tombé en désuétude, il constitue une approche incomplète, mais simple, de cette vaste famille. Le diagnostic des quatre tribus qui intéressent la bactériologie médicale se fait sur un nombre limité de caractères (tableau 34.2.1).

### Utilisation de milieux chromogènes

Les activités enzymatiques utilisées dans les milieux de culture chromogéniques sont habituellement :

- β-D-glucuronidase ou β-D-galactosidase : permettant la détection d'*Escherichia coli* ;
- β-D-glucosidases : spécifiques d'*Enterococcus* spp. et du groupe KES-C (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp.) ;
- tryptophane désaminase : spécifique du groupe *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*.

L'identification présomptive repose sur la coloration des colonies associée à l'examen direct par coloration de Gram complétée par un test biochimique complémentaire

**TABLEAU 34-2-1**

**Composition et caractères différentiels des tribus des *Enterobacteriaceae*.**

| | *Escherichiae* | *Klebsiellae (VP +) (groupe KES)* | *Proteae (TDA +)* | *Yersiniae* |
|---|---|---|---|---|
| Principaux genres isolés chez l'homme | *Escherichia* | *Klebsiella* | *Proteus* | *Yersinia* |
| | *Shigella* | *Raoultella* | *Providentia* | |
| | *Salmonella* | *Enterobacter* | *Morganella* | |
| | *Citrobacter* | *Cronobacter* | *Tatumella* | |
| | *Edwardsiella* | *Hafnia* | | |
| | *Kluyvera* | *Pantoea* | | |
| | *Moellerella* | *Erwinia* | | |
| | *Leclercia* | *Serratia* | | |
| | *Leminorella* | *Cedecea* | | |
| | *Yokenella* | *Rahnella* | | |
| | *Trabulsiella* | *Ewingella* | | |
| TDA | – | – | + | – |
| Uréase | – | d | d | +* |
| VP à 37 °C | – | d | –** | – |
| VP à 22 °C | – | d | d | d |
| Mobilité | Tous sauf *Shigella* (quelques souches d'*Escherichia coli* immobiles) | Tous sauf *Klebsiella* et *Raoultella* Mobilité à 22 °C pour *Pantoea*, *Rahnella* et *Erwinia* | Tous sauf *Tatumella* | Immobiles à 37 °C, mobiles à 22 °C |
| Sensibilité à la colistine | Tous sauf *Edwardsiella, Moellerella* et *Yokenella* | Tous sauf *Serratia* et *Cedecea* | Aucun sauf *Tatumella* | d |

d = différent suivant les genres ou les espèces.
* Sauf *Y. ruckeri*.
** Sauf *Tatumella*.

(indole pour *E. coli* et *Proteus*). Le non-respect strict de cette procédure expose à des erreurs d'identifications (rares souches de *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp. exprimant une activité β-glucuronidase).

## Caractères antigéniques

L'identification biochimique doit être complétée pour certains genres (*Salmonella*, *Shigella*) par la sérotypie. Celle-ci n'a de sens qu'une fois le genre ou l'espèce déterminé(e) car les communautés antigéniques interespèces et intergenres sont nombreuses. Les entérobactéries (fig. 34.2.2 et fig. 34.2.3) possèdent plusieurs types d'antigènes différents :

- antigènes O : antigène de paroi constitué de lipopolysaccharides (LPS) thermostable, perdu chez les souches R (colonies rugueuses) qui deviennent autoagglutinables en eau distillée ;
- antigène H : antigène flagellaire (bactéries mobiles) constitué de flagelline thermolabile ;
- antigène K : antigène capsulaire (*Klebsiella* et certaines souches d'*E. coli*, *Shigella, Citrobacter* et *Salmonella* « antigène Vi ») constitué de couches externes de polysaccharides qui peuvent masquer l'antigène O (une ébullition de 2 heures permet de démasquer l'antigène O chez ces souches) ;
- antigène de Kunin ou *Enterobacteriaceae common antigen* (ECA) constitué d'un glycophospholipide spécifique des entérobactéries ;
- antigènes d'adhésines (*pili*, *fimbriae*).

## Sensibilité aux antibiotiques

La résistance naturelle aux antibiotiques est aussi d'une grande aide à la démarche d'identification des *Enterobacteriaceae*. Toute divergence entre l'identifi-

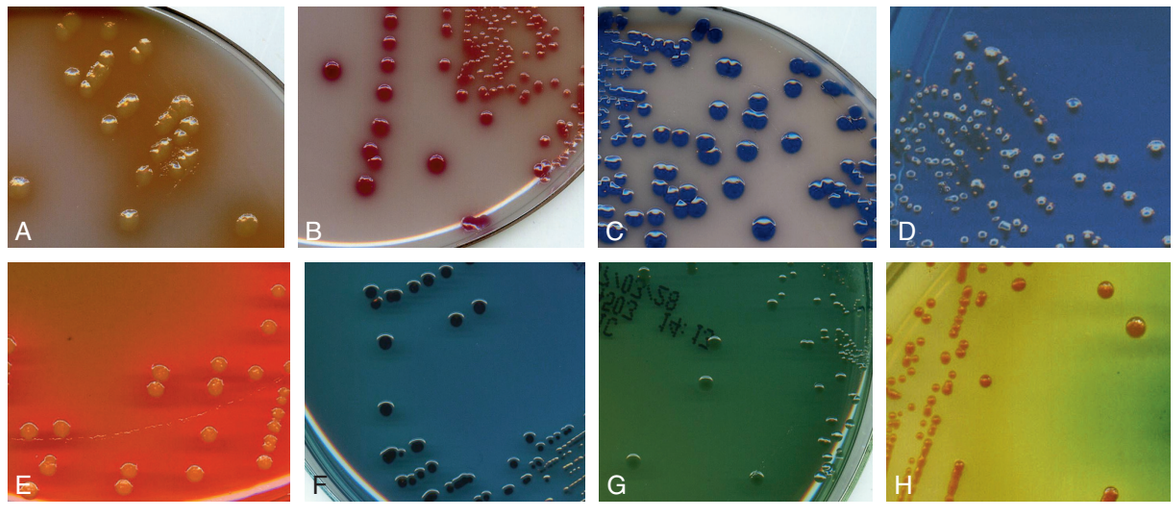



**Fig. 34.2.2.** – *Aspect des cultures des différentes espèces d'entérobactéries sur géloses spéciales.*

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Proteus mirabilis :* Gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies brunes TDA positives | *Escherichia coli :* Gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies roses β-galactosidase positives | *Klebsiella pneumoniae :* Gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies bleues β-galactosidase positives | *Citrobacter freundii :* Gélose Drigalski, colonies lactose négatives |
| *Escherichia coli :* Gélose Hektoen, colonies lactose positives | *Salmonella* Enteritidis : Gélose Hektoen, colonies lactose négatives $H_2S$ positives | *Shigella flexneri :* Gélose Hektoen, colonies lactose négatives | *Escherichia coli :* Gélose Drigalski, colonies lactose positives |

cation biochimique et le phénotype de résistance doit interpeller le biologiste et l'amener à vérifier l'identification du germe. Ainsi, les membres de la tribu des *Proteae* sont naturellement résistants aux nitrofuranes et à la colistine. Concernant la sensibilité aux β-lactamines, les entérobactéries sont classiquement divisées en 4 classes : celles qui ne produisent pas naturellement de β-lactamase comme *Salmonella* et *Proteus mirabilis* ou produisent une céphalosporinase à très bas niveau comme *Escherichia coli* et *Shigella* (classe 1) ; celles qui produisent naturellement une pénicillinase comme *Klebsiella*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermanni* (classe 2) ; celles (les plus nombreuses) qui produisent naturellement une céphalosporinase (classe 3) ; et celles qui produisent à la fois une pénicillinase et une céphalosporinase comme *Yersinia enterocolitica* (classe 4). D'autres enzymes particulières ne rentrent pas dans cette classification : céfuroximase de *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* ou β-lactamase à spectre étendue (BLSE) chromosomique de *Kluyvera*, *Rahnella*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina*.

Le tableau 34.2.2 répertorie les phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries les plus fréquentes. Cette résistance naturelle est cependant brouillée par l'acquisition de mécanismes de résistance, souvent d'origine plasmidique, comme le phénotype « pénicillinase de haut niveau » retrouvé chez près de la moitié des souches d'*Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. L'émergence des BLSE et plus récemment des céphalosporinases et carbapénemases plasmidiques a encore davantage compliqué l'utilisation du phénotype de résistance pour l'identification bactérienne.

## Spectrométrie de masse

La technique Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight (MALDI-TOF), qui utilise l'analyse des protéines bactériennes par spectrométrie de masse pour l'identification rapide d'espèce à partir de colonies, de culture en bouillon ou même de prélèvement, est actuellement en plein développement. Les études comparant la spectrométrie de masse avec l'identification moléculaire (séquençage du gène de l'ARN 16S ou du gène *rpo*B) ont montré une excellente concordance des deux méthodes pour l'identification des *Enterobacteriaceae*. Deux points sont importants à noter concernant cette nouvelle technique. D'une part, les souches du genre *Shigella* sont identifiées comme étant des *Escherichia coli*, ce qui est effectivement correct sur un plan purement taxonomique. D'autre part, de nombreux isolats du genre *Enterobacter* identifiés comme *E. cloacae* par les méthodes biochimiques sont identifiés en *E. hormaechei* par spectrométrie de masse, ces deux espèces proches partageant de nombreux caractères biochimiques.

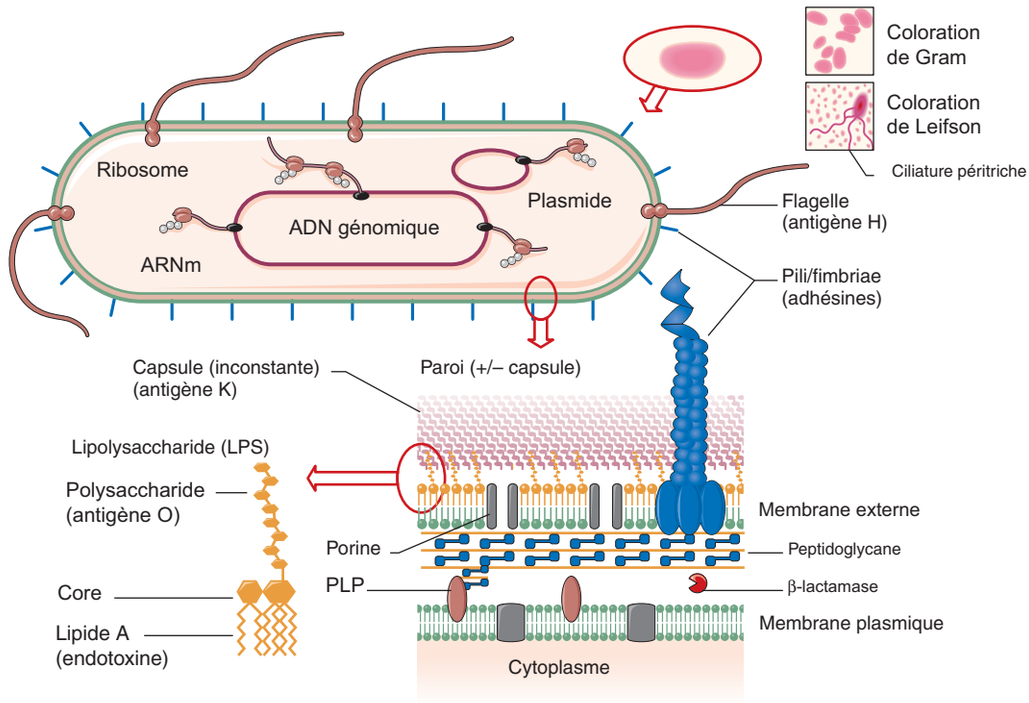



**Fig. 34.2.3.** – *Structure et aspect microscopique des Enterobacteriaceae.*

## Tribu des *Escherichiae* (entérobactéries VP –, TDA – et uréase –)

Ce groupe, défini par des caractères négatifs, comprend quatre genres principaux, à savoir les genres *Escherichia, Shigella, Salmonella* et *Citrobacter* (tableau 34.2.3). Les genres *Edwardsiella, Kluyvera, Leclercia, Leminorella, Moellerella, Yokenella* qui possèdent les caractères biochimiques de définition de cette tribu sont rarement retrouvés dans les isolats humains.

### Genre *Escherichia*

Ce genre comporte cinq espèces (tableau 34.2.4) : *E. coli*, *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris*. *E. blattae* isolé de cafards n'a jamais été retrouvé dans des prélèvements humains. *E. hermanii* et *E. vulneris*, dont les colonies apparaissent souvent pigmentées en jaune, ont été retrouvés dans des prélèvements de plaies. *E. hermanii* produit une pénicillinase naturelle (résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline). *E. albertii*, initialement confondu avec *Hafnia alvei*, a été isolé de selles diarrhéiques d'enfants et portait le gène *eae* des ECEP (voir infra). Cependant, au sein de ce genre, l'espèce *E. coli* représente la quasi-totalité des isolats humains. L'espèce *E. coli* présente une grande diversité sur le plan génétique et sur le plan du pouvoir pathogène.

#### *Pouvoir pathogène et habitat*

*Escherichia coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée dans le laboratoire de bactériologie.

C'est un commensal de l'intestin de l'homme et des animaux représentant l'espèce aérobie quantitativement la plus importante de la flore digestive ($10^6$–$10^9$ bactéries par gramme de selles). La présence de colibacilles ou espèces voisines (les coliformes) dans l'eau est un témoin de contamination fécale (colimétrie). Mais c'est aussi le premier germe responsable d'infections communautaires et nosocomiales. Les infections à *E. coli* sont de deux types : infections intestinales à type de diarrhées et infections extra-intestinales. Les méthodes d'analyse génomique (MLST, ribotypage) ont montré que l'espèce *E. coli* pouvait être divisée en plusieurs groupes phylogénétiques dont quatre principaux (A, B1, B2 et D) regroupe la majorité des souches. Les souches d'*E. coli* commensales et celles responsables de diarrhées appartiennent majoritairement aux groupes A et B1, alors que celles responsables de pathologies extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies et méningites) appartiennent majoritairement aux groupes D et B2.

**TABLEAU 34-2-2**

**Phénotypes de résistance naturelle des principaux genres et espèces d'entérobactéries (d'après le communiqué du CA-SFM de janvier 2005).**

| *Espèce/genre* | *AM* | *AMC* | *TIC* | *C1G* | *FOX* | *CXM* | *GM* | *TET* | *COL* | *FT* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Klebsiella* | R | | R | | | | | | | |
| *Citrobacter diversus* | R | | R | | | | | | | |
| *Citrobacter freundii* | R | R | | R | R | | | | | |
| *Enterobacter cloacae* | R | R | | R | R | | | | | |
| *Enterobacter aerogenes* | R | R | | R | R | | | | | |
| *Serratia marcescens* | R | R | | R | | R | | | R | |
| *Proteus mirabilis* | | | | | | | | R | R | R |
| *Proteus vulgaris* | R | | | R | | R | | | R | R |
| *Morganella morganii* | R | R | | R | | | | | R | R |
| *Providencia stuartii* | R | R | | R | | | R | | R | R |
| *Yersinia enterocolitica* | R | R | R | R | R | R | | | | |

R : Résistance naturelle.
AM : aminopénicillines ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : ticarcilline ; C1G : céphalosporines de 1re génération ; FOX : céfoxitine ; CXM : céfuroxime ; GM : gentamycine ; TET : tétracyclines ; COL : colistine ; FT : nitrofuranes.

Les souches responsables de diarrhées appartiennent de plus à des sérotypes particuliers et possèdent des facteurs de virulence spécifiques de support plasmidique, chromosomique, ou portés par des phages. On distingue six pathovars entérovirulents :

- les ECEP : *E. coli* entéropathogènes responsables de gastro-entérites infantiles. Une douzaine de sérotypes sont répertoriés en France ;
- les ECEI : *E. coli* entéro-invasifs qui ont la propriété de pénétrer dans les cellules et de provoquer des syndromes dysentériformes ;
- les ECET : *E. coli* entérotoxinogènes qui sécrètent des toxines de deux types, ST (thermostable) et LT (thermolabile), et qui possèdent en outre des facteurs d'adhésion à la muqueuse intestinale. Ces souches sont responsables de syndromes cholériformes qui touchent principalement les enfants des pays en voie de développement et les voyageurs ( « tourista ») ;
- les ECEH : *E. coli* entérohémorragiques responsables d'épidémies de diarrhées sanglantes d'origine alimentaire pouvant se compliquer de syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'enfant par la production de Shiga toxines ;
- les ECEA : *E. coli* entéroaggrégatifs responsables de diarrhées chroniques dans les pays en voie de développement ;
- les ECAD : *E. coli* à adhésion diffuse qui seraient responsables de diarrhées aqueuses chez l'enfant.

Le tableau 17.5 résume les différents pathovars responsables de diarrhées ainsi que les sérotypes et les gènes de virulence qui leur sont associés.

Les souches responsables d'infections extra-intestinales sont isolées principalement d'infection urinaire. *E. coli* est de loin le premier germe responsable d'infection urinaire. En l'absence de malformations ou de reflux vésico-urétheral, les souches dites « uropathogènes » parviennent à coloniser l'arbre urinaire grâce à des adhésines (*pili* ou *fimbriae*). *E. coli* est également responsable d'infections maternofœtales, de prostatites et de suppurations diverses à partir de la flore digestive (infections des voies biliaires, péritonites, salpingites, infections postopératoires). Toutes ces infections peuvent se compliquer de septicémies. Chez le nouveau-né, la complication la plus redoutable et la méningite associée à la présence de l'antigène capsulaire K1 similaire à celui de *Neisseria meningitidis* du groupe B.

**TABLEAU 34-2-3**

**Caractères différentiels des genres de la tribu des *Escherichiae*.**

| | *Escherichia coli* | *Shigella* | *Salmonella* | *Citrobacter* | *Edwarsiella* | *Kluyvera* spp. | *Moellerella* | *Leclercia* | *Leminorella* | *Yokenella* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mobilité | +[1] | – | +[3] | + | + | + | – | + | – | + |
| Indole | + | d | – | d | + | + | d | + | – | – |
| $H_2S$ Hajna | –[2] | – | +[4] | d | + | – | – | – | + | – |
| Citrate Simmons | – | – | +[4] | d | – | + | d | – | d | + |
| ONPG | + [1] | d | D | + | – | + | + | + | – | + |
| LDC | d | – | +[4] | – | + | + | – | – | – | + |
| ODC | d | d | d | d | + | + | – | – | – | + |
| ADH | – | – | d | – | – | – | – | – | – | – |
| Lactose[5] | +[1] | – | – | + | – | + | + | + | – | – |
| L-arabinose[5] | d | d | D | + | – | + | – | + | + | + |
| Sensibilité à la colistine | + | + | + | + | – | + | – | + | + | – |

Toutes les souches sont TDA –, VP –, urée –, sauf plasmide métabolique.

d : différent selon les souches ; D : différent selon les sous-genres de *Salmonella.*
[1] Sauf *E. coli* biovar *alkalescens dispar*.
[2] Sauf plasmide métabolique.
[3] Sauf *S.* Gallinarum pullorum.
[4] Quelques souches négatives.
[5] Fermentation.

**Caractères différentiels entre les différentes espèces des genres *Escherichia* et *Shigella*.**

| | *S. sonnei* | *S. dysenteriae*, *S. flexneri* et *S. boydii* | *E. coli* immobile, agazogène | *E. coli* mobile | *E. fergusonii* | *E. hermannii* | *E. vulneris* | *E. albertii* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pigmentation jaune des colonies | – | – | – | – | – | + | d | – |
| Mobilité (35 °C) | – | – | – | + | + | + | + | – |
| Gaz en glucose | – | **– (rares +)** | – | + | + | + | + | + |
| ONPG[1] | + | **– (d : *S. dysenteriae*)** | **d** | + | d | + | + | + |
| Indole[1] | – | **d** | + | + | + | + | – | – |
| LDC[1] | – | – | **d** | **d** | + | – | + | + |
| ODC[1] | + | – | **d** | **d** | + | + | – | + |
| β-glucuronidase | **d** | **d** | **d** | + | – | – | – | – |
| Lactose* | – | – | d | + | – | d | – | – |
| D-sorbitol*[1] | – | d | d | + | – | – | – | – |
| L-rhamnose*[1] | + | – | d | d | + | + | + | – |
| Adonitol* | – | – | – | – | + | – | – | – |
| Cellobiose* | – | – | – | – | + | + | + | – |
| Utilisation du malonate | – | – | – | – | d | – | + | – |
| Utilisation de l'acétate (milieu de Trabulsi et Edwards) | – | – | + | + | + | d | d | + |
| Citrate de Christensen | – | – | **d** | **d** | + | d | – | – |

Les caractères encadrés sont plus particulièrement utiles à l'identification des shigelles.
d = différent suivant les genres ou les espèces.
* Fermentation.
[1] Caractères disponibles sur galerie API 20E® (bioMérieux).

## Identification

Les souches immobiles et agazogènes anciennement décrites comme *Alkalescens dispar* ne sont plus qu'un biovar d'*E. coli*. L'identification de ce biovar est parfois délicate car il peut être aisément confondu avec le genre *Shigella*. Le tableau 34.2.4 indique les réactions permettant de faire la distinction entre ces deux genres.

En dehors du problème du biovar *Alkalescens dispar*, il n'y a pratiquement pas de difficulté pour identifier *E. coli*. Les principaux caractères positifs sont l'indole, l'ONPG et le mannitol. Quelques caractères sont parfois aberrants : 4 % de souches non indologènes. Des caractères peuvent être codés par des plasmides telle la production d'$H_2S$. Sur milieu de MacConkey–sorbitol, les souches d'*E. coli* sont sorbitol positif, à l'exception des EHEC de sérotype O157 : H7. L'utilisation de milieux chromogènes permet de réaliser une identification présomptive d'*E. coli* par la recherche d'une β-D-glucuronidase ou d'une β-D-galactosidase dans les infections urinaires. Cette identification présomptive n'est valide que si elle s'accompagne d'un examen direct et d'une recherche positive de la production d'indole. Tout résultat discordant ou s'accompagnant d'un phénotype de résistance rare (céphalosporinase) doit faire réaliser une identification biochimique complète. Contrairement à la β-D-glucuronidase, la β-D-galactosidase n'est pas du tout spécifique d'*E. coli* et doit donc être interprétée avec la plus grande prudence.

À l'intérieur de l'espèce *E. coli*, on peut distinguer de multiples sérotypes. Il existe en effet plus de 190 Ag O (LPS), plus de 80 Ag K (antigène capsulaire) et 56 Ag H (flagelline). Les sérotypes correspondent à diverses associations de ces antigènes. Hormis les sérotypes responsables des gastro-entérites infantiles – souches ECEP –, dont la recherche peut être faite en routine pour les souches isolées de coproculture chez des enfants de moins de 3 ans, la sérotypie des autres souches est réservée à des laboratoires spécialisés.

La recherche de l'antigène capsulaire K1 devra être réalisée sur les *E. coli* isolés chez un nouveau-né afin d'alerter le clinicien sur le caractère hautement virulent de ces souches à tropisme méningé. Cette recherche se fait en utilisant le même réactif que pour l'agglutination des méningocoques du groupe B (communauté antigénique).

- **Détermination des ECEP.** C'est à partir du début des années 1950 que certains sérotypes d'*E. coli* ont été rendus responsables d'épidémies de gastro-entérites survenant chez des enfants de moins de 3 ans. Il existe en France une douzaine de sérotypes dits entéropathogènes. La figure 34.2.4 résume la procédure d'identification. La technique est celle d'une agglutination sur lame qui doit apparaître en moins de 5 secondes et présenter un caractère massif.
- **Détermination des EHEC.** La plupart des EHEC isolés en France appartiennent au sérotype O157 : H7 et sont sorbitol négatif. L'utilisation du milieu de MacConckey permet ainsi de les repérer. Toute souche suspecte associée à un contexte de diarrhée sanglante ou de SHU devra être envoyée au Centre national de référence (CNR).

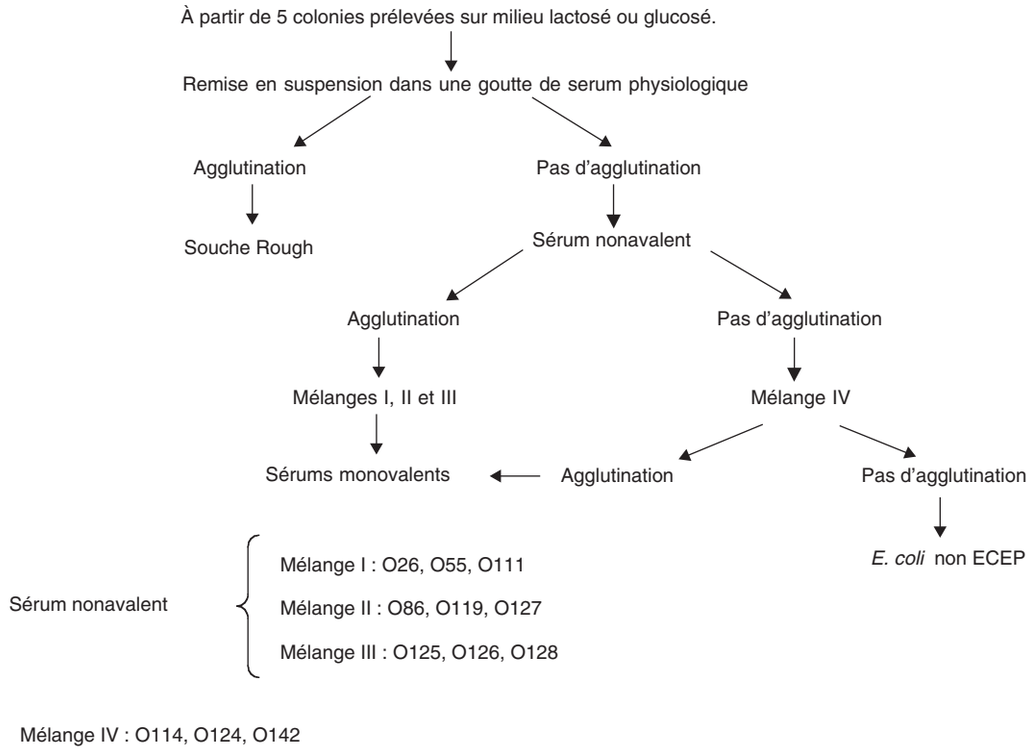



**Fig. 34.2.4.** – *Algorithme pour la détermination du sérotype d'un Escherichia coli entéropathogène (ECEP).*

La détection des autres pathovars responsables de diarrhées reste du domaine des laboratoires spécialisés. Initialement fondée sur le pouvoir pathogène chez l'animal ou l'effet cytopathogène en culture cellulaire, l'identification de ces souches est actuellement réalisée par biologie moléculaire (tableau 17.6).

## Genre *Shigella*

Bien que faisant partie sur le plan génétique de l'espèce *Escherichia coli*, le genre *Shigella* a été conservé dans la taxonomie pour des raisons médicales. Ce genre comprend quatre « espèces » ou sous-groupes A, B, C, D pouvant comporter un ou plusieurs sérotypes : groupe A, *S. dysenteriae* avec 15 sérotypes ; groupe B, *S. flexneri* avec 6 sérotypes ; groupe C, *S. boydii* avec 18 sérotypes ; et groupe D, *S. sonnei* avec un seul sérotype (tableau 34.2.5).

### *Pouvoir pathogène et habitat*

*S. dysenteriae* type 1 ou bacille de Shiga est l'agent de la dysenterie bacillaire stricto sensu. Les autres *Shigella* provoquent des syndromes dysentériques. Il existe en fait de grandes variations dans la gravité des infections, la forme la plus grave étant due au bacille de Shiga.

### *Caractère d'identification*

L'identification biochimique du genre *Shigella* pose principalement le problème du diagnostic différentiel avec une souche d'*E. coli* lactose négatif et immobile (tableau 34.2.4). Le milieu à l'acétate de sodium de Trabulsi et d'Ewing et le milieu au citrate de Christensen, qui sont d'une grande utilité en cas de doute, ne sont malheureusement plus commercialisés.

Les *Shigella* sont caractérisées par de nombreuses réactions négatives. L'origine de la souche – coproculture – est un élément d'orientation capital. Les problèmes d'identification se posent essentiellement avec les souches immobiles et agazogènes d'*E. coli* (tableau 34.2.4).

*S. dysenteriae* type 1 est catalase négative, mais quelques souches d'autres types pourraient également être catalase négative.

Les cultures de *S. sonnei* dissocient fréquemment en deux phases, l'une lisse de type habituel pour une

**TABLEAU 34-2-5**

**Caractères différentiels des *Shigella*.**

| | *Groupe A S. dysenteriae* | *Groupe B S. flexneri* | *Groupe C S. boydii* | *Groupe D S. sonnei* |
|---|---|---|---|---|
| Nombre de sérotypes | 10 | 6 | 15 | 1 |
| Mannitol | – | + (1, 2, 3, 5) ; d (4, 6) | + | + |
| Indole | + (2, 7, 8) ou – | + (5) ; d (1, 2, 3, 4) ou – | + (5, 7, 9, 11, 13, 15) ou – | – |
| ODC | – | – | – ou + (13) | + |
| ONPG | + (1, 6[1]) ou – | – | – | d[a] |
| Gaz en glucose | – | – ou d (6) | – ou d (14) | – |
| Dulcitol | – ou + (5) | – ou d (6) | + (6, 10) ; d (3, 11, 12) ou – | – |
| Xylose | – ou + (8, 10) | – ou d (4) | + ou – (2, 4, 9, 12, 13, 15) | d[b] |
| Rhamnose | – ou + (2, 7) | – ou d (3, 4) | – ou + (9) | d[c] |
| Agglutination anti-Shiga | + (1) ou – | – | – | – |
| Anti-A | + ou – (9, 10)[2] | – | – | – |
| Anti-B | – | + | – | – |
| Anti-C | – | – | + ou – (12, 13)[2] | – |
| Anti-D | – | – | – ou + (6) | + |
| Toutes les souches sont immobiles, LDC, citrate de Christensen, acétate de Trabulsi, urée, TDA, $H_2S$, VP, malonate négatifs | | | | |

Les nombres entre parenthèses indiquent les sérotypes concernés par la réaction +, –, d indiquée.
[a, b, c] En fonction des biotypes : [a] = a et g + ; [b] = d + ; [c] = a et d +, f + ou + lent, g – ou + lent.
[1] Réaction tardive à 24 heures.
[2] Sérotypes rares non agglutinés par les réactifs commerciaux de Diagnostics Pasteur.

entérobactérie, l'autre mâte à surface et contours irréguliers. *S. sonnei* peut être scindé en plusieurs biotypes.

Des antisérums polyvalents (pour *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. dysenteriae*) ou monovalents (pour *S. sonnei* et *S. dysenteriae* de type 1) sont commercialisés pour l'identification en routine des shigelles. Seul le CNR possède la gamme complète d'antisérums. Il convient d'adresser à ce CNR toutes les souches de *Shigella* isolées pour détermination complète du sérotype. Pour *S. sonnei*, comme il n'existe qu'un seul sérotype, on peut se contenter d'adresser l'information de l'isolement sans la souche en précisant si possible le biotype.

## Genre *Salmonella*

Les hybridations ADN-ADN ont démontré que toutes les souches de salmonelles appartenaient à deux espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongorii*, qui est exceptionnellement isolée chez l'homme. L'espèce *S. enterica* est divisée en six sous-espèces : *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *Salmonella enterica* subsp. *indica*, et *S. enterica* subsp. *salamae*. Chacune de ces sous-espèces se divise en sérovars définis par les antigènes O (LPS), H (flagelle) et Vi (capsule). La sous-espèce *S. enterica* subsp. *enterica* représente la très grande majorité des souches isolées chez l'homme et les animaux à sang chaud, les autres sous-espèces étant rencontrées principalement chez les animaux à sang froid. Au sein de cette sous-espèce, plus de 1400 sérovars sont individualisés. Quatre de ces sérovars correspondent aux salmonelles dites « majeures » strictement humaines (Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B et Paratyphi C) responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Les autres sont d'origine animale, pouvant se retrouver dans la flore digestive de l'homme en portage asymptomatique ou être responsables de diarrhées bénignes en l'absence de facteurs prédisposant à l'infection systémique (immunodépression, drépanocytose, etc.). La plupart de ces sérovars « mineurs » sont désignés par des noms géographiques (Wien, Dublin, etc.). Afin de simplifier la dénomination des sérovars de salmonelle, il est usuel de juxtaposer le nom du sérovar à celui du genre *Salmonella*. Nous dirons donc *Salmonella* Typhi pour *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhi. Le tableau 34.2.6 indique les réactions différentielles entre les salmonelles et les espèces phénotypiquement proches, et le tableau 34.2.7 répertorie les principaux sérovars.

### *Pouvoir pathogène et habitat*

Du point de vue médical, il convient de distinguer deux grands groupes à l'intérieur du genre *Salmonella* :

- les salmonelles majeures, agents de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes – *S.* Typhi, *S.* Paratyphi *A*, *S.* Paratyphi *B*, *S.* Paratyphi *C*. Ces sérovars sont responsables de septicémies à point de départ lymphatique par envahissement des ganglions mésentériques. Le diagnostic repose à la fois sur l'isolement du germe dans les prélèvements de selles et les hémocultures (en fonction des septénaires) et sur le sérodiagnostic de Widal et Felix ;
- les autres sérovars « mineurs » habituellement responsables de toxi-infections alimentaires qui se manifestent par des gastro-entérites avec diarrhées et vomissements survenant dans les 8 à 10 heures suivant l'ingestion de l'aliment contaminant et dont l'évolution est en règle spontanément favorable en quelques jours. Les entérites à salmonelles s'observent surtout chez les nourrissons, parfois au cours d'épidémies au sein de collectivités. Ces sérovars « mineurs » peuvent cependant être responsables de rares infections extra-digestives (infections ostéoarticulaires, septicémies voire méningites) de type opportuniste sur certains terrains favorisants (drépanocytose, immunodépression, période néonatale). Le tableau 34.2.7 indique la liste des sérovars les plus fréquents en France.

**TABLEAU 34-2-6**

**Caractères différentiels entre le genre *Salmonella* et d'autres genres ou espèces pouvant être confondus.**

| | *Salmonella* | *Hafnia alvei* | *Citrobacter freundii* |
|---|---|---|---|
| $H_2S$ | +[1] | – | + |
| LDC | +[2] | + | – |
| Lyse par phage *Salmonella* O1 | + 85 à 98 % | – | – |
| Lyse par phage *Hafnia* | – | + 96 % | – |

[1] Sauf *S.* Paratyphi A et *S.* Choleraesuis.
[2] Sauf *S.* Paratyphi A.

### *Identification*

#### Identification biochimique

Comme pour toutes les *Enterobacteriaceae*, l'identification doit d'abord être biochimique, ce qui conduit pour les salmonelles au diagnostic de genre, puis sérologique, ce qui amène pour les salmonelles au diagnostic de sérovar.

La plupart des salmonelles isolées dans un laboratoire de bactériologie le sont à partir de coprocultures. La galerie minimale d'orientation comporte classiquement trois tubes : milieu urée indole, milieu de Kligler, milieu mannitol mobilité.

Il est possible d'anticiper l'identification biochimique complète et de commencer le typage antigénique.

Il conviendra alors de donner les résultats sous réserve au clinicien, à la condition toutefois que le sérovar déterminé soit parmi les plus fréquemment isolés.

À l'exception du sérovar aviaire – *S.* Gallinarum-pullorum –, les salmonelles sont en général mobiles.

**TABLEAU 34-2-7**

**Liste et formule antigénique des principaux sérovars de salmonelles isolées en France.**

| | *Antigène O* | *Antigène H* | |
|---|---|---|---|
| | | *Phase 1* | *Phase 2* |
| **Groupe B (> 50 % des isolements)** | | | |
| *S.* Typhimurium | *1*, 4 (5), 12 | i | 1, 2 |
| *S.* Saint-Paul | *1*, 4, 12, *27* | e, h | 1, 2 |
| *S.* Heidelberg | *1*, 4, (5), 12 | r | 1, 2 |
| *S.* Brandenburg | *1*, 4, 12 | l, v | e, n, z15 |
| *S.* Bredeney | *1*, 4, 12, 27 | l, v | 1, 7 |
| *S.* Agona | *1*, 4, 12 | f, g, s | – |
| *S.* Derby | *1*, 4, (5), 12 | f, g | – |
| *S.* Paratyphi B | *1*, 4, (5), 12 | b | 1, 2 |
| *S.* Schwartzengrund | *1*, 4, 12, *27* | d | 1, 7 |
| *S.* Wien | *1*, 4, 12, *27* | b | l, w |
| *S.* Coeln | 4, (5), 12 | y | 1, 2 |
| *S.* Duisburg | *1*, 4, 12, *27* | d | e, n, z15 |
| *S.* Abortusovis | 4, 12 | c | 1, 6 |
| *S.* Stanley | *1*, 4, (5), 12, *27* | d | 1, 2 |
| *S.* Reading | *1*, 4, (5), 12 | e, h | 1, 5 |
| *S.* San-Diego | 4, (5) 12 | e, h | e, n, x |
| **Groupe C1–C2 (~ 20 % des isolements)** | | | |
| *S.* Paratyphi C | 6, 7, (Vi) | c | 1, 5 |
| *S.* Choleraesuis | 6, 7 | c | 1, 5 |
| *S.* Infantis | 6, 7 | r | 1, 5 |
| *S.* Bovismorbifians | 6, 8 | r | 1, 5 |
| *S.* Hadar | 6, 7 | z10 | e, n, x |
| *S.* Newport | 6, 8 | e, h | 1, 2 |
| *S.* Virchow | 6, 7 | r | 1, 2 |
| *S.* Thompson | 6, 7 | k | 1, 5 |
| *S.* Montevideo | 6, 7 | g, m, s | – |
| *S.* Manhattan | 6, 8 | d | 1, 5 |
| *S.* Goldcoast | 6, 8 | r | l, w |
| *S.* Braenderup | 6, 7 | e, h | e, n, z15 |
| *S.* Livingstone | 6, 7 | d | l, w |
| *S.* Mbandaka | 6, 7 | z10 | e, n, z15 |
| *S.* Kottbus | 6, 8 | e, h | 1, 5 |
| *S.* Ohio | 6, 7 | b | l, w |
| *S.* Muenchen | 6, 8 | d | 1, 2 |
| *S.* Blockey | 6, 8 | k | 1, 5 |
| *S.* Tenessee | 6, 7 | z29 | (1, 2, 7) |

(*Suite*)

**TABLEAU 34-2-7**

**Suite.**

| | *Antigène O* | *Antigène H* | |
|---|---|---|---|
| | | *Phase 1* | *Phase 2* |
| *S.* Isangi | 6, 7 | d | 1, 5 |
| **Groupe D (~ 20 % des isolements)** | | | |
| *S.* Panama | *1*, 9 12 | l, v | 1, 5 |
| *S.* Dublin | *1*, 9 12 (Vi) | g, p | – |
| *S.* Enteritidis | *1*, 9 12 | g, m | – |
| *S.* Typhi | 9, 12 (Vi) | d | – |
| *S.* Gallinarum-pullorum | *1*, 9 12 | – | – |
| **Groupe E (5 à 10 % des isolements)** | | | |
| *S.* Senftenberg | 1, 3, 19 | g, s, t | – |
| *S.* London | 3, 10 | l, v | 1, 6 |
| *S.* Anatum | 3, 10 | e, h | 1, 6 |
| *S.* Give | 3, 10 | l, v | 1, 7 |
| *S.* Newbrunswick | 3, *15* | l, v | 1, 7 |
| **Groupe G (< 5 % des isolements)** | | | |
| *S.* Kedougou | *1*, 13, 23 | i | l, w |
| *S.* Worthington | *1*, 13, 23 | z | l, w |
| *S.* Ibadan | 13, 22 | b | 1, 5 |
| *S.* Havana | *1*, 13, 23 | f, g (s) | – |
| **Groupe A (< 1 % des isolements)** | | | |
| *S.* Paratyphi A | *1*, 2, 12 | a | – |

Nombres en italique : facteur lié à la présence d'un bactériophage.
Nombres entre parenthèses : facteur facultatif.

Quelques réactions sont particulièrement remarquables pour certaines souches importantes :

- *S.* Typhi est agazogène, citrate de Simmons négatif, faiblement mobile à l'isolement (aspect de houpe en milieu mannitol-mobilité), et sur milieu de Hajna elle produit en 24 heures une pointe d'$H_2S$ très évocatrice ;
- *S.* Paratyphi A est le plus souvent $H_2S$, LDC et citrates de Simmons négatifs ;
- *S.* Paratyphi C est $H_2S$ positif, contrairement aux souches diphasiques de *S.* Choleraesuis qui sont $H_2S$ négatif alors que les souches monophasiques de ce sérovar – variété Kunzendorf – sont $H_2S$ positif. Du point de vue antigénique *S.* Paratyphi C est très proche de *S.* Choleraesuis : Ag O : 6,7 ; Ag H c : 1,5, mais peut posséder l'antigène Vi.

Les problèmes d'identification des salmonelles se posent en pratique courante avec certaines espèces : *Hafnia halvei* et *Citrobacter freundii*. Des souches d'*Alteromonas putrefaciens* peuvent aussi prêter à confusion à cause de leur caractère $H_2S$ positif, mais ces souches, rarement isolées de coprocultures, sont aisément différenciables par leur caractère aérobie strict et oxydase positive. Il peut exister des souches de *Salmonella* ayant acquis un plasmide métabolique lactose. Ces souches sont principalement isolées d'hémocultures car elles sont ignorées dans les coprocultures du fait de leur caractère lactose positif.

Le tableau 34.2.6 indique les principales réactions permettant de distinguer les salmonelles des autres espèces précitées. La lyse par les bactériophages spécifiques – phage *Salmonella* 01 de Felix et Callow et phage *Hafnia* de Guinée et Valkenburg (Diagnostics Pasteur) – est pratiquée sur la boîte d'antibiogramme en déposant une microgoutte de chacune des suspensions phagiques. Souvent, à partir de la 5e heure d'incubation à 37 °C, on peut déjà voir la plage de lyse au niveau du dépôt de la goutte, plage caractéristique de l'espèce en cause.

## Typage antigénique des *Salmonella*

Il s'agit de l'étape essentielle pour la détermination des sérovars de salmonelles. Le typage repose sur la détermination des antigènes O (LPS), H (flagelle) et éventuellement Vi (capsule) de la souche.

Les salmonelles sont divisées d'abord en groupes sérologiques liés à la présence d'un facteur somatique O commun. Ces groupes sont dénommés par des lettres de A à Z puis des chiffres de 51 à 67. À l'intérieur de ces groupes, les sérovars individuels sont liés à la présence d'autres antigènes O, des antigènes flagellaire H (mono- ou biphasiques) et de l'antigène Vi (uniquement et facultativement présent chez *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C, *S.* Dublin, mais aussi chez des souches de *Citrobacter*).

Les formules antigéniques complètes de toutes les salmonelles sont répertoriées dans le schéma de Kauffmann-White. Pour les nouveaux sérovars, des addenda au schéma de Kauffmann-White sont régulièrement publiés dans les *Annales de Microbiologie* de l'Institut Pasteur (Paris).

Seuls les CNR sont en mesure de sérotyper les quelque 2489 sérovars actuellement reconnus, ce qui nécessite une batterie de plus de 200 antisérums.

Une gamme minimale de sérums agglutinants commercialisés permet néanmoins une approche satisfaisante de la cinquantaine de sérovars les plus fréquemment isolés en France. Seules les souches dont la détermination du sérovar est incomplète ou pose problème ainsi que les souches de salmonelles « majeures » (*S.* Typhi et *S.* Paratyphi) seront adressées au CNR pour complément d'étude (sérovar exact voire lysotype).

Les sérums agglutinants TABC (anti-O et anti-H couplés) doivent être abandonnés car non spécifiques.

L'attitude pratique générale est résumée ainsi :

- ne sérotyper que les souches identifiées biochimiquement ;
- utiliser des cultures humides surtout pour la recherche des antigènes H ;
- la technique est une agglutination sur lame ;
- déterminer les antigènes O et l'éventuelle présence de Vi ;
- à l'intérieur du groupe sérologique O ainsi déterminé, rechercher les antigènes H mono- ou biphasiques compatibles avec les sérovars de ce groupe ;
- si une seule phase H est décelée, pratiquer une inversion de phase selon la méthode de Sven Gard ;
- en cas de discrimination insuffisante avec la batterie d'antisérums utilisée, adresser les souches au CNR.

## Typages des antigènes somatiques O et de l'antigène Vi

Des sérums « mélanges » de dépistage permettent l'orientation vers certains sérogroupes. Ces sérums ont malheureusement été appelés OMA, OMB, OMC jusqu'à OMF, ce qui est une source perpétuelle de confusion avec les sérogroupes A, B, C. L'agglutination est immédiate et massive. Il peut exister des réactions de coagglutination plus tardives et d'intensité moindre dans un ou plusieurs autres sérums. La présence de l'antigène Vi – antigène d'enveloppe – peut masquer l'agglutination O. Cet antigène Vi n'est présent que chez *S.* Typhi, *S.* Paratyphi *C* (souches rarissimes en France) et chez d'exceptionnelles souches de *S.* Dublin. En pratique, il n'y a que *S.* Typhi qui puisse être O inagglutinable par présence de Vi. Pour rendre les souches O agglutinables, il conviendra de chauffer une suspension de la souche 1 heure à 60 °C.

Compte tenu du fait que 98 % des souches isolées chez l'homme ont un antigène O correspondant aux sérums mélanges OMA et OMB, on commencera les agglutinations avec ces deux sérums et le sérum anti-Vi. Ce n'est qu'en l'absence d'agglutination avec ceux-ci que l'on testera la souche vis-à-vis des autres sérums « mélanges ».

Dans un deuxième temps, on pratiquera l'agglutination avec les sérums « monovalents » entrant dans la composition du sérum « mélange » et l'on déterminera ainsi le groupe antigénique voire le sous-groupe. Le tableau 34.2.8 indique la composition des sérums « mélanges ».

## Typage des antigènes flagellaires ; inversion de phase

Les souches flagellées peuvent avoir des antigènes H mono- ou biphasiques, c'est-à-dire avec une ou deux spécificités H. Pour les souches biphasiques, les deux spécificités existent simultanément, mais une de ces spécificités est souvent prépondérante et l'on ne pourra détecter la seconde que par un artifice technique : l'inversion de phase selon Sven Gard. Cette inversion de phase consiste à inhiber la mobilité des bactéries sur lesquelles les flagelles ont une première spécificité grâce à l'antisérum dirigé contre cette spécificité. Les bactéries qui restent mobiles et qui peuvent envahir une gélose molle ont alors la deuxième spécificité ou phase.

En pratique, on consultera le schéma de Kaufmann-White ou le tableau 34.2.7 pour les souches les plus fréquentes en France. À l'intérieur du groupe antigénique O que l'on a déterminé, on cherchera quels antigènes H peuvent être présents. À l'aide des sérums H « mélange », on oriente le diagnostic de la phase H. Le tableau 34.2.9 indique la composition des sérums mélanges HM et des sérums « mélanges intermédiaires » en sérums monovalents.

Une fois la première phase H déterminée, on peut tenter de chercher la deuxième phase. Elle peut parfois être détectable d'emblée. En cas d'échec, il faudra pratiquer l'inversion de phase.

À une gélose molle gardée en surfusion (10 ml de gélose nutritive + 20 ml de bouillon nutritif) ou à la gélose de Sven Gard (Diagnostics Pasteur), on ajoutera 1 goutte de sérum pour inversion de phase (sérum SG pour Sven Gard Diagnostics Pasteur) choisi pour contenir les anticorps de la première spécificité déterminée, ou 3 gouttes de sérum monovalent ou sérum mélange intermédiaire correspondant à la première phase détectée.

Il faudra éviter que la surface de la gélose soit trop humide et, au besoin, on fera sécher légèrement la boîte de Pétri. On ensemencera cette gélose en touche centrale et on incubera la boîte sans la retourner 24 heures à 37 °C.

En prenant soin d'éviter d'arracher des particules de gélose, on prélèvera la culture en périphérie de la zone d'envahissement, pour rechercher par agglutination la deuxième phase à l'aide des antisérums compatibles, en s'aidant du schéma de Kaufmann-White. Il se peut que cette recherche soit infructueuse et il faudra vérifier que

**TABLEAU 34-2-8**

**Sérogroupes dépistés par les sérums mélanges et liste des sérums « monospécifiques » permettant la détermination précise du sérogroupe et des sous-groupes (Diagnostics Pasteur).**

| *Antigènes D Sérum mélange de dépistage* | *Sérum pour la détermination des groupes et sous-groupes* | *Groupe* | *Facteur O commun* | *Sous-groupe* | *Autres facteurs O ou VI pouvant être présents* |
|---|---|---|---|---|---|
| OMA | 1, 2 | A | 2 | | 1[1], 12 |
| | 4, 5 | B | 4 | | 1[1], 5, 12, 27 |
| | 9 | D | 9 | D1<br>D2<br>D3 | 1[1], 12, Vi<br>46<br>1, 12, 46, 27 |
| | 3, 10, 15<br>10<br>15<br>1, 3, 19 | E | 3 | E1<br>E2<br>E3<br>E4 | 10<br>15[1]<br>15[1], 34[1]<br>1, 19 |
| | | L | 21 | | |
| OMB | 6, 7, 8<br>7<br>8 | C | 6, 7 ou<br>6, 8 ou<br>8 | C1<br>C2<br>C3<br>C4 | 6, 7, Vi<br>6, 8<br>8, 20[1]<br>6, 7, 14[1] |
| | 11 | F | 11 | | |
| | 13, 22, 23 | G | 13 | G1<br>G2 | 1[1], 22<br>1[1], 23 |
| | 6, 14, 24 | H | 6, 14 | | 1, 24, 25 |
| OMC | | I à K<br>M à P | [2] | | [2] |
| OMD | | Q à W | [2] | | [2] |
| OME | | X à Z<br>51 à 53 | [2] | | [2] |
| OMF | | 54 à 59 | [2] | | [2] |
| OMG | | 60 à 63<br>65 à 67 | [2] | | [2] |

Batterie de sérum minimale
[1] Facteur lié à une conversion bactériophagique.
[2] Non précisé.

**TABLEAU 34-2-9**

**Composition des sérums mélanges et liste correspondante des sérums monovalents disponibles (Diagnostics Pasteur).**

| *Antigènes H* | | *Sérum mélange intermédiaire* | *Sérum «monovalent» correspondant* |
|---|---|---|---|
| *Sérum mélange de dépistage* | *Composition* | | |
| HMA | a | | a |
| | b | | b |
| | c | | c |
| | d | | d |
| | i | | i |
| | z10 | | z10 |
| | z29 | | |
| HMB | e, h | | e, h<br>h |
| | e, n, x | HEn= e, n, x + e, n, z15 | x<br>z15 |
| | G | HG = f, g + g, p + g, m, s + m, t | g, m<br>g, p<br>m<br>p |
| HMC | k | | k |
| | y | | y |
| | z | | z |
| | L | HL = l, v + l, w + l, z13+ L, Z28 + l, z40 | v<br>w |
| | Z4 | HZ4 = z4, z23 + z4, z24 + z4, z32 | |
| | r | | r |
| HMD | z35 + z36 + z38 + z39 + z41 + z42 + z44 + z60 | | |
| HM III | z52 + z53 + z54 + z55 + z56 + z57 + z61 | | |
| H1 | | H1 = 1, 2 + 1, 5 + 1, 6 + 1, 7 + z6 | 2<br>5<br>6<br>7 |

Batterie de sérum minimale.

la culture en périphérie n'agglutine pas avec l'antisérum de la première phase déterminée, ce qui témoignerait de l'échec de l'inversion de phase. Il faudrait alors la recommencer en augmentant légèrement la dose de sérum ajoutée à la gélose molle.

La batterie minimale d'antisérums dont devrait disposer tout laboratoire de bactériologie est indiquée dans les tableaux 34.2.8 et 34.2.9. Cette batterie ne permet pas d'arriver au diagnostic exact de sérovar, mais constitue bien souvent une approche relativement satisfaisante.

La formulation de la réponse faite au clinicien dépendra donc en partie des possibilités de chaque laboratoire.

Par exemple, si l'on isole une souche de *Salmonella* OMA +, O : 9, H : d, Vi avec un aspect typique sur milieu

de Hajna, la seule réponse possible est *Salmonella* Typhi. En revanche, si la formule antigénique trouvée est OMA +, O 9 G, on ne peut qu'affirmer qu'il s'agit d'une salmonelle du groupe D. Par ordre de fréquence pour un isolement fait chez l'homme en France, il s'agit vraisemblablement de *S.* Enteritidis O : 9, H : g, m, beaucoup plus fréquente que *S.* Dublin O : 9, H : g, p, ou que d'autres sérovars encore plus rares : *S.* Blegman, *S.* Neavsted, *S.* Rostok. *S.* Moscow, *S.* New-mexico ou *S.* Pensacola. La réponse devra alors être : salmonelle du groupe D (*S.* Enteritidis ; confirmation en cours).

La souche devra être adressée au CNR qui confirmera et précisera le sérovar exact.

Il convient d'adresser à ce centre :

- toutes les souches non complètement identifiées ;
- toutes les souches de salmonelles majeures.

Il faut aussi lui notifier tous les isolements dont on a pu faire le diagnostic de sérovar exact et complet.

On utilisera la fiche de renseignements fournie par ce CNR qui permet de collecter des informations importantes du point de vue épidémiologique.

## Genre *Citrobacter*

Actuellement, le genre *Citrobacter* comprend 11 espèces : *C. amalonaticus* (anciennement *Levinea amalonatica*), *C. braakii, C. farmeri, C. freundii, C. gillenii, C. koseri* (anciennement *C. diversus*), *C. murliniae, C. rodentium, C. sedlakii, C. werkmanii* et *C. youngae*.

Les espèces *C. braakii, C. freundii, C. gillenii, C. murliniae, C. rodentium, C. sedlakii, C. werkmanii* et *C. youngae* sont parfois rassemblées sous le vocable de « complexe *Citrobacter freundii* » ou de « *Citrobacter freundii* sensu lato ».

### *Pouvoir pathogène et habitat*

Les bactéries du genre *Citrobacter* sont des saprophytes répandues dans l'environnement et sur la nourriture végétale. Elles colonisent l'intestin de l'homme et, chez des sujets prédisposés, elles peuvent être considérées comme potentiellement pathogènes, pouvant donner des infections principalement du tractus urinaire. Toutes les espèces, à l'exception de *C. rodentium*, peuvent être isolées de prélèvements cliniques chez l'homme ; elles sont considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes et la plupart de ces infections sont d'origine nosocomiale. *C. koseri* a été isolé lors d'épidémies de méningites néonatales.

### *Identification*

Le genre *Citrobacter* rassemble des entérobactéries mobiles (sauf *C. rodentium*), ONPG positive (rares souches négatives), LDC négative, phénylalanine désaminase négative, Voges-Proskauer négative et sensibles à la colistine.

*C. diversus* et *C. amalonaticus* peuvent être considérés en première approche comme des *Escherichia coli* citrate de Simmons positif. *C. freundii* pourrait être confondu avec les souches $H_2S$ positif d'*E. coli*, mais il ne produit pas d'indole et ses cultures ainsi que celles de *C. koseri* ont une odeur particulièrement nauséabonde. Le tableau 34.2.10 indique les nombreux synonymes utilisés ainsi que les réactions différentielles entre ces espèces. Sur le plan de la sensibilité aux antibiotiques, *C. koseri* se distingue par la production d'une penicillinase, alors que les espèces du « complexe *Citrobacter freundii* » produisent naturellement une céphalosporinase (tableau 34.2.2), sauf *C. sedlakii* qui produit une β-lactamase naturelle proche des BLSE.

De nombreuses souches de *Citrobacter* spp. sont aptes à cultiver dans des milieux d'enrichissement comme les bouillons au sélénite et au tétrathionate et sur des géloses sélectives comme la gélose *Salmonella-Shigella*, la gélose désoxycholate citrate ou la gélose au vert brillant. Sur ces milieux sélectifs, les colonies n'acidifiant pas le lactose (ou acidifiant tardivement le lactose) et/ou produisant de l'hydrogène sulfuré peuvent être confondues avec des colonies de salmonelles. La majorité des souches de *Citrobacter* sp. cultivent abondamment sur le milieu cefsulodine-irgasan-novobiocine (CIN) en donnant des colonies à centre rouge et à bord translucide pouvant être confondues avec des colonies de *Yersinia*. Enfin, sur les milieux chromogènes détectant la présence de β-D-galactosidase, certains *Citrobacter* donnent une réaction positive pouvant les faire confondre avec *Escherichia coli.*

## Genre *Edwardsiella*

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce en bactériologie médicale : *Edwarsiella tarda*. Cette espèce, hôte de l'intestin des reptiles en région tropicale, est parfois isolée de coprocultures chez l'homme vivant dans ces mêmes régions. Un pouvoir entéropathogène est suspecté. Elle peut également se comporter comme pathogène opportuniste.

En première approche, lors des isolements à partir de selles, il s'agit d'une *Salmonella* indole positive. La résistance constante à la colistine est l'élément d'orientation majeur.

## Genre *Kluyvera*

Les *Kluyvera* spp. sont retrouvées dans le sol, les eaux usées et les aliments. Il s'agit d'un genre de création récente qui était connu anciennement sous le nom de groupe entérique 8. Il existerait au moins trois espèces dont deux ont actuellement une dénomination précise : *K. ascorbata* et *K. cryocrescens*. Ces bactéries ont été isolées de prélèvements pathologiques divers, principalement urines et crachats, mais aussi de septicémies sur cathéters.

Sur le plan de la résistance aux β-lactamines, les espèces du genre *Kluyvera* produisent une BLSE naturelle exprimée à « bas niveau ».

Les problèmes d'identification de ce genre se posent avec certaines souches de *Citrobacter* spp. et de *Pantoea agglomerans*. Le tableau 34.2.11 indique les principaux caractères différentiels entre ces espèces.

**TABLEAU 34-2-10**

**Caractères différentiels des espèces du genre *Citrobacter*.**

| | *Citrobacter freundii* | *Citrobacter koseri* | *Citrobacter amalonaticus* | *Citrobacter braaki* | *Citrobacter youngae* | *Citrobacter farmeri* | *Citrobacter gillenii* | *Citrobacter sedlakii* | *Citrobacter murliniae* | *Citrobacter rodentium* | *Citrobacter werkmanii* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Synonymes | | *Levinea malonatica*, *Citrobacter intermedius* b, *Citrobacter diversus* | *Levinea amalonatica*, *Citrobacter intermedius* a, *Padlewskia* | | | | | | | | |
| Mobilité | + | + | + | d | + | + | d | + | + | – | + |
| Croissance sur milieu au KCN | + | – | + | + | + | + | + | + | + | – | + |
| Indole | – | + | + | d | – | + | – | + | + | – | – |
| Citrate de Simmons | d | + | + | d | d | – | d | d | + | – | + |
| $H_2S$ | d | – | – | d | d | – | d | – | d | – | + |
| Uréase | d | d | + | d | – | d | – | + | d | d | + |
| ODC | – | + | + | + | – | + | – | + | – | + | – |
| Malonate | – | + | – | – | – | – | + | + | – | + | + |
| Mélibiose* | + | – | – | + | – | + | d | + | d | – | – |
| Raffinose* | d | – | – | d | – | + | d | – | d | – | – |
| Saccharose* | d | d | – | d | d | + | d | – | d | – | – |

* Acidification ; + : ≥ 90 % positif ; – : ≤ 10 % positif ; d : variable.

TABLEAU 34-2-11

**Caractères différentiels entre *Kluyvera* et autres espèces pouvant être citrate +, indole + et VP –.**

| | *Kluyvera* spp. | *Citrobacter koseri* | *Citrobacter amalonaticus* | *Pantoea agglomerans* |
|---|---|---|---|---|
| Indole | + | + | + | d |
| Citrate de Simmons | + | + | + | + |
| LDC | + | – | – | – |
| ODC | + | + | + | – |
| Malonate | + | + | – | d |
| Pigment jaune | – | – | – | d |
| Lactose | + | – | – | d |
| Mélibiose | + | – | – | d |
| Croissance sur milieu au KCN | + | – | + | d |

### Genres *Leclercia, Leminorella, Moellerella, Yokenella, Trabulsiella*

*Leclercia adecarboxylata, Leminorella grimontii, Leminorella richardii, Moellerella wisconsensis* et *Yokenella regensburgei* (anciennement *Koserella trabulsii*) sont rarement retrouvés dans les isolats humains et leur pouvoir pathogène reste discuté, sauf dans de rares cas où ils sont apparus comme des pathogènes opportunistes sur des terrains débilités. *Trabulsiella guamensis* a été rarement isolé de selles humaines en situation non pathogène et présente des caractères proches des salmonelles (mobile, lactose –, $H_2S$ +), mais s'en différencie par l'ONPG positive, la résistance au phage O1 et l'absence d'agglutination avec les antisérums de salmonelles.

## Groupe KES (entérobactéries VP +), tribu des *Klebsiellae*

Ce groupe hétérogène sur le plan taxonomique rassemble ce que l'on nomme généralement les entérobactéries VP +, quoique ce caractère ne soit pas obligatoire au sein de cette tribu et puisse exister dans d'autres genres comme *Yersinia*, ou espèces comme *Proteus mirabilis*. Au sein de ce groupe, on différencie sur le plan phénotypique les genres immobiles, « groupe des klebsielles » (genres *Klebsiella* et *Raoultella*) ; les genres mobiles et sensibles à la colistine, « groupe des entérobacters » (genres *enterobacter*, *Hafnia* et *Pantoea*) ; et les genres mobiles et résistants à la colistine (*Serratia, Cedecea*). D'autres genres tels que *Erwinia*, *Ewingella*, *Rahnella* sont exceptionnellement isolés de prélèvements humains. Le tableau 34.2.12 donne les caractères différentiels de ces genres.

### Genres *Klebsiella* et *Raoultella*

Le genre *Klebsiella* est composé de quatre espèces et sous-espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae, K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* et *K. oxytoxa*. Les résultats des hybridations ADN-ADN montrent que *K. ornithinolytica*, *K. planticola* et *K. terrigena* forment un groupe distinct et sont reclassées au sein du nouveau genre *Raoultella* (*R. ornithinolytica*, *R. planticola*, *R. terrigena*). Les caractères communs de ces deux genres sont l'absence de mobilité, la réaction de VP positive (sauf chez *K. pneumoniae* subsp. *ozaena et, K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis)*, les réactions de TDA et d'ADH négatives ainsi qu'une forte activité sur les sucres. En galerie API20E®, toutes ces espèces sont gélatinase négative, bien qu'environ 80 % des souches de *K. oxytoca* possèdent une gélatinase en général peu active, et par conséquent non détectée. Les caractères distincts entre espèces sont indiqués dans le tableau 34.2.13.

Sur le plan de la sensibilité aux antibiotiques, toutes sont sensibles naturellement à la colistine et produisent une pénicillinase (tableau 34.2.2).

#### *Pouvoir pathogène et habitat*

*K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* est associée au, ou peut être responsable du rhinosclérome ; il s'agit d'un épaississement chondroïde des muqueuses labioglosso-pharyngées. *K. pneumoniae* subsp. *ozenae* est associée à, ou responsable de l'ozène qui associe rhinite atrophique fétide et des processus destructifs des bronches.

*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca* sont isolées principalement dans les infections urinaires ou respiratoires parfois compliquées de septicémies, surtout en milieu hospitalier où elles seraient responsables de 10 % des infections nosocomiales.

**TABLEAU 34-2-12**

**Caractères différentiels des genres de la tribu des *Klebsiellae*.**

| | *Klebsiella, Raoultella* | *Enterobacter Cronobacter* | *Hafnia alvei* | *Pantoea agglomerans* | *Serratia* | *Cedecea* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Mobilité à 37 °C | – | + | d | d | + | + |
| Mobilité à 20 °C | – | + | + | + | + | + |
| Sensibilité à la colistine | + | + | + | + | – | – |
| Pigment rouge | – | – | – | – | d | – |
| Pigment jaune | – | –[3] | – | d | – | – |
| ADH | –[1] | d | – | – | – | + |
| ODC | –[2] | + | + | – | d | d |
| LDC | d | d | + | – | d | – |
| Uréase | d | d | – | – | – | – |
| VP à 37 °C | d | d | d | d | d | d |
| VP à 22 °C | d | d | + | d | + | d |

Toutes les espèces sont $H_2S$ et TDA négative.
d : variable
[1] Sauf certaines souches de *K. pneumoniae* subsp. *ozenae.*
[2] Sauf *R. ornithinolytica.*
[3] Sauf *Cronobacter.*

### *Identification*

L'aspect des cultures est en général très florissant : colonies grasses de 3 à 4 mm de diamètre en 24 heures pour *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca* ; plus tardivement – 48 à 72 heures – pour *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* et *K. pneumoniae* subsp. *ozenae*. La présence d'une capsule rend les colonies muqueuses, parfois filantes. La capsule est favorisée par des milieux saccharosés tel le milieu de Worfel-Ferguson. Il existe plus de 70 sérotypes capsulaires. Le typage est réalisé par diverses techniques (de Neufeld, précipitation in situ ou « gonflement capsulaire »), contre-immunoélectrophorèse. En dehors de l'intérêt épidémiologique, ce typage est surtout important pour l'identification de *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* et de *K. pneumoniae* subsp. *ozenae*. Certains antisérums sont commercialisés (Difco), en particulier les types 3 et 4. Des systèmes de biotypage sont également adaptés aux *Klebsiella*.

Quelques variants uréase négative de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca* existent. L'expression de l'uréase est favorisée après croissance sur milieu de Worfel-Ferguson. D'autres variants de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* – dits dystrophiques – peuvent se rapprocher de *K. pneumoniae* subsp. *ozenae* et sont caractérisés par l'utilisation d'un nombre moindre de substrats que les *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* classiques ou « eutrophiques ».

## Genres *Enterobacter, Cronobacter, Hafnia* et *Pantoea*

Le genre *Enterobacter* est composé de très nombreuses espèces dont les principales retrouvées dans les prélèvements humains sont : *E. cloacae, E. aerogenes, E. gergoviae, E. asburiae, E. amnigenus, E. cancerogenus. E. cloacae* ne peut être distingué sur le plan biochimique d'*E. hormaechei*, qui peut aussi être retrouvé dans des prélèvements cliniques, comme l'ont montré les études portant sur l'identification bactérienne par spectrométrie de masse. La proximité génétique d'*E. aerogenes* avec le genre *Klebsiella* a amené certains bactériologistes à proposer pour cette espèce le nom de *Klebsiella mobilis*. Trois nouveaux genres, *Cronobacter, Hafnia* et *Pantoea*, ont été créés pour les espèces *Cronobacter sakazakii* (anciennement *Enterobacter sakazakii*), *Hafnia alvei* (anciennement *Enterobacter hafniae*) et *Pantoea agglomerans* (anciennement *Enterobacter agglomerans* et *Erwinia herbicola*). En dehors de *Pantoea agglomerans*, d'autres espèces sont décrites au sein du genre *Pantoea*, mais ce sont, comme les authentiques *Erwinia*, des phytopathogènes pratiquement jamais isolés chez l'homme. De même, le nouveau genre *Cronobacter* créé pour l'espèce *Enterobacter sakazakii* comporte au moins cinq espèces proches (*C. sakazakii, C. malonaticus, C. turicensis, C. muytjensii, C. dublinensis*).

TABLEAU 34-2-13

**Caractères différentiels des espèces des genres *Klebsiella* et *Raoultella*.**

| | *K. oxytoca* | *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* | *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* | *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* | *R. ornithinolytica* | *R. planticola* | *R. terrigena* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ONPG | + | + | + | – | + | + | + |
| LDC | + | d | + | – | + | + | + |
| ODC | – | – | – | – | + | – | – |
| Citrate de Simmons | + | d | + | – | + | + | + |
| Uréase | + | d | + | – | + | + | d |
| Indole | + | – | – | – | + | d | – |
| VP | + | – | + | – | d | + | + |
| Inositol* | + | d | + | + | + | + | + |
| Sorbitol* | + | d | + | d | + | + | + |
| Rhamnose* | + | d | + | + | + | + | + |
| Saccharose* | + | d | + | + | + | + | + |
| Mélibiose* | + | + | + | d | + | + | + |

Tous sont immobiles et acidifient de nombreux sucres (glucose, mannitol, amygdaline, arabinose).
* Acidification.

### Pouvoir pathogène et habitat

Les *Enterobacter,* présents dans l'environnement, sont également des commensaux du tube digestif. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables, en milieu hospitalier surtout, d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses. *Cronobacter sakazakii* a, de plus, été responsable de méningites chez des nouveau-nés nourris au biberon avec des laits en poudre contaminés.

*Pantoea agglomerans* étant une bactérie phytopathogène du milieu extérieur, la source de contamination des malades devra être recherchée dans l'environnement.

### Identification

L'aspect morphologique et des cultures est celui d'une entérobactérie typique. *Cronobacter sakazakii* et certaines souches de *Pantoea agglomerans* produisent de plus un pigment jaune caractéristique. Le tableau 34.2.14 indique les différentes réactions permettant la différenciation des principales espèces.

## Genre *Serratia*

Ce genre comporte actuellement dix espèces : *S. marcescens, S. liquefaciens, S. rubidea, S. plymuthica, S. odorifera, S. fonticola, S. grimesii, S. proteamaculans, S. ficaria* et *S. entomophila*. Le tableau 34.2.15 résume les caractères différentiels entre ces espèces.

### Pouvoir pathogène et habitat

Ce sont toutes des bactéries du milieu extérieur. Elles se comportent comme des pathogènes opportunistes avec un double tropisme : arbres respiratoire et urinaire. *S. marcescens* est l'espèce la plus fréquente au sein de ce genre – 90 % des isolements humains –, suivi par *S. liquefaciens*, puis *S. rubidea*. Les autres espèces sont beaucoup plus rares et *S. entomophila* n'est pas été retrouvée chez l'homme.

### Identification

Certaines souches de *S. marcescens* et la plupart des souches de *S. plymuthica* et de *S. rubidaea* élaborent un pigment insoluble dans l'eau, non diffusible, lié aux enveloppes cellulaires et connu sous le nom de prodigiosine. Ce pigment confère aux colonies des souches productrices une coloration rouge-violet. Sa formation est favorisée par une culture effectuée à 30 °C sur un milieu pauvre tel que l'agar au glycérol (peptone : 5 g, glycérol : 10 ml, agar : 20 g, eau distillée : 1000 ml). C'est un des caractères le plus indicatif – quand il est présent – et qui fut responsable des miracles des « hosties sanglantes ». Les cultures de *S. ficaria*, de *S. odorifera* et de quelques souches de *S. rubidaea* ont une odeur de sous-bois ou « odeur végétale » alors que les cultures des autres espèces ont une odeur rappelant le poisson ou l'urine.

Toutes les *Serratia* possèdent une gélatinase et une DNAse (sauf *S. fonticola*) et sont résistantes à la colistine. Cette résistance, parfois mieux mise en évidence à 22 °C, se présente souvent avec le phénomène de la cocarde sur l'antibiogramme ; la bactérie se développe jusqu'au bord du disque avec un anneau d'inhibition paradoxale à distance (fig. 34.2.5). La plupart des espèces du genre *Serratia* produisent de plus une céphalosporinase naturelle. *S. fonticola* produit une β-lactamase naturelle proche des BLSE.

Des systèmes de sérotypie des antigènes somatiques et flagellaires et de lysotypie permettent des études épidémiologiques.

## Genre *Cedecea*

Il s'agit d'un nouveau genre comportant au moins cinq espèces dont trois ont reçu un nom : *C. davisae, C. lapagei* et *C. neteri*.

Les espèces du genre *Cedecea* ont rarement été retrouvées comme pathogènes opportunistes chez des patients immunodéprimés.

Le genre *Cedecea* se caractérise essentiellement par sa résistance à la colistine mais, à l'inverse des *Serratia*, il possède une ADH et ne possède pas de DNAse. Les souches sont indole, gélatinase, TDA, $H_2S$ négative, ONPG et citrate de Simmons positif.

## Genres *Rahnella* et *Ewingella*

Ces deux genres représentés chacun par une seule espèce (*Rahnella aquatilis* et *Ewingella americana*) sont des germes de l'environnement exceptionnellement retrouvés chez l'homme. *Rahnella aquatilis* a été retrouvé comme pathogène opportuniste chez des immunodéprimés. Le rôle pathogène d'*Ewingella* est plus discutable.

# Tribu des *Proteae* (entérobactéries TDA +)

La tribu des *Proteae* comporte actuellement trois genres :

- le genre *Proteus* avec trois espèces principales : *P. mirabilis*, *P. vulgaris* et *P. penneri.* Les nouvelles espèces *P. hauseri* et *P. myxofaciens* n'ont pas été retrouvées chez l'homme ;
- le genre *Providencia* avec trois espèces principales : *P. alcalifaciens, P. stuartii, P. rettgeri.* Les nouvelles espèces *P. rustigianii* et *P. heimbachae* sont rarement retrouvées chez l'homme ;
- le genre *Morganella* qui ne compte qu'une seule espèce : *M. morganii*.

Le nouveau genre *Tatumella* possède, comme les *Proteae*, une tryptophane désaminase. Il possède par ailleurs un certain nombre de traits caractéristiques qui le mettent en marge de la tribu des *Proteae* et même de la famille des *Enterobactriaceae*. Il sera donc étudié à part.

L'ensemble des caractères de la tribu sont rassemblés dans le tableau 34.2.16.

**TABLEAU 34-2-14**

**Caractères différentiels des principales espèces du genre *Enterobacter* et des espèces anciennement rattachées.**

| | *E. cloacae* | *E. aerogenes* | *E. gergoviae* | *Cronobacter. sakasakii* | *E. asburiae* | *E. amnigenus* | *E. cancerogenus* | *Pantoea. agglomerans* | *Hafnia alvei* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VP | + | + | + | + | – | + | + | d | + à 22 °C<br>d à 37 °C |
| Mobilité | + | + | + | + | + | + | + | d | + à 22 °C<br>d à 37 °C |
| Pigment jaune | – | – | – | + | – | – | – | d | – |
| Uréase | – | – | + | – | – | – | – | – | –[1] |
| LDC | – | + | d | – | – | – | | – | + |
| ODC | + | + | + | + | + | + | + | – | + |
| ADH | + | – | – | + | d | d | d | – | – |
| Citrate de Simmons | + | + | + | + | + | d | – | + | – (+ en 3 j) |
| ONPG | + | + | + | + | + | + | + | + | + à 22 °C<br>d à 37 °C |
| Sorbitol | + | + | – | – | + | d | – | d | – |
| Raffinose | + | + | + | + | + | d | | d | – |
| Croissance sur milieu au KCN | + | + | – | + | + | + | + | d | + |

[1] Quelques souches +.

**TABLEAU 34-2-15**

**Caractères différentiels des principales espèces du genre *Serratia*.**

| | *S. marcessens* | *S. liquefaciens*<br>*S. proteamaculans* | *S. rubidaea*<br>*S. marinorubra* | *S. plymuthica* | *S. odorifera* | *S. fonticola* | *S. ficaria* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VP | + | + à 22 °C<br>d à 37 °C | + | + | + | – | d |
| LDC | + | + | d | – | + | d | – |
| ODC | + | + | – | – | d | + | – |
| Indole | – | – | – | – | + | – | – |
| Pigment rouge | d | – | + | d | – | – | – |
| Malonate | – | – | + | – | – | + | – |
| L-arabinose* | – | + | + | + | + | + | + |
| L-rhamnose* | – | d | – | – | + | + | d |
| Raffinose* | – | + | + | + | d | + | d |
| Odeur végétale | – | – | d | – | + | – | + |

* Acidification.

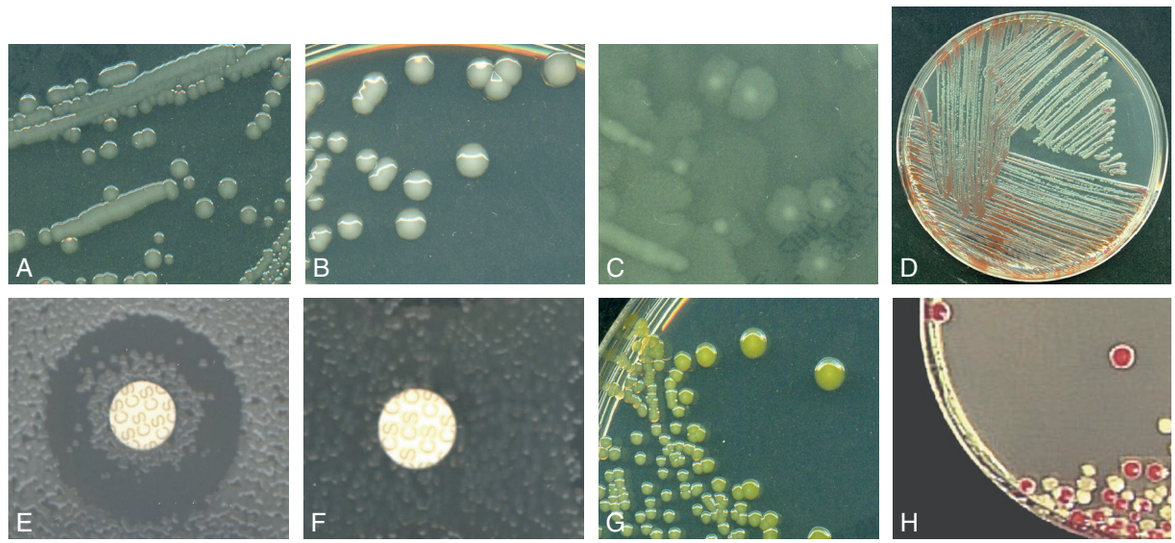



Fig. 34.2.5. – *Aspect des cultures des différentes espèces d'entérobactéries sur géloses ordinaires.*

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli :* Aspect classique des colonies d'entérobactéries | *Klebsiella pneumoniae :* Colonies muqueuses | *Proteus mirabilis :* Envahissement de la gélose en voile ou vagues autour des colonies isolées (essaimage) | *Serratia marcescens :* Expression dupigment rouge (prodigiosine) avec effet « *Quorum-sensing* » |
| *Serratia marcescens :* Résistance à la colistine avec aspect en « cocarde » | *Proteus mirabilis :* Résistance contact à la colistine | *Enterobacter sakasakii :* Production d'un pigment jaune | *Serratia marcescens :* Double population dont l'une produit un pigment rouge (prodigiosine) |

## Genres *Proteus, Providencia, Morganella*

### *Pouvoir pathogène et habitat*

Ce sont toutes des bactéries pathogènes opportunistes. Néanmoins, une distinction doit être faite entre *P. mirabilis* et les autres membres de la tribu. En effet, si *P. mirabilis* est souvent isolé d'infections du tractus urinaire chez des malades « ambulatoires », les autres appartiennent aux germes « hospitaliers » mineurs causant souvent de petites épidémies d'infections urinaires sur sonde dans les services de soins intensifs ou de gériatrie. La distinction porte aussi sur la sensibilité aux antibiotiques. *P. mirabilis* ne produit pas de β-lactamase naturelle, mais près de la moitié des souches expriment une pénicillinase d'origine plasmidique. *P. vulgaris* et *P. penneri* possèdent une β-lactamase particulière parfois dénommée « céfuroximase » qui rend ces espèces résistantes aux pénicillines du groupe A et aux céphalosporines de 1re et 2e générations (à l'exception des céphamycines comme la céfoxitine), mais dont l'activité enzymatique est inactivée par l'acide clavulanique. Les genres *Providencia* et *Morganella* produisent une céphalosporinase naturelle (tableau 34.2.2).

### *Identification*

Certains aspects morphologiques et culturaux peuvent être très indicatifs pour certaines espèces. *P. mirabilis* et *P. vulgaris* ont un aspect très polymorphe au Gram avec des formes longues. Ces deux espèces sont abondamment flagellées et donnent sur milieu ordinaire un envahissement du milieu ou essaimage.

Ce phénomène d'essaimage permet des études épidémiologiques par le test de Dienes. Deux souches différentes – de *P. mirabilis* ou de *P. vulgaris* – ensemencées en deux points opposés d'une boîte de Pétri, de préférence sur milieu trypticase soja 5 % sang de mouton, vont laisser une zone vierge de culture au milieu de la boîte, alors que deux souches identiques envahissent totalement la boîte.

Des systèmes de biotypage permettent des études épidémiologiques pour les *Providencia*. Des systèmes de sérotypie (antigènes somatiques et flagellaires) sont disponibles pour toutes les espèces.

Il n'y a que très peu de problèmes d'identification au sein de cette tribu en dehors de souches qui ont acquis un plasmide lactose et celles qui ont perdu l'enzyme de définition de la tribu : la TDA. La résistance à la colistine est alors la réaction d'orientation essentielle.

## Genre *Tatumella*

Ce genre de création récente ne comporte qu'une seule espèce, *Tatumella ptyseos* (anciennement groupe EF9).

**TABLEAU 34-2-16**

**Caractères différentiels de la tribu des *Proteae*.**

| | *Proteus* | | | *Providencia* | | | *Morganella morganii* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *mirabilis* | *vulgaris* | *penneri* | *alcalifaciens* | *stuartii* | *rettgeri* | |
| Uréase | + | + | + | – | d[1] (15 % +) | + | + |
| Indole | – | + | – | + | + | + | + |
| $H_2S$ | + | + | d | – | – | – | – |
| Citrate de Simmons | d | d | – | + | + | + | – |
| Gaz en glucose | + | + | + | d[2] | – | Trace | + |
| Mannitol | – | – | – | – | d | + | – |
| Adonitol | – | – | – | d[2] | – | + | – |
| Inositol | – | – | – | – | + | + | – |
| Tréhalose | + | d | d | – | + | – | d |
| ODC | + | – | – | – | – | – | + |
| Gélatinase | + | + | d | – | – | – | – |

Tous sont TDA +, résistants à la colistine, ONPG, lactose, malonate, VP, LDC et ADH négatifs (sauf rares souches ONPG + ou lactose + par acquisition de plasmides métaboliques).
[1] Caractères d'origine plasmidique.
[2] Suivant le biotype.

## Pouvoir pathogène et habitat

Cette bactérie a été essentiellement isolée d'expectorations mais aussi d'hémocultures. Elle se comporterait comme un pathogène opportuniste.

## Identification

*T. ptyseos* occupe une place particulière au sein des *Enterobacteriaceae*. Elle en possède les caractères de définition sauf pour le type de flagellation, *T. ptyseos* ne possédant souvent qu'un seul flagelle, et il est en pratique immobile à 37 °C et peu mobile à 25 °C. Sa température optimale de croissance et de 25 °C. Elle présente certains caractères communs avec les *Proteae* : TDA +, ONPG –, lactose –. En outre, elle donne une réponse négative aux tests indole, urée, LDC, ODC, ADH, $H_2S$, gélatinase et positive à la réaction de Voges-Proskauer. Elle est sensible à la colistine mais surtout à la pénicilline G, caractéristique tout à fait remarquable au sein des *Enterobacteriaceae*.

**ANNEXE 34.2.1**

### Milieux permettant l'identification des entérobactéries

**Bouillon nitrate**

• Milieu nécessaire à la mise en évidence d'une nitrate-réductase :
– bouillon ordinaire : 1 l ;
– nitrate de postassium : 1 g.
• Répartir en tubes de 16 × 160, à raison de 5 ml par tube.
• Autoclaver à 120 °C pendant 20 minutes.
• Ce milieu peut être gélosé (15 g d'agar-agar), et utilisé en ensemençant largement la tranche du milieu.

**Milieu de Kligler-Hajna**

• Milieu utilisé pour rechercher la fermentation simultanée du glucose et du lactose, la production d'hydrogène sulfuré, la production de gaz :
– peptone trypsique de caséine : 20 g ;
– lactose : 10 g ;
– chlorure de sodium : 5 g ;
– glucose : 1 g ;
– hyposulfite de sodium : 0,2 g ;
– sulfate ferreux ammoniacal : 0,2 g ;
– rouge de phénol solution à 1 % : 2 ml ;
– agar : 15 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Ajuster le pH à 7,6.
• Répartir en tubes de 16 × 160, à raison de 8 ml par tube.
• Autoclaver à 115 °C pendant 30 minutes.
• Stocker en culot.
• Faire fondre au moment de l'emploi.
• Incliner de telle façon que le culot ait la même hauteur que la pente.
• Ensemencer avec une strie centrale et en piqûre centrale.

**Eau peptonée**

Ce milieu est utilisé pour :
• la croissance des bactéries peu exigeantes ;
• la mise en évidence de la formation d'indole :
– peptone exempte d'indole : 10 g ;
– chlorure de sodium : 5 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Ajuster à pH 7,2.
• Répartir à raison de 5 ml par tube.
• Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes.

**Milieu urée-indole**

Sur ce milieu, il est possible d'effectuer trois recherches :
• présence d'une uréase ;
• présence d'une tryptophane désaminase (TDA) ;
• production d'indole :
– L-tryptophane : 3 g ;
– phosphate monopotassique : 1 g ;
– phosphate dipotassique : 1 g ;
– chlorure de sodium : 5 g ;
– urée : 20 g ;
– alcool à 95° : 10 ml ;
– solution de rouge de phénol à 1 % : 2,5 ml ;
– eau distillée : 1 l.
• Stériliser par filtration sur membrane.
• Répartir à raison de 15 ml par tube et stocker.
• Au moment de l'emploi, répartir stérilement le contenu d'un tube dans des tubes à hémolyse, chacun de ces derniers contenant 1 ml.

**Milieu de Clark et Lubs**

• Milieu utilisé pour les réactions du rouge de méthyle et Voges-Proskauer :
– peptone trypsique de caséine : 5 g ;
– phosphate bipotassique : 5 g ;
– glucose : 5 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Répartir en tubes de 16 × 160, à raison de 5 ml par tube.
• Autoclaver à 115 °C pendant 20 minutes.

**Milieu mannitol mobilité**

• Mise en évidence de la mobilité et de l'utilisation du mannitol :
– peptone pancréatique de viande : 20 g ;
– agar-agar : 4 g ;
– mannitol : 2 g ;
– nitrate de potassium : 1 g ;
– rouge de phénol solution à 1 % : 4 ml ;
– eau distillée : 1 l.
• Dissoudre les ingrédients en chauffant jusqu'à ébullition.
• Ajuster à pH 7,2.
• Répartir en tubes de 16 × 160, à raison de 8 ml par tube.
• Autoclaver à 110 °C pendant 30 minutes.

**Milieu de Taylor**

• Milieu utilisé pour la mise en évidence de la lysine décarboxylase (LDC) :
– L-lysine monochlorhydrate : 5 g ;
– extrait de levure : 3 g ;
– glucose : 1 g ;
– bromocrésol pourpre solution à 1 % : 1,5 ml ;
– eau distillée : 1 l.
• Ajuster à pH : 7,2–7,4.
• Répartir en tubes de 16 × 160, à raison de 4 ml par tube.
• Stériliser à 120 °C pendant 20 minutes.

**Milieux de Moeller**

• Utilisés pour la mise en évidence des décarboxylases ; milieu de base = milieu témoin :
– chlorure de sodium : 5 g ;
– extrait de levure : 3 g ;
– glucose : 1 g ;
– bromocrésol pourpre solution à 1 % : 1,5 ml ;
– eau distillée : 1000 ml.
• Ajuster à pH : 6,3.
• Répartir en 4 volumes de 250 ml : le premier lot sera réparti tel quel à raison de 5 ml dans des tubes de 8 × 180 ; les trois autres lots seront respectivement additionnés de L-lysine monochlorhydrate, de L-ornithine dichlorydrate, de L-arginine monochlorhydrate, à raison de 5 g par litre.
• Ces milieux seront répartis à raison de 5 ml en tubes de 8 × 180.
• Autoclaver à 120 °C pendant 29 minutes.
• Ensemencer avec une suspension microbienne dense.

**Milieu au KCN**

• Mise en évidence de la possibilité de culture en présence de cyanure de potassium (KCN) :
– protéose peptone n °3 (Difco) : 3 g ;
– chlorure de sodium : 5 g ;
– phosphate monopotassique : 0,225 g ;
– phosphate disodique : 5,64 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Ajuster à pH 7,6.
• Répartir en tubes de 8 × 180, à raison de 2,5 ml par tube.
• Stériliser par autoclavage à 120 °C pendant 15 minutes.
• Au moment de l'emploi, ajouter 0,25 ml d'une solution de KCN titrant 450 µg/ml.

**Milieu à l'acétate**

• Milieu utilisé pour différencier *Escherichia coli* de *Shigella* :
– acétate de sodium : 2 g ;
– chlorure de sodium : 5 g ;
– sulfate de magnésium : 0,2 g ;
– phosphate d'ammonium : 1 g ;
– phosphate dipotassique : 1 g ;
– bleu de bromothymol : 0,08 g ;
– agar-agar : 17 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Ajuster à pH 6,8.
• Répartir en tubes, à raison de 7 ml par tube.
• Autoclaver à 120 °C pendant 15 minutes.
• Incliner de telle façon que l'on obtienne un culot et une pente.

**Milieu au malonate**

• Milieu utilisé pour l'identification des entérobactéries :
– extrait de levure : 1 g ;
– sulfate d'ammonium : 2 g ;
– phosphate bipotassique : 0,6 g ;
– phophate monopotassique : 0,4 g ;
– chlorure de sodium : 2 g ;
– malonate de sodium : 3 g ;
– glucose : 0,25 g ;
– bleu de bromothymol 1 % : 2,5 ml ;
– eau distillée : 1000 ml.
• Répartir en tubes de 16 × 160, à raison de 5 ml par tube.
• Stériliser à 120 °C pendant 15 minutes.

**Milieu de Worfel-Fergusson**

• Ce milieu favorise l'apparition des capsules chez *Klebsiella* spp. et *Escherichia coli :*
– chlorure de sodium : 2 g ;
– sulfate de potassium : 1 g ;
– sulfate de magnésium : 0,25 g ;
– saccharose : 20 g ;
– extrait de levure : 2 g ;
– agar : 15 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Répartir en flacons.
• Stériliser à 120 °C pendant 15 minutes.
• Couler en boîtes de Pétri au moment de l'emploi.

**Gélose de Sven Gard**

• Mise en évidence de l'inversion de phase des antigènes H des salmonelles :
– glucose : 1 g ;
– extrait de levure : 1 g ;
– extrait de viande : 5 g ;
– hydrolysat trypsique de caséine : 17 g ;
– peptone de soja : 3 g ;
– chlorure de sodium : 5 g ;
– phosphate de potassium : 2,5 g ;
– glucose : 2,5 g ;
– agar-agar : 5 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Ajuster à pH 7,6.
• Répartir en flacons de 30 ml, à raison de 20 ml par flacon.
• Stériliser par autoclavage à 110 °C pendant 20 minutes.

**Milieu au citrate de Simmons**

• Milieu utilisé pour mettre en évidence la possibilité, pour une bactérie, de cultiver en présence de citrate de sodium comme seule source de carbone :
– chlorure de sodium : 5 g ;
– sulfate de magnésium 7H2O : 0,2 g ;
– phosphate d'ammonium PO4 H2 (NH4) : 1 g ;
– phosphate dipotassique PO4 H K2 ; 2 g ;

▶

– citrate trisodique : 2 g ;
– solution de bleu bromothymol 1 % : 8 ml ;
– agar : 15 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Ajuster à pH 7–7,2.
• Répartir en tubes de 16 × 160, à raison de 7 ml par tube.
• Autoclaver à 115 °C pendant 30 minutes.
• Stocker en culot.
• Incliner au moment de l'emploi, de telle sorte que la pente fasse toute la hauteur du tube.
• Ensemencer en stries serrées ou en strie longitudinale.

**Milieu au citrate de Christensen**

• Milieu utilisé pour l'identification des entérobactéries. Permet de différencier *Escherichia coli* de *Shigella* :

– citrate trisodique : 3 g ;
– glucose : 0,2 g ;
– extrait de levure : 0,5 g ;
– phosphate monopotassique : 1 g ;
– chlorure de sodium : 5 g ;
– rouge de phénol solution à 1 % : 4 ml ;
– agar : 15 g ;
– eau distillée : 1 l.
• Ajuster à pH : 6,9.
• Répartir en tubes de 16 × 160, à raison de 7 ml par tube.
• Autoclaver à 115 °C pendant 30 minutes.
• Stocker en culot.
• Incliner sur la moitié de la hauteur en laissant un petit culot.
• Ensemencer en strie centrale.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 3 Paris : Ellipses ; 2000.

Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010 ; 48 : 1549–54.

Bonnet R. Béta-lactamines et entérobactéries. In : Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. Antibiogramme. 2 Paris : ESKA ; 2006. p. 141–62.

Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity M. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2 New York : Springer-Verlag ; 2005 vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria).

Euzéby JP. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire http : //www.bacdico.net.

Farmer III JJ. *Enterobacteriaceae* : introduction and identification. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology. 8 Washington D.C. : American Society for Microbiology ; 2003. p. 636–53.

Farmer III JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1985 ; 21 : 46–76.

Frankel G, Giron JA, Valmassoi J, Schoolnik GK. Multigene amplification : simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. Mol Microbiol 1989 ; 3 : 1729–34.

Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Précis de bactériologie clinique. Paris : Editions ESKA ; 2000.

Janda M. New members of the family Enterobacteriaceae. In : Dworkin M, et al., editors. The Prokaryotes : an evolving electronic resource for the microbiological community. 3 New York : Springer-Verlag ; 2002.

Le Minor L, Véron M. Bactériologie médicale. 2 Paris : Flammarion Médecine-Sciences ; 1989.

Lüscher D, Altwegg M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. Mol Cell Probes 1994 ; 4 : 285–90.

Marchal N, Bourdon JL, Richard C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris : Doin ; 1982.

Michel S, Gaillard JL, Berche P. Bactériologie. Bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion Médecine-Sciences ; 1999.

O'Hara CM, Weinstein P, Miller JM. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology. 8 Washington, D.C. : American Society for Microbiology ; 2003. p. 185–207.

Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heeseman J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 701–5.

**ADRESSES UTILES**

**Centre national de référence des *Salmonella***
Unité de biodiversité des bactéries pathogènes émergentes
Institut Pasteur
25–28, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83 39 – Fax : 01 45 68 88 37
E-mail : salmonella@pasteur.fr
http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmcnr-index.html

**Centre national de référence des *Escherichia coli* et *Shigella***
Unité de biodiversité des bactéries pathogènes émergentes
Institut Pasteur
25–28, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83 39 – Fax : 01 45 68 88 37
E-mail : colishig@pasteur.fr
http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/ecolishig-index.html

**Laboratoire associé**
Service de microbiologie, hôpital Robert-Debré
48, boulevard Serrurier, 75019 Paris
Tél. : 01 40 03 23 40 – Fax : 01 40 03 24 50

## Chapitre 34.3

# *Vibrionaceae – Aeromonadaceae – Plesiomonas*

O. Barraud, F. Denis, M.-C. Ploy

## Généralités

Ces trois genres possèdent des caractéristiques communes qui expliquaient leur regroupement dans la famille des *Vibrionaceae* :

- morphologiques : mobilité par ciliature polaire ;
- biochimiques : aéro-anaérobies facultatifs fermentant les glucides ;
- catalase négative, oxydase positive.

Actuellement, seuls les *Vibrio*, dont l'espèce type est *Vibrio cholerae*, restent dans cette famille. Les *Aeromonas* sont inclus dans celle des *Aeromonodaceae*, les *Plesiomonas,* avec leur unique espèce *P. shigelloides*, appartenant à une entité encore mal définie pour laquelle le Bergey's Manual 2004 avait proposé un rattachement aux *Enterobacteriaceae*.

Les caractéristiques principales des trois genres sont regroupées dans le tableau 34.3.1.

**TABLEAU 34-3-1**

**Caractères différentiels Vibrio-Aeromonas-Plesiomonas.**

| | *Vibrio* | *Aeromonas* | *Plesiomonas* |
|---|---|---|---|
| Ciliature | Pm | Pl | Pl |
| Oxydase | +* | + | + |
| Halophilie | V | – | – |
| Sensibilité 0129 | +* | – | V |
| Gélatinase | + | + | – |
| Gaz en glucose | – | V | – |
| Arginine dihydrolase | –* | +* | + |
| Ornithine décarboxylase | V | –* | + |

Pl : polaire lophotriche ; Pm : polaire monotriche ; V : variable.
* Quelques exceptions.

## Genre *Vibrio*

### Généralités

Ce sont des bacilles à Gram négatif généralement isolés, droits ou incurvés, assez courts (1,5 à 3,0 µm), parfois franchement cocobacillaires.

Ils sont mobiles par ciliature polaire, le plus souvent monotriche, en milieu liquide. Des formes immobiles ont récemment été observées.

Les *Vibrio* n'ont pas d'exigence nutritive particulière si ce n'est l'halophilie de certaines espèces. Les températures de culture vont de 18 à 38 °C et le pH permettant la culture va de 6 à 9.

Le métabolisme est oxydo-fermentatif, le glucose étant fermenté sans gaz.

La majorité des souches est oxydase positive (sauf *V. metschnikovii*) et sensible au composé vibriostatique O/129 (2-4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) ; on utilise des disques chargés à 10 µg (Oxoid 0/129 disks). Si *V. cholerae* 0-1 est généralement sensible, le sérogroupe O/139 est résistant à l'O/129. Cette résistance est toujours associée à une résistance au triméthoprime. Certaines souches de *V. cholerae* O-1 et non O-1 résistantes à l'O/129 et au triméthoprime ont aussi été décrites. Cette résistance croisée est portée par un plasmide ou un transposon et peut être transférable d'une souche à l'autre.

## Habitat et pouvoir pathogène

On distingue des espèces halophiles (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, etc.) et d'autres halotolérantes (*V. cholerae*, *V. mimicus*).

L'espèce *V. cholerae*, strictement humaine, est éliminée en quantité dans les selles des malades atteints de choléra jusqu'à $10^6$ à $10^8$ vibrions/ml de selles) et ne persiste dans l'environnement que de manière éphémère car c'est une bactérie assez fragile.

Les souches toxinogènes de *V. cholerae* sont responsables du choléra humain qui peut revêtir différents aspects plus ou moins graves, dominés par un début brutal avec une diarrhée massive et émission de selles afécales « eau de riz », pouvant atteindre 10 à 50 selles par jour (3 à 15 l éliminés par 24 heures), accompagnées fréquemment de vomissements sans fièvre. Il existe des formes moins graves et d'autres atypiques.

L'incubation après contamination directe (mains sales) ou indirecte (aliments) dure de quelques heures à 5 jours.

Le choléra entraîne une mortalité de 1 à 5 % ; en l'absence de traitement, celle-ci peut dépasser 50 %.

Les souches de *V. cholerae* non toxinogènes peuvent être retrouvées dans des diarrhées, souvent plus bénignes, mais parfois avec des localisations extradigestives.

L'agent du choléra absorbé par voie orale en quantité suffisante pour franchir la barrière gastrique et le pylore va venir adhérer aux cellules de la bordure en brosse de la partie proximale de l'intestin grêle grâce à des *pili* permettant d'adhérer aux entérocytes. Il libère la toxine cholérique (CT), holoprotéine thermolabile avec deux composants A et B. Cette toxine entraîne une accumulation de l'AMPc avec pour effet la sécrétion d'ions chlorure, de bicarbonates et d'eau, et l'inhibition de réabsorption du sodium, d'où la diarrhée aqueuse avec perte d'électrolytes. D'autres toxines peuvent être produites.

La production de toxines par *V. cholerae* est liée à l'intégration dans le génome bactérien d'un bactériophage CTX.

Pendant plus d'un siècle, près de 200 sérogroupes ont été identifiés, seuls connus comme étant responsables de choléra, deux biotypes *cholerae* et *El Tor* et ses trois sérotypes Inaba, Ogawa et Hikojima. À la fin de 1992, sont apparus des choléras dus à des souches *V. cholerae* O139 dites « Bengale » car les premières épidémies se sont déclarées au Bengladesh.

Les souches de *V. cholerae* non O-1-non O-139 (non agglutinées par les sérums 0-1 et 0-139) peuvent provoquer des atteintes digestives de type entéro-invasif ou être à l'origine de manifestations extradigestives variées plus ou moins sévères.

Les autres espèces de *Vibrio* ainsi que les souches non O-1 sont largement répandues dans la nature (eaux salées, faune marine, algues, vase, etc.).

Parmi les autres espèces de vibrions qui peuvent être retrouvées chez l'homme, on trouve :

- *V. parahaemolyticus*, agent de diarrhées aiguës chez l'homme après ingestion de fruits de mer contaminés, les symptômes survenant souvent 2 à 6 heures après le repas ;
- *V. alginolyticus* est isolé à partir de prélèvements cutanés après contact avec de l'eau de mer ; c'est le cas aussi de *V. vulnificus* qui peut, en outre, se présenter sous forme septicémique après ingestion de fruits de mer.
- D'autres espèces de *Vibrio* ont parfois été associées à des pathologies chez l'homme (*V. hollisae*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*).

## Prélèvements

Les selles constituent le prélèvement majeur en cas de suspicion de choléra ou d'atteinte digestive due à un *Vibrio*. Elles sont recueillies dans un récipient stérile étanche, le plus tôt possible au cours de la maladie, avant tout traitement antibiotique et transportées en sachet scellé, clairement identifié.

Dans certains cas – suspicion de « choléra sec » –, on peut être amené à pratiquer un écouvillonnage rectal.

Si l'examen est différé pour des raisons d'intendance, il est conseillé de pratiquer sur place un ensemencement en eau peptonée salée (2 % NaCl) et alcaline (pH 9) et d'adresser le tube à vis au laboratoire en même temps que la selle dans un emballage aux normes en vigueur. Il est également possible d'utiliser comme milieu de transport le milieu de Cary-Blair.

Il est aussi possible d'imprégner du papier filtre avec les selles ; ce système permet de conserver viables les souches de *Vibrio* pendant 5 semaines.

Dans le cas de manifestations autres que la symptomatologie digestive, divers prélèvements peuvent être effectués (hémocultures, prélèvements cutanés, pus profonds, liquides de ponction, etc.). Les échantillons d'eaux, d'aliments doivent être recueillis dans des flacons stériles contenant du chlorure de sodium et gardés à +4 °C avant analyse réalisée dans les 8 à 12 heures. L'eau devra être filtrée à travers une membrane de 0,45 µm et déposée sur milieu sélectifs TCBS (thiosulfate de sodium-citrate de sodium-bile de bœuf-saccharose).

## Examen de l'échantillon

Les selles cholériques sont afécales avec un aspect riziforme.

Au microscope à l'état frais, on observe du mucus, pas de leucocytes, mais une flore monomorphe de bacilles incurvés mobiles qui apparaissent Gram négatif après coloration. Il existe une technique d'immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux anti-O1 permettant une identification de *V. cholerae* O1, mais cela est réservé à quelques laboratoires spécialisés. La morphologie, notamment à partir des cultures, peut être atypique et prendre l'aspect de sphéroplastes.

## Mise en culture

Il est conseillé d'ensemencer en parallèle (fig. 34.3.1) des milieux d'enrichissement et d'isolement :

- enrichissement en milieu liquide :
- eau peptonée alcaline à 1 % et 3 % de NaCl ; ou
- milieu taurocholate-tellurite-peptone.

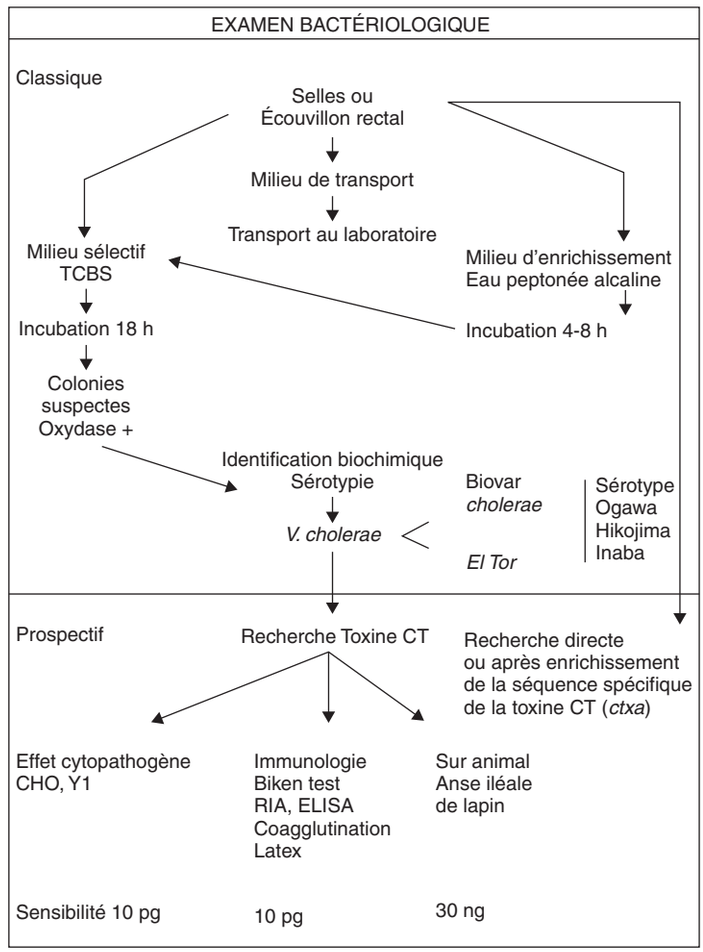



**Fig. 34.3.1.** – *Étapes du diagnostic bactériologique direct de* Vibrio cholerae *: diagnostic classique et prospectif.*

Ce milieu d'enrichissement sera repiqué sur milieu solide d'isolement après 6 à 8 heures d'incubation à 37 °C.

La culture en milieu liquide est caractéristique et forme un voile à la surface du milieu.

Concernant l'isolement en milieu solide, on distingue des milieux :

- peu sélectifs : gélose nutritive avec 0,1 % de Teepol, gélose trypticase soja alcaline (pH 9), gélose Mueller-Hinton, qui peut également servir pour tester l'activité amylasique, la sensibilité au 0/129 et à la polymyxine ;
- sélectifs : gélose TCBS sur laquelle les colonies saccharose positives apparaissent en jaune (c'est le cas de *V. cholerae*) et négatives en vert (fig. 34.3.2).

Ce milieu est conseillé ; il est assez sélectif, inhibant *Pseudomonas* et *Aeromonas*, mais pas toujours les *Proteus* ou des bactéries à Gram positif.

À noter que, sur ce milieu, la réaction d'oxydase est aléatoire et que certaines souches de *V. cholerae* n'ont pas la coloration attendue (notamment saccharose négative).

La gélose TTG (taurocholate-tellurite-gélatine) est moins sélective que le TCBS.

**Fig. 34.3.2.** – *Aspect des colonies de* Vibrio cholerae *sur milieu TCBS.*

**TABLEAU 34-3-2**

**Caractères différentiels des principales espèces de vibrions halophiles ou non halophiles.**

| | Oxydase | Nitrate réductase | Croissance | | | ADH | LDC | ONPG | VP | Indole |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TCBS | sans NaCl | 1 % NaCl | | | | | |
| *V. cholerae* | + | + | J* | + | + | – | + | + | V | + |
| *V. mimicus* | + | + | V | + | + | – | + | + | – | + |
| *V. fluvialis* | + | + | J | – | + | + | – | V | – | – |
| *V. vulnificus* | + | + | V | – | + | – | + | + | – | + |
| *V. parahaemolyticus* | + | + | V | – | + | – | + | – | – | + |
| *V. alginolyticus* | + | + | J | – | + | – | + | – | + | + |
| *V. anguillarum* | + | + | J | + | + | + | – | + | +* | + |
| *V. metschnikovii* | – | – | J ou V | – | + | V | V | V | + | V |

TCBS (milieu Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose).
J : jaune = saccharose +, V : vert = saccharose –.
* Quelques exceptions.

## Caractères principaux

Les caractères principaux des vibrions les plus fréquemment isolés sont colligés dans le tableau 34.3.2.

## *Vibrio cholerae*

### *Diagnostic direct*

#### Identification présomptive

Cinq colonies suspectes différentes seront étudiées. Sur milieu TCBS, elles apparaissent comme de grandes colonies jaunes convexes. Leur coloration tend au vert si l'incubation est prolongée au-delà de 24 heures.

L'orientation du diagnostic se fera sur l'aspect au Gram où les bactéries apparaissent fréquemment coccobacillaires et sur la mobilité (fig. 34.3.3). On pourra tester vibriostatique 0/129 et polymyxine sur milieu de Mueller-Hinton ; les souches 0-1 sont généralement sensibles au vibriostatique et les 0-139 résistantes.

La réaction d'oxydase pourra être tentée. Une agglutination directe sur lame avec chacun des deux sérums anti-O-1 et anti-O-139 sera alors pratiquée. Si ce test est négatif, il faudra reprendre l'agglutination après chauffage de la suspension bactérienne 2 heures à 100 °C.

En période épidémique, ces quelques tests peuvent être suffisants.

Fig. 34.3.3. – *Aspect typique incurvé de* Vibrio cholerae.

### *Diagnostic de certitude*

L'orientation est donnée par les réactions précédentes. L'identification complète sera entreprise avec l'ensemble des réactions indiquées dans les tableaux 34.3.1 et 34.3.2.

- **Identification biochimique :** l'utilisation de galeries prêtes à l'emploi telle la galerie API 20 E® permet d'obtenir des résultats satisfaisants à condition de réaliser la suspension bactérienne en solution à 1 % de NaCl. On peut aussi utiliser des galeries API 32 GN® ou API ID 32 E®. Cela permet de confirmer le diagnostic de *Vibrionaceae*, puis d'espèce *V. cholerae* (tableau 34.3.2). La différenciation entre les biovars *cholerae* classique et *El Tor* repose sur les caractères indiqués dans le tableau 34.3.3. En pratique, cela se limite à la détermination de la sensibilité à la polymyxine.

**TABLEAU 34-3-3**

**Diagnostic différentiel entre les biovars *cholerae* et *El Tor*.**

| | *V. cholerae* classique | *V. cholerae El Tor* |
|---|---|---|
| Hémolyse (sang de mouton) | – | + (– depuis 1970) |
| Polymyxine (50 U) | Sensible | Résistant |
| VP | – | + |

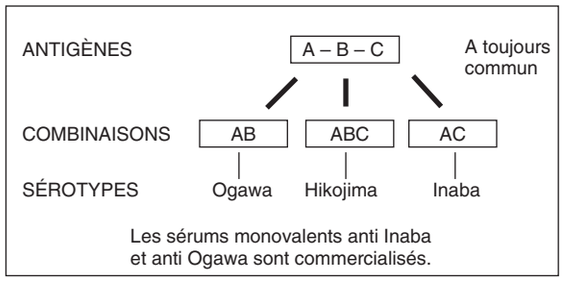



**Fig. 34.3.4.** – *Sérotypes de* Vibrio cholerae.

- **Identification sérologique :** les souches de sérogroupe O-1. Ce sérogroupe O-1 comporte trois spécificités antigéniques (A, B, C) aussi bien pour le biovar classique que pour le biovar *El Tor*, la combinaison de ces antigènes aboutissant à l'individualisation de trois sérotypes (BD Bioscience) (fig. 34.3.4). Les sérotypes Ogawa et Inaba sont les plus fréquents.

Toute souche de *Vibrio cholerae* O-1 doit être envoyée au Centre national de référence (CNR) et la déclaration est obligatoire :

- **souches O-1 atypiques :** on rencontre des souches de *Vibrio cholerae* O-1 résistantes au composé vibriostatique et ne fermentant pas le saccharose. Ces souches posent un gros problème d'identification différentiel avec *V. mimicus*. L'agglutination par l'anti-O-1 permet cependant de les différencier. Par ailleurs, un petit nombre de souches de *V. cholerae* qui agglutinent avec des antisérums O-1 ont été isolées dans le monde entier tant dans les zones endémiques du choléra que dans des zones indemnes de choléra. Elles ne produisent pas de toxine CT ;
- **souches non O-1 :** devant une souche de *V. cholerae* n'agglutinant pas avec l'antisérum O-1, on tente devant un syndrome cholériforme une agglutination avec l'antisérum O-139 ;
- **souches non O-1, non O-139 :** elles doivent faire l'objet d'études complémentaires telle la recherche de toxine CT. On rencontre ce type de souche en zone non endémique avec des tableaux cliniques de gravité variable.

À noter que des tests rapides (quelques minutes) reposant sur des méthodes immunologiques ont été développés récemment ; celles-ci recherchent le LPS de *V. cholerae* par immunochromatographie. Ces tests sont applicables sur selles ou écouvillonnage rectal. Ils permettent la détection des deux sérogroupes O-1 et O-139 avec des sensibilités et des spécificités supérieures à 90 %.

### Mise en évidence de la toxine cholérique (CT)

La toxine cholérique peut classiquement être mise en évidence par des techniques in vivo comme l'anse intestinale ligaturée chez le lapin ou sur culture de cellules (cellules Y1 ou cellules rénales de hamster chinois). De même, sur souche de *V. cholerae*, on peut rechercher la toxine par méthode immunologique (immunodiffusion radiale-Bicken test), mais un test ELISA utilisant le ganglioside GM1 pour la recherche de CT et aussi de la toxine LT d'*E. coli*, de même qu'un test d'agglutination au latex ont été proposés – ils ne sont pas disponibles en France.

En fait, en plus des techniques classiques de diagnostic du choléra par isolement et identification de la souche, les techniques de biologie moléculaire permettent la recherche de la toxine sur la souche mais aussi dans les selles par amplification génique et détection du gène de la sous-unité A de la toxine (*ctx*A). La technique d'amplification par PCR du gène codant la toxine s'est avérée plus sensible que les autres méthodes de détection de la CT.

### Sensibilité aux antibiotiques

Outre l'étude de la sensibilité à la polymyxine, utile au diagnostic de biovar, un antibiogramme doit être pratiqué en raison de l'apparition de souches multirésistantes soit en milieu solide sur gélose Mueller-Hinton, soit en milieu liquide sur systèmes automatisés. L'ampicilline est inactive sur la plupart des souches. Des résistances aux tétracyclines, au triméthoprime et au cotrimoxazole ont été fréquemment décrites. Les *Vibrio* demeurent en général sensibles aux aminosides, au chloramphénicol, aux quinolones et aux céphalosporines de 3e génération. Des souches multirésistantes ont émergé du fait de l'acquisition de plasmides, de transposons et d'intégrons.

### *Diagnostic indirect : sérodiagnostic*

La recherche d'agglutinines, d'anticorps vibriocides ou d'anticorps antitoxine CT n'a pas d'intérêt pour un diagnostic en phase aiguë ; elle en a tout au plus pour porter un diagnostic rétrospectif.

## Autres vibrions

- *Vibrio parahaemolyticus* : les prélèvements doivent être ensemencés en double comme indiqué pour *V. cholerae* (milieu d'enrichissement, milieu sélectif : TCBS), l'eau peptonée salée étant repiquée au bout de 6 à 8 heures sur milieu solide. L'incubation des milieux se fait à 30 °C avec observation en 48 heures de colonies bleu-vert sur TCBS. Les vibrions apparaissent très mobiles. Les souches tolèrent 7 à 8 % de NaCl alors que *V. alginolyticus* peut cultiver sur 10 % de NaCl. *V. parahaemolyticus* (tableau 34.3.2) est VP, ONPG, saccharose et arabinose

négatifs. Certaines souches présentent une hémolyse β sur milieu de Wagatsuma (contenant 5 % de sang défibriné de lapin ou humain) ; elles sont dites Kanagawa positif et sont pathogènes pour l'homme contrairement aux Kanagawa négatifs non hémolytiques. Récemment, une PCR en temps réel détectant le gène *tdh* codant l'hémolysine thermostable de *V. parahaemolyticus* a été développée et est très performante.

- *Vibrio alginolyticus* est plus halophile que *V. cholerae*, avec lequel il partage beaucoup de caractères.
- *Vibrio vulnificus* présente un ONPG rapide, est lactose positif et résiste constamment à la colistine. À noter qu'il existe des colonies de *V. vulnificus* « en léthargie » viables, mais non ou difficilement cultivables.

## Genre *Aeromonas*

Il s'agit de bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies, oxydase positive, fermentant le glucose avec ou sans gaz, réduisant les nitrates en nitrites, mobiles par ciliature polaire ou immobiles, résistants au composé vibriostatique O/129.

### Pouvoir pathogène et habitat

Les *Aeromonas* sont des bactéries des eaux, contaminant fréquemment les eaux douces ou de lagune et certains aliments tels les coquillages et les poissons. Ces bactéries peuvent persister plusieurs mois ou années dans les eaux ou les sols. En dehors d'*A. salmonicida*, les *Aeromonas* peuvent infecter l'homme après immersion (noyades) ou après ingestion de produits contaminés (y compris eau « potable »). Ces bactéries sont impliquées dans la contamination de plaies, souvent après contact avec de l'eau polluée, dans des diarrhées (du fait de la production d'entérotoxines), mais également dans des septicémies ou des infections graves hospitalières sur terrain prédisposé. Des infections pulmonaires après noyade ont aussi été décrites.

À l'heure actuelle, parmi les 16 espèces génomiques identifiées, trois espèces mobiles d'*Aeromonas* sont les plus fréquemment retrouvées dans des infections humaines : *A. hydrophila, A. caviae* et *A. veronii* subsp. *sobria*.

### Caractères bactériologiques

La température optimale de croissance est de 30 °C (sauf *A. salmonicida*). Le pH optimal est de 7. Les souches ne cultivent pas en milieu hypersalé. Les colonies d'*Aeromonas* apparaissent en 24 heures en milieu solide et ressemblent à celles des coliformes. La culture est possible sur milieux trypticase-soja ou gélose au sang, mais aussi sur milieux sélectifs MacConkey, EMB ou Drigalski, voire pour les selles sur milieu rendu sélectif par l'addition d'ampicilline pour les coprocultures. La résistance constante au composé vibriostatique O/129 permet de les différencier aisément des *Vibrio*. Le caractère gélatinolytique, l'absence d'ODC permettent de les distinguer de *Plesiomonas shigelloides* (tableau 34.3.4). À noter que le milieu CIN utilisé pour l'isolement des *Yersinia* permet aussi la croissance des souches d'*Aeromonas*.

L'identification phénotypique au niveau de l'espèce est assez aisée pour les espèces courantes. Mais les galeries ne sont fiables que si les réactions d'orientation et la différenciation *Vibrio/Aeromonas* ont été préalablement réalisées, et en pratiquant correctement les tests biochimiques, notamment d'étude d'activité décarboxylasique, d'hydrolyse de l'esculine ou de production d'acétoïne.

**TABLEAU 34-3-4**

**Caractères différentiels des *Aeromonas*, *Plesiomonas*.**

| *Caractères d'orientation* | *Aeromonas* | | | | *Plesiomonas shigelloides* |
|---|---|---|---|---|---|
| | *hydrophila* | *caviae* | *Veronii* subsp. | | |
| | | | *sobria* | *veronii* | |
| Gaz glucose | + | – | + | + | – |
| VP | + | – | + | + | – |
| ADH | + | + | + | – | + |
| LDC | + | – | + | + | + |
| ODC | – | – | – | + | + |
| Esculine | + | + | – | + | – |
| Arabinose | + | + | – | – | – |
| Saccharose | + | + | + | + | – |
| m-Inositol | – | – | – | – | + |
| Sensibilité : | | | | | |
| – Ampicilline | R | R | R | R | S |
| – Céfalotine | R | R | S | S | S |

### Sensibilité aux antibiotiques

Les *Aeromonas* sont généralement résistants aux aminopénicillines et carboxypénicillines ainsi qu'à la céfalotine. Les céphalosporines de 3e génération sont régulièrement actives, mais des souches résistantes sont décrites.

Les *Aeromonas* sont très sensibles aux fluoroquinolones, sensibles aux aminosides et à l'association triméthoprime–sulfaméthoxazole.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est indispensable sur toutes les souches susceptibles d'être pathogènes, des souches résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques ayant été décrites. La sensibilité des *Aeromonas* à la colistine est variable.

## Genre *Plesiomonas*

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce : *Plesiomonas shigelloides*.

### Caractères bactériologiques

C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, mobile, oxydase positive, fermentant le glucose sans production de gaz, réduisant les nitrates en nitrites ; mais contrairement aux *Vibrio* et *Aeromonas*, cette espèce ne produit pas d'enzymes exocellulaires (DNAse, gélatinase, etc.). La température de croissance optimale est de 37 °C et ne cultive pas en dessous de 8 °C. *Plesiomonas* est résistant à l'O129 si on utilise des disques chargés à 10 µg, mais sensible si les disques sont chargés à 150 µg. Certaines souches ont des communautés antigéniques avec les *Shigella* et peuvent donner des agglutinations croisées avec les antisérums utilisés pour agglutiner les *Shigella*. *Plesiomonas* cultive bien sur milieux ordinaires.

### Pouvoir pathogène et habitat

*Plesiomonas shigelloides* est une bactérie des eaux qui peut être retrouvée dans l'intestin de divers animaux. Chez l'homme, cette espèce a été retrouvée dans des selles de sujets diarrhéiques surtout en zone tropicale et occasionnellement en Europe. Les hypothèses physiopathologiques concernant le mécanisme de ces diarrhées – entéro-invasivité ou entérotoxicité – n'ont pas reçu de confirmation à ce jour.

Cette espèce est retrouvée principalement :

- dans les gastro-entérites de l'adulte ;
- dans des septicémies chez des sujets immunodéprimés ou ayant des pathologies sous-jacentes (drépanocytose, thalassémie, etc.) ;
- dans des méningites principalement néonatales avec un pronostic sombre (75 % de décès).

### Identification

Les caractères ODC, LDC, ADH positifs et la fréquente sensibilité au composé vibriostatique sont les éléments majeurs d'orientation (tableau 34.3.4). Les géloses ordinaires peuvent être utilisées pour isoler *P. shigelloides* à partir des selles ; les milieux sélectifs usuels utilisés pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella* permettent de cultiver *P. shigelloides*. Sur gélose au sang, les souches de *Plesiomonas* ne sont pas hémolytiques, contrairement aux *Vibrio* et *Aeromonas*.

*P. shigelloides* est fréquemment résistant aux aminosides, aux amino-, carboxy- et uréidopénicillines, mais reste sensible aux céphalosporines et à l'imipénem notamment et également aux fluoroquinolones.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Abbott SL. Aeromonas. In : Murray P, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 8 Washington : ASM Press ; 2003. p. 701–5.

Denis F. Les vibrions. In : Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H, editors. Bactériologie clinique. Paris : Ellipses ; 2000.

Dodin A, Fournier JM. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du vibrion cholérique et des autres vibrions. Paris : Institut Pasteur, CLRE ; 1992.

Farmer JJ, Janda JM, Birkhead K. Vibrio. In : Murray P, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 8 Washington : ASM Press ; 2003. p. 706–18.

Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2003 [chapter 9].

Hansen W. Vibrio. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2003.

Monteil H, Harf-Monteil C. Les infections à *Aeromonas*. Presse Med 1997 ; 26 : 1790–8.

Monteil H, Harf-Monteil C. *Plesiomonas shigelloides* : une bactérie exotique. Lettre Infect 1997 ; 6 : 255–62.

Nato F, Boutonnier M, et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *V. cholerae* 0–1 and 0–139 in stool samples. Clin Diagn Lab Immunol 2003 ; 10 : 476–8.

Richard C, Denis F, Papa F. *Vibrio parahaemolyticus*. Souches humaines et de l'environnement marin. Bilan de 113 souches. Bull Ass Anc Élèves Inst Pasteur 1981 ; 89 : 16–21.

Richard C, Gammanco G, Popoff M. *Vibrio parahaemolyticus*. Isolement et diagnostic biologique. Ann Biol Clin (Paris) 1974 ; 32 : 33–46.

Wachsmuth JK, Blake PA, Olsvik O. *Vibrio cholerae* and cholera. Washington : ASM Press ; 1994.

Chapitre 34.4

# Bacilles à Gram négatif non fermentaires

C. Martin

## Généralités

Sous le vocable de « bacilles à Gram négatif non fermentaires » sont regroupées plusieurs familles et genres de bactéries mobiles ou immobiles, cultivant sur milieux ordinaires et possédant un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons). À noter que certains genres peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose. Ces bacilles à métabolisme oxydatif ne fermentent pas les sucres en anaérobiose et sont qualifiés de « non fermentants » ou « non fermentaires ».

Dans un laboratoire de bactériologie médicale, 10 à 15 % des bacilles à Gram négatif isolés sont des bacilles non fermentaires et les trois quarts appartiennent à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Les autres espèces isolées appartiennent aux genres *Burkholderia*, *Stenotrophomas*, *Chryseobacterium, Achromobacter* et *Acinetobacter*.

Étant donné l'étendue, l'hétérogénéité et la complexité des données taxonomiques, nous présenterons les données concernant les principales espèces bactériennes rencontrées en pratique médicale en fonction de caractères d'orientation simples et nous rappellerons certaines anciennes dénominations pour que le lecteur ne soit pas désorienté par les nouvelles appellations. En dehors de quelques espèces (*P. aeruginosa*) dont l'identification pose peu de problèmes, l'identification phénotypique des autres bacilles à Gram négatif non fermentaires est difficile et, pour un nombre important d'isolats, ne permet pas de préciser l'espèce. Le recours à des méthodes moléculaires (séquençage de gènes : *ADNr 16S*, *rpo*B, *gyr*B, *rec*A, etc.) est alors nécessaire.

### Taxonomie

Le vaste groupe des bacilles à Gram négatif non fermentaires a fait l'objet de nombreux remaniements taxonomiques avec l'apport des données génomiques, ayant pour conséquence l'établissement d'une classification plus précise concernant les *Pseudomonas* et apparentés (tableau 34.4.1) et la réassignation dans de nouveaux genres ou le transfert dans des genres déjà existants (annexe 34.1.1). Par exemple, le genre *Pseudomonas* a hébergé un nombre croissant d'espèces par manque de caractères phénotypiques spécifiques, puis a été restreint à une cinquantaine d'espèces après l'apport des travaux génétiques. De nouveaux genres (*Burkholderia, Brevundimonas, Comamonas, Ralstonia, Stenotrophomonas*) ont été créés pour accueillir les espèces exclues. Parmi les autres bacilles non fermentaires, la famille des *Flavobacteriaceae* regroupant de nombreuses espèces dont le caractère commun était une pigmentation jaune a subi également de nombreux remaniements et comprend actuellement les genres *Capnocytophaga* (non traité dans ce chapitre), *Chryseobacterium, Elizabethkingia, Empedobacter, Myroides, Weeksella, Sphingobacterium* et le genre *Flavobacterium* restreint à une dizaine d'espèces.

**TABLEAU 34-4-1**

**Classification actuelle des principales espèces rencontrées de *Pseudomonas* et bactéries apparentées en pathologie humaine.**

| *Groupe d'homologie (ARNr)* | *Genres* | *Espèces* | *Remarques* |
|---|---|---|---|
| I | *Pseudomonas* | Espèces fluorescentes :<br>*P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida*<br>Espèces non fluorescentes :<br>*P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes, P. stutzeri, P. mendocina, P luteola, P. oryzibitans*, etc. | |
| II | *Burkholderia*<br>*Ralstonia* | *B. cepacia, B. gladioli, B. mallei, B. pseudomallei*<br>*R. pickettii* | *B. cepacia* (9 génovars, génovar II : *B. multivorans*) |
| III | *Comamonas* | *C acidovorans, C. testosteroni* | |
| IV | *Brevundimonas* | *B. diminuta, B. vesicularis* | |
| V | *Stenotrophomonas* | *S. maltophilia* | |

**ANNEXE 34-4-1**

## Changements taxonomiques parmi les bacilles à Gram négatif non fermentaires autres que *Pseudomonas* et apparentés

| Dénomination actuelle | Ancienne dénomination |
|---|---|
| *Acidovorax delafieldii* | *Pseudomas delafieldii* |
| *Achromobacter* B, E | |
| *Agrobacterium tumefaciens* | |
| *A. radiobacter* | |
| *Alcaligenes faecalis* type I<br>*A. faecalis* type II<br>*Achromobacter piechaudii* | *Alcaligenes odorans*<br>*A. faecalis*<br>*A. faecalis (CIP 60-75)* |
| *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* | *Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans, A. denitrificans*<br>*Achromobacter denitrificans* |
| *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* | *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* |
| *Bergeyella zoohelcum* | *Weeksella zoohelcum* |
| *Brevundimonas diminuta*<br>*B. vesicularis* | *Pseudomonas diminuta*<br>*P. vesicularis* |
| *Chryseobacterium gleum*<br>*C. indologenes* | *Flavobacterium gleum*<br>*F. indologenes* |
| *Elisabethkingia meningoseptica* | *C. meningosepticum, F. meningosepticum,* groupe IIa CDC |
| *Delftia acidovorans*<br>*Comamonas testosteroni* | *Comamonas acidovorans*<br>*Pseudomonas testosteroni* |
| *Empedobacter brevis* | *Flavobacterium breve* |
| *Massilia timone* | Nouveaux genre et espèce |
| *Methylobacterium mesophilicum* | *Pseudomonas mesophilica* |
| *Myroides odoratus/odoratimimus* | *Flavobacterium odoratum* |
| *Ochrobactrum anthropi* | Groupe Vd (biotypes 1 et 2) CDC, *Achromobacter* groupes A, C et D |
| *Roseomonas gilardii* | Nouveau genre |
| *Shewanella putrefaciens* | *Pseudomonas putrefaciens, Alteromonas putrefaciens, Shewanella putrefaciens* |
| *Sphingobacterium multivorum* | *F. multivorum,* groupe IIa-2 CDC |
| *Sphingomonas paucimobilis* | *Pseudomonas paucimobilis* |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | *Xanthomonas maltophilia* |
| *S. africana* | Nouvelle espèce |
| *Weeksella virosa* | Groupe IIf CDC |
| *P. chlororaphis*<br>*P. putida*<br>*P. stutzeri*<br>*P. balearica* | *P. aureofaciens*<br>*P. ovalis, P. convexa*<br>*P. stanieri, P. perfectomarina*<br>*P. stutzeri* génomovar 6 |
| *Burkholderia cepacia*<br>*B. gladioli*<br>*B. multivorans*<br>*B. mallei*<br>*B. pseudomallei* | *Pseudomonas multivorans, P. kingii, P. kingae*<br>*P. marginata, P. alliicola*<br>*B. cepacia génomovar 2*<br>*P. mallei*<br>*P. pseudomallei* |
| *Ralstonia picketti* | *Burkholderia picketti, Pseudomonas picketti,* groupe CDC Va |
| *Sphingomonas paucimobilis* | *Pseudomonas paucimobilis* |
| *Shewanella putrefaciens* | *Alteromonas putrefaciens, Pseudomonas putrefaciens* |

▶

| Dénomination actuelle | Ancienne dénomination |
|---|---|
| *Flavimonas orizyhabitans* | *Pseudomonas orizyhabitans* |
| *Chryseomonas luteola* | *Pseudomonas luteola* |
| *Comamonas acidovorans*<br>*C. testosteroni* | *Pseudomonas acidovorans*<br>*P. testosteroni* |
| *Brevindimonas diminuta*<br>*B. vesicularis* | *Pseudomonas diminuta*<br>*P. vesicularis, P. vesiculare* |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | *Xanthomonas maltophilia, Pseudomonas maltophilia* |

## Habitat et pouvoir pathogène

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont ubiquitaires. Ils sont isolés de l'environnement (eaux douces et de mer, sol, végétaux, poussières en suspension dans l'air), dans les effluents et sont également retrouvés au niveau du tractus digestif des animaux. Ces bactéries ayant peu d'exigences nutritives survivent et se multiplient dans les milieux humides, notamment dans l'environnement hospitalier (robinet, évier, siphon, vase), et peuvent aussi contaminer des solutions antiseptiques. Ces bactéries sont à l'origine d'infections nosocomiales d'origine exogène (infections manuportées, infections sur matériel implanté) et d'origine endogène (flore cutanée, digestive) chez des patients le plus souvent immunodéprimés.

## Démarche diagnostique

L'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires repose sur l'utilisation de galeries spécifiques après orientation à partir de caractères morphologiques microscopiques et macroscopiques et d'épreuves biochimiques simples (Cf. tableau 34.4.2).

## Caractères morphologiques

### Aspects microscopiques

Les aspects microscopiques après examen à l'état frais entre lame et lamelle et après coloration de Gram permettent d'orienter le diagnostic vers un groupe bactérien. Les *Acinetobacter* sont des bactéries immobiles souvent regroupées en diplobacilles à extrémités arrondies de forme courte (coccobacilles) ou longue qui se décolore parfois difficilement. Les *Pseudomonas* apparaissent comme des bacilles longs à extrémités effilées et les bactéries, contrairement aux autres bacilles non fermentaires (*Burkholderia, Stenotrophomonas*, etc.), possèdent des extrémités plus arrondies.

### Caractères culturaux

Toutes les bactéries non fermentaires sont aérobies strictes.

Leur croissance est parfois plus lente que celle des entérobactéries, surtout à 37 °C, en raison d'une température optimale de croissance à 30 °C. La culture de certaines espèces des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* à 41 °C est un caractère diagnostique utile.

L'observation d'une pigmentation des colonies ou la diffusion de pigment dans le milieu de culture peut orienter vers certains genres (*Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, etc.) ou permettre une identification certaine (*P. aeruginosa*) (tableau 34.4.2).

## Caractères biochimiques

Bien que l'utilisation courante de galeries ou de cartes qui permettent l'identification après lecture par un automate dispense de réaliser certaines épreuves d'orientation, celles-ci peuvent être utiles en présence de souches atypiques ou de résultats « aberrants ».

### Réaction des oxydases

La réaction des oxydases est négative pour certaines espèces, mais le résultat peut être faussement négatif en fonction des réactifs utilisés (NN-diméthyl- ou NNNN-tétra-méthyl-paraphénylène-diamine-monohydrochloride) et d'une durée d'observation trop courte si la réaction est lente (1 minute).

### Détermination du caractère non fermentaire et de l'acidification des sucres

Le caractère non fermentaire d'une souche peut être visualisé sur un milieu Hajna ou TSI sur lequel sera détectée une culture uniquement sur la pente sans production de gaz. Si des doutes subsistent, l'étude de l'acidification des sucres pourra être pratiquée en milieu de Hugh et Leifson.

### Utilisation des nitrates

Certaines espèces (*P. aeruginosa*) peuvent, en anaérobiose, utiliser les nitrates comme accepteur final d'électron et ainsi « respirer les nitrates ». Cette recherche sera alors réalisée sur milieu mannitol-mobilité après régénération 20 minutes à 100 °C.

### Recherche d'activités enzymatiques et assimilation de substrats carbonés

La recherche d'activité du métabolisme protéique (ADH, LDC, ODC, uréase), la production de métabolites (indole) ainsi que l'assimilation de divers substrats carbonés (auxanogramme) sont réalisées à l'aide de systèmes d'identification plus au moins automatisés.

**TABLEAU 34-4-2**

**Pricipaux caractères d'orientation des bacilles à Gram négatif non fermentaires.**

| Genre / Espèces | Morphologie[a] | Croissance sur gélose T5 | Mobilité | Oxydase* | Pigmentation | Colistine[b] | Indole | Sacharrose | H2S (TSI) | Remarques | Tableau |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Pseudomonas* | b | + | + | + | V | S | – | V | | *sauf *P. luteola* et *P. oryzibitans* | IV |
| *Burkholderia* | b | + | + | + | – | R | | V | | *sauf *B. mallei* | V |
| *Pandoraea* | b | + | + | V | – | | | | | | |
| *Ralstonia* | b | + | + | + | – | | | – | | | |
| *Brevindimonas* | b | + | + | + | + | | – | – | | | |
| *Comamonas* | b | + | + | + | V | | – | – | | | |
| *Stenophomonas maltophilia* | b | + | + | – | + | V | – | V | | | |
| *Acinetobacter* | c/cb | + | – | – | – | | – | | | | VI |
| *Bordetella* | b/cb | V | V | V | V | | | – | | | |
| CDC groupe EO-5 | b | + | – | – | V | | | – | | | |
| CDC groupe NO-1 | cb | + | – | – | – | | | – | | | |
| *Moraxella, Oligella* | c/cb | V | – | + | – | | – | | | *sauf *O. ureolytica* | |
| *Chryseobacterium* | b | + | – | + | + | R | + | V | – | | VII |
| *Weeksella* | b | + | – | + | + | | + | – | – | | |
| *Bergeyella* | b | + | – | + | – | | + | – | – | | |
| *Empedobacter brevis* | b | + | – | + | + | | + | – | – | | |
| *Balneatrix* | b | + | + | + | + | | + | – | – | | |
| *Schewanella* | b | + | + | + | + | S | ND | | + | | |
| *Alcaligenes* | b | + | + | + | | | – | – | – | | VIII |
| *Achromobacter* | b | + | + | + | | | – | – | – | | |
| *Agrobacterium* | b | + | + | + | V | | – | – | – | | |
| *Ochrobactrum antropi* | b | + | + | + | – | V | – | – | – | | |
| *Sphingomonas paucimobilis* | b | + | + | + | + | V | – | – | – | | |
| *Sphyngobacterium* | c/cb | + | – | + | + | | – | + | – | | IX |
| *Myroides* | b | + | – | + | + | | – | – | – | | |
| CDC groupe EO-2 et 3 | c/cb | + | – | + | V | | – | + | – | | |

[a] b : bacille; c : cocci; cb ; coccobacille
[b] R : résistant; S : sensible
V : variable, ND : non déterminé

### Galeries et systèmes d'identification

Les systèmes d'identification utilisent des cartes ou des galeries « universelles Gram négatif » (Phoenix NID®, Crystal E/NF® [Becton Dickinson] ; API 32GN®, Vitek® 2 GN [bioMérieux]) ou adaptées à ce groupe (RapID NF Plus Panel® [Remel, Oxoid]) ; API 20NE® [bioMérieux]). Les résultats obtenus à partir de ces systèmes (lecture visuelle puis codage ou lecture à l'aide d'un automate) sont confrontés à des catalogues analytiques constitués des résultats obtenus à partir de collections d'isolats cliniques. Les résultats concernant des souches atypiques peuvent nécessiter la réalisation de réactions complémentaires proposées dans la fiche de résultats.

La galerie API 32GN® permet la détection de la croissance de la souche à identifier en présence de 32 sources de carbone. Cette galerie identifie une quarantaine de taxons avec un pourcentage d'identification satisfaisant (> 90 %) pour un panel de souches constituées des genres et espèces habituellement rencontrés.

La carte d'identification Vitek 2 GN® permet l'identification d'une vingtaine des taxons les plus couramment rencontrés en bactériologie médicale de bacilles non fermentaires (90 % des isolats) à partir de 41 épreuves biochimiques (assimilation de différentes sources de carbone, mesure d'activité enzymatique et résistance au composé vibriostatique $O_{129}$). Les résultats sont obtenus en moyenne après 6 heures d'incubation.

La galerie API 20NE® comporte 8 épreuves conventionnelles et 12 épreuves auxanographiques. Cette galerie permet l'identification de plus d'une quarantaine d'espèces de bacilles non fermentaires après incubation de 48 heures à 30 °C.

À partir de la détermination de 18 caractères enzymatiques, la galerie RapID NF Plus Panel® permet l'identification d'une cinquantaine de taxons en 4 heures. Ce système nécessite l'adjonction de réactifs dans certaines cupules (nitrate réductase, production d'indole).

### Conduite pratique de l'identification

L'orientation du diagnostic est établie d'après les caractères indiqués dans le tableau 34.4.2. Les résultats de l'antibiogramme peuvent conforter les résultats de l'identification, comme la résistance de *B. cepacia* à la colistine.

## Genre *Pseudomonas*

### Généralités

La classification en genres et espèces à l'intérieur de la famille des *Pseudomonadeceae* a longtemps reposé sur des caractères phénotypiques simples d'orientation. La simplification de cette classification a été réalisée par Stanier qui a étudié principalement l'assimilation des substrats carbonés (auxanogramme) et par Palleroni qui a classé les espèces de *Pseudomonas* en cinq groupes génomiques, les *Pseudomonas* « vrais » appartenant au groupe I (tableau 34.4.1).

Les *Pseudomonas* stricto sensu sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, oxydase positive, non fermentaires, mobiles par une ciliature polaire monotriche ou multitriche, sauf quelques exceptions, respirant ou non les nitrates, oxydant ou non le glucose et n'accumulant pas du poly-β-hydroxybutyrate.

Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes (*P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida, P. monteillii, P. mosselii, P. chlororaphis*, etc.) produisant de la pyoverdine et des espèces non fluorescentes (*P. alcaligenes, P. stutzeri, P. mendocina*).

### Habitat et pouvoir pathogène

Ces bactéries sont ubiquitaires et certaines espèces sont plus fréquemment rencontrées en médecine humaine. D'autres espèces ont été isolées de l'environnement ou sont des phytopathogènes présentant une spécificité d'hôte étroite (pathovars). Les espèces de *Pseudomonas* pouvant être isolées en pratique médicale sont indiquées dans le tableau 34.4.3.

### Identification

L'identification des espèces les plus fréquemment rencontrées est fiable. Le tableau 34.4.3 donne un ensemble de réactions complémentaires de celles présentées dans le tableau 34.4.2.

## *P. aeruginosa* et groupe « fluorescent »

### Pouvoir pathogène et habitat

*P. aeruginosa* est la bactérie pathogène opportuniste par excellence. Les infections à *P. aeruginosa* surviennent chez des sujets âgés, immunodéprimés (cancéreux), présentant des affections intercurrentes (insuffisance respiratoire, brûlure). On isole cette espèce de suppurations profondes ou superficielles d'urines (témoignant du caractère iatrogène de l'infection) et plus rarement d'hémocultures. *P. aeruginosa* peut également être isolé à partir de selles sans que cette présence soit reliée à un rôle pathogène.

Les souches de *P. aeruginosa* isolées du tractus respiratoire des sujets (plus de 90 %) atteints de mucoviscidose présentent des particularités morphologiques et physiologiques à prendre en compte lors de l'analyse bactériologique (isolement, identification et antibiogramme) des expectorations. Au cours de l'évolution de la mucoviscidose mais aussi de maladies respiratoires chroniques, les colonies isolées présentent des variations de taille (colonies naines à larges) et d'aspect (rugueuses, lisses, muqueuses). Elles sont le plus souvent muqueuses et apigmentées lors du passage à la chronicité.

**TABLEAU 34-4-3**

## Caractéristiques morphologiques et biochimiques des espèces du genre *Pseudomonas*.

| Caractères / Espèce | Pigment | Nombre flagelles | Oxydase | Croissance à 41 °C | Croissance à 4 °C | Réduction $NO_3^-$ | ADH | Hydrolyse Gélatine | Hydrolyse Lécithinase | Hydrolyse Urée | Citrate Simmons | Acidification Glucose | Acidification Tréhalose | Acidification Mannitol | Acidification Xylose | Acidification Maltose | Remarques Maltose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *P. aeruginosa* | PC + PV[c] | 1 | + | + | – | + | + | + | V | V | + | + | – | + | + | – | 10 % de souches apigmentées |
| *P. fluorescens* | PV | > 1 | + | – | + | – | + | + | + | V | + | + | + | + | + | – | |
| *P. putida* | PV | > 1 | + | – | + | – | + | – | – | – | + | + | – | – | + | V | |
| *P. monteilii* | PV | > 1 | + | – | – | – | + | – | – | V | + | + | – | – | – | – | |
| *P. alcaligenes* | C | 1 | + | V | + | V | – | – | – | – | V | + | – | – | – | – | |
| *P. pseudoalcaligenes* | | 1 | + | + | + | + | V | – | – | – | V | + | – | – | – | – | |
| *P. stutzeri* | C | 1 | + | V | + | + | – | – | – | – | + | + | – | V | + | + | Amidon + |
| *P. mendocina* | C | 1 | + | + | + | + | + | – | – | – | + | + | – | V | V | – | |
| *P. luteola*[a] | C | > 1 | – | + | + | V | + | V | – | V | + | + | ND | V | + | + | Esculine + |
| *P. oryzihabitans*[b] | C | 1 | – | V | + | – | – | – | – | V | + | + | ND | + | + | + | |

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.

Réaction importante

[a] Appelé aussi *Chryseomonas luteola* (ancien CDC group Ve–1).
[b] Appellé aussi *Flavimonas oryzihabitans* (ancien CDC group Ve–2).
[c] PC (pyocyanine), PV (pyoverdine), C (caroténoïde).

Les deux autres espèces les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine du groupe fluorescent (*P. fluorescens*, *P. putida*) demeurent plus rarement isolées et sont souvent considérées comme des contaminants du fait de leur faculté à se développer à 4 °C.

## Caractères bactériologiques

### Caractères culturaux

*P. aeruginosa* cultive facilement sur milieux ordinaires en développant une odeur de seringa. La température optimale de croissance est de 30 °C. Sur milieux solides, trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée :

- colonies larges ( « la ») de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses, avec une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques ;
- colonies plus petites lisses ( « S ») bombées à bord régulier ;
- colonies muqueuses ( « M »), bombées, coalescentes, filantes, rencontrées chez les souches produisant un *slime* composé d'un polymère d'alginates.

Pour les souches pigmentées (95 %), la simple constatation d'une pigmentation verte du fait de la production de deux pigments, la pyocyanine (hydrosoluble) et la pyoverdine (soluble dans le chloroforme) établit le diagnostic (fig. 34.4.1). D'autres pigments hydrosolubles peuvent être produits parfois de manière transitoire : la pyomélanine brune et la pyorubrine rouge.

À partir de prélèvements polymicrobiens, il est nécessaire d'avoir recours à un milieu sélectif contenant du cétrimide (ammonium quaternaire) associé ou non à de l'acide nalidixique.

**Fig. 34.4.1.** – *Production de pyocyanine et de pyoverdine caractéristique de* Pseudomonas aeruginosa *sur milieux de King A et B (A). La pyocyanine est hydrosoluble (à gauche) et la pyoverdine soluble dans le chloroforme (à droite) (B).*

### Identification

Pour *P. aeruginosa*, devant des souches non pigmentées, le recours à des galeries est nécessaire, mais les résultats obtenus avec celles-ci sont parfois erronés et de plus en plus souvent on doit recourir à des méthodes moléculaires pour obtenir un diagnostic d'espèces précis, notamment pour les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose. Les caractères différentiels avec les autres espèces du groupe fluorescent et du genre sont indiqués dans le tableau 34.4.3.

### Marqueurs épidémiologiques

Les méthodes phénotypiques de typage disponibles (sérotypie des Ag O et l'antibiotypie) sont utilisées lors d'une première approche. La sérotypie est une réaction d'agglutination sur lame réalisée à partir de colonies prélevées sur gélose qui individualise 16 sérotypes avec le kit le plus utilisé (Biorad). Il existe des réactions croisées entre sérogroupes (souche polyagglutinable) et 10 % des souches sont non agglutinables (souche muqueuse notamment). L'antibiotypie est un marqueur peu discriminant, surtout pour différencier des souches impliquées dans des pathologies chroniques chez des patients soumis à des antibiothérapies répétées qui peuvent avoir une influence sur les résultats de l'antibiogramme.

Les méthodes génotypiques font appel à des techniques développées dans le chapitre concernant la biologie moléculaire à des fins diagnostiques et épidémiologiques. La méthode de référence est l'électrophorèse en champs pulsés. Cependant, cette méthode lourde à mettre en œuvre est souvent précédée par des méthodes utilisant la PCR (RAPD, ERIC-PCR, rep-PCR, ribotypie-PCR).

## Autres *Pseudomonas*

### Pouvoir pathogène et habitat

Les autres espèces du genre *Pseudomonas* sont très rarement responsables d'infections humaines. Ces espèces présentes dans l'environnement ont été mises en cause dans diverses infections : endocardites (*P. alcaligenes*, *P. luteola, P. mendocina*), pneumonies (*P. stutzeri*), septicémies (*P. oryzihabitans, P. stutzeri, P. alcaligenes*, *P. luteola*), infections cutanées (*P. stutzeri, P. oryzihabitans*), infections osseuses (*P. luteola*), méningites postopératoires (*P. luteola, P. oryzihabitans*).

## Caractères bactériologiques

### Caractères culturaux

Les colonies de *P. stutzeri* sont rugueuses, striées radialement, ridées. Un aspect polybactérien peut être observé avec des colonies présentes sous forme lisse (S). Quelques souches de *P. luteola* et de *P. oryzihabitans* présentent également un aspect rugueux et sont difficiles à prélever.

### Identification

Les principaux caractères permettant de différencier des autres espèces du genre sont indiqués dans le tableau 34.4.3. *P. stuzeri* est phénotypiquement hétérogène. Cette hétérogénéité a été reliée à la présence de différents génomovars.

## Genres *Burkholderia, Acidovorax, Comamonas, Brevundimonas, Ralstonia, Pandoraea, Sphingomonas, Stenotrophomonas*

### Généralités

Les genres *Burkholderia, Stenotrophomonas, Acidovorax, Comamonas, Brevundimonas, Ralstonia, Pandoraea* et *Stenotrophomonas* appartiennent aux groupes génomiques II à V de Palleroni (tableau 34.4.1) et appartenaient autrefois au genre *Pseudomonas*. Ces genres comprennent des bactéries environnementales (eau, sol, plantes) qui survivent en milieu humide et sont sources d'infections à l'hôpital, sauf l'espèce *B. mallei*.

### Habitat et pouvoir pathogène

Excepté *Burkholderia mallei*, agent de la morve (maladie spécifiquement équine), ces genres comprennent des bactéries environnementales (eau, sol, plantes) qui survivent en milieu humide et sont sources d'infections à l'hôpital ou chez des patients atteints de mucoviscidose (*Burkholderia cepacia, Pandoraea, Stenotrophomonas*).

Deux espèces sont susceptibles de provoquer des infections graves chez l'homme sain (la mélioïdose due à *Burkholderia peudomallei*) ou chez l'animal (la morve due à *B. mallei*). Ces deux espèces sont des agents potentiels de bioterrorisme et doivent faire l'objet, lors de la manipulation des produits pathologiques et des cultures, des précautions d'usage afférentes aux agents infectieux de classe III.

### Identification

L'identification à l'aide des galeries biochimiques donne des résultats variables en fonction des genres et espèces considérés : satisfaisants pour certains genres, médiocres pour d'autres (complexe *Burkholderia cepacia* par exemple).

### Complexe *Burkholderia cepacia*

Le complexe *B. cepacia* résulte d'un regroupement de bactéries présentant des caractères phénotypiques similaires, mais elles sont génotypiquement individualisées en 9 génomovars : *B. cepacia* (I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* (III), *B. stabilis* (IV), *B. vietnamiensis* (V), *B. dolosa* (VI), *B. ambifaria* (VII), *B. anthina* (VIII), *B. pyrrocinia* (IX).

### Habitat et pouvoir pathogène

Certaines espèces du genre complexe *B. cepacia,* décrites comme phytopathogènes, sont des bactéries qui possèdent une grande capacité métabolique d'adaptation (capacité de dégrader des hydrocarbures, des pesticides, synthèse d'agents antifongiques utilisés dans l'agriculture). Ces propriétés qui leur permettent de survivre dans des conditions difficiles sont à l'origine de leur présence dans l'environnement hospitalier (surfaces, solutions antiseptiques, etc.).

*Burkholderia cepacia* est un phytopathogène (riz, oignon) qui a également été retrouvé dans les amibes libres (réservoir potentiel). Les espèces du complexe *B. cepacia* (voir plus loin) sont des bactéries pathogènes opportunistes dont certains clones ont non seulement une capacité accrue de coloniser puis d'infecter le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, mais aussi une implication dans l'évolution péjorative chez les sujets mucoviscidosiques transplantés. Les génomovars II et III sont prédominants dans cette pathologie.

Ce groupe d'espèces est susceptible d'intervenir en tant que pathogènes opportunistes étant à l'origine notamment de septicémies sur cathéters, d'infections pulmonaires chez des malades ventilés.

### Caractères bactériologiques

#### Caractères culturaux

*B cepacia* cultive sur milieux ordinaires à 30 °C en 48 heures. L'utilisation de milieux sélectifs à partir des expectorations non diluées chez les patients atteints de mucoviscidose est nécessaire. Le milieu BSCA rendu sélectif par la présence de gentamicine et de polymyxine permet une croissance plus rapide de *B. cepacia* (fig. 34.4.2), mais ne permet pas la croissance de

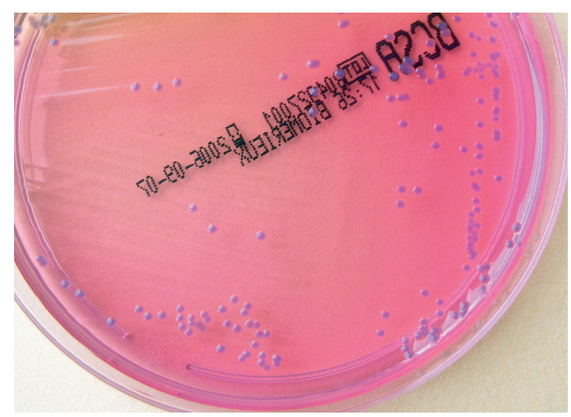


Fig. 34.4.2. – *Colonies de Burkholderia cepacia sur milieu BSCA rendu sélectif par la présence de gentamicine et de polymyxine.*

*B. gladioli* (sensible à la gentamicine), contrairement au milieu OFPBL contenant de la polymyxine et de la bacitracine.

## Identification

Dans un premier temps, l'identification sera réalisée à l'aide d'une galerie API 20NE®. Cette galerie permet d'identifier correctement les espèces du complexe *B. cepacia* excepté le génomovar IV. Les systèmes récents (Phoenix®, Vitek 2®) produisent une identification correcte pour environ 50 % des souches. Les caractères précisés dans le tableau 34.4.4 définissent les profils biochimiques de chaque espèce du complexe. Cependant, l'identification devra être confirmée par des techniques moléculaires dans des situations de pathologies chroniques comme la mucoviscidose, ou à partir d'isolats cultivant sur le milieu sélectif BCSA qui appartiennent à d'autres genres phylogénétiquement proches (*Ralstonia, Pandoraea*) et non répertoriés dans les bases de données des systèmes d'identification phénotypiques.

## Autres espèces du genre *Burkholderia*

### Pouvoir pathogène et habitat

*B. gladioli* est présent sous quatre pathovars, dont trois sont phytopathogènes (glaïeul, oignon, champignon). Chez l'homme, il provoque rarement des infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose.

La mélioïdose est une maladie de diagnostic difficile provoquée par *B. pseudomallei* (bacille de Whitmore), germe hydrotellurique. C'est une maladie suppurative à symptomatologie polymorphe qui peut se présenter sous formes de septicémies mortelles, sous formes viscérales localisées (pulmonaires, cutanées, musculaires, viscérales abdominales, etc.), après contacts cutanés ou inhalation. Des formes latentes pouvant se réactiver des années après le contact ont été décrites.

La morve provoquée par *B. mallei* a été éradiquée dans les pays développés, mais subsiste en Asie et au Moyen-Orient. Cette maladie peut être transmise à l'homme lors de contacts avec les équidés dans les zoos ou lors de manipulations de laboratoire (infection cutanée).

**TABLEAU 34-4-4**

**Caractéristiques morphologiques et biochimiques des espèces des genres *Burkholderia, Acidovorax, Comamonas, Brevundimonas, Ralstonia, Pandoraea, Sphingomonas et Stenotrophomonas*.**

| Caractères / Espèce | Pigment[a] | Mobilité | Oxydase | Croissance à 41 °C | Croissance BCSA | Croissance cétrimide | Réduction $NO_3^-$ | ADH | LDC | ODC | Hydrolyse Urée | Hydrolyse Citrate | Hydrolyse Gélatine | Hydrolyse Esculine | Assimilation d Glucose | Assimilation Xylose | Assimilation Mannitol | Assimilation Lactose | Assimilation Maltose | Assimilation Sucrose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Burkholderia cepacia* (complexe) | V | + | + | V | + | V | V | – | V | V | V | + | – | V | + | + | + | + | + | + |
| *Burkholderia gladioli* | – | + | – | V | V | – | V | – | – | – | V | + | – | – | + | + | + | – | – | – |
| *Burkholderia mallei* | – | – | + | – | ND | – | + | + | – | – | – | – | + | – | + | – | V | – | – | – |
| *Burkholderia pseudomallei* | – | + | + | + | ND | – | + | + | – | – | – | + | + | V | + | + | + | + | + | V |
| *Pandorea apista* | – | + | V | + | + | + | – | + | – | – | + | + | – | – | + | – | – | – | – | – |
| *Pandorea pulmonicola* | – | + | + | + | + | + | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – |
| *Pandorea pnomenusa* | – | + | V | + | + | V | + | ND | – | – | + | + | – | – | – | – | – | – | – | – |
| *Pandorea sputorum* | – | + | V | V | + | V | V | – | – | – | V | ND | – | – | – | – | – | – | – | – |
| *Ralstonia picketti* (2 biovars) | – | + | + | V | + | – | + | – | – | – | + | + | V | – | + | + | – | V | V | – |
| *Ralstonia mannitolilytica* | – | + | + | + | + | – | V | – | – | – | + | + | V | – | + | + | + | + | + | – |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | B | + | – | V | – | – | V | – | + | – | – | V | + | + | + | V | – | V | + | V |
| *Acidovorax delafieldii* | J | + | + | V | ND | – | + | + | – | – | + | + | – | – | + | + | V | – | – | – |
| *Acidovorax facilis* | – | + | + | – | ND | – | + | + | – | – | + | – | + | – | + | + | + | – | – | – |
| *Brevundimonas diminuta* | B | + | + | V | ND | – | – | – | – | – | – | – | V | – | V | – | – | – | – | – |
| *Brevundimonas vesicularis* | – | + | + | V | ND | – | – | – | – | – | – | – | V | + | V | – | – | – | + | – |
| *Comamonas acidovorans* | – | + | + | V | ND | – | + | – | – | – | – | + | – | – | – | – | + | – | – | – |
| *Comamonas testosteroni* | – | + | + | + | ND | – | + | – | – | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – |
| *Sphingomonas paucimobilis* | J | + | + | + | ND | ND | – | ND | ND | ND | – | – | + | + | + | + | – | + | + | + |

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.

Réaction importante

[a] B : brun, J : jaune.

### Caractères bactériologiques

#### Caractères culturaux

*B. pseudomallei* cultive sur milieu ordinaire à 37 °C. Sur milieux solides après 18 heures d'incubation, on observe des colonies de 1 à 2 mm blanchâtres devenant crème à orangé, d'aspect muqueux puis rugueux. En milieu liquide, une odeur de truffe se dégage. La croissance de *B. mallei* est plus lente que celle de *B. pseudomallei*. Sur gélose au sang après 48 heures à 37 °C, les colonies sont rondes et translucides, puis opaques à centre brunâtre.

#### Identification

L'identification sera conduite d'après les caractères précisés dans le tableau 34.4.4. Des méthodes d'identification et de détection par PCR ont été utilisées afin notamment de diminuer les risques liés à la manipulation de culture.

Excepté la mobilité, *B. mallei* présente de nombreuses similitudes phénotypiques avec *B. pseudomallei* (tableau 34.4.4). Des méthodes moléculaires existent également pour l'identification de ces deux espèces. *B. gladioli* peut être identifié à l'aide de la carte Vitek 2® GN, mais comme pour les espèces du complexe *B. cepacia*, une confirmation de l'identification est nécessaire par l'analyse des profils de restriction de cinq enzymes (*Alu*I, *Cfo*I, *Dde*I, *Msp*I, *Xmn*I) du gène *ADNr* ou par le profil obtenu par MLST.

## Genres *Ralstonia* et *Pandoraea*

### Pouvoir pathogène et habitat

Les espèces du genre *Ralstonia* sont isolées de l'eau, et plus particulièrement des eaux (usées, de piscine, minérales) appartenant à ces genres sont isolées des mêmes niches écologiques que celles du genre *Burkholderia*.

L'espèce *Ralstonia pickettii* (anciennement dénommée *Pseudomonas pickettii* puis *Burkholderia pickettii*) est à l'origine de septicémies nosocomiales ayant pour origine des solutés (hémodialysés), des respirateurs et des solutions antiseptiques contaminés, mais elle est également responsable de méningites, d'ostéomyélites et d'endocardites. Cette espèce comprend deux biovars, le troisième étant maintenant dénommé *R. mannitolilytica*. Ces deux espèces sont isolées également du tractus respiratoire de patients atteints de mucoviscidose. D'autres espèces (*R. paucula*, *R. gilardii* et *R. eutropha*) ont aussi été isolées en médecine humaine.

Les espèces du genre *Pandoraea* ont été individualisées du complexe *B. cepacia* lors d'études génomiques sur des isolats de patients atteints de mucoviscidose et de l'environnement. Ce genre comprend cinq espèces (*P. apista, P. pulmonicola, P. pnomenusa, P sputorum* et *P. norimbergensis*), *P. apista* étant la plus fréquemment isolée.

### Caractères bactériologiques

#### Identification

*R. pickettii* et *R. mannitolilytica* peuvent être confondus avec *P. fluorescens* par les systèmes d'identification commercialisés (API 20NE®, Vitek®, Phoenix®). *R. mannitolilytica* n'est pas présent dans certaines bases de données non actualisées. Le diagnostic d'espèce et les principaux caractères différentiels avec des espèces de genres proches sont indiqués dans le tableau 34.4.4. Des techniques PCR existent pour identifier les espèces du genre *Ralstonia.*

## Genres *Stenotrophomonas, Acidovorax, Comamonas* et *Brevundimonas*

### Habitat et pouvoir pathogène

*Stenotrophomas maltophilia* est une bactérie ubiquitaire qui colonise le plus souvent les patients par voie exogène. Cette espèce, sous l'effet de la pression de sélection des antibiotiques, est à l'origine de nombreuses infections nosocomiales (deuxième en fréquence parmi les bacilles non fermentaires). Elle est responsable de septicémies, d'infections pulmonaires, d'infections urinaires. Les espèces des genres *Acidovorax*, *Comamonas*, *Brevundimonas* et *Sphingomonas* sont plus rarement isolées en pratique courante.

### Caractères bactériologiques

#### Caractères culturaux

*S. maltophilia* produit un pigment brun sur gélose ordinaire sur laquelle la culture est aisée.

#### Identification

L'identification de *S. maltophilia* – bacille mobile légèrement incurvé, oxydase négative – est aisée à partir des caractères suivants : lysine décarboxylase +, gélatinase +, esculine +, uréase – et indole –. Les souches isolées en pathologie humaine sont souvent multirésistantes et sont résistantes à l'imipénème. Le diagnostic différentiel avec les espèces bactériennes oxydase négative est présenté dans le tableau 34.4.5.

Les espèces des genres *Acidovorax*, *Comamonas*, *Brevundimonas* et *Sphingomonas* peuvent être identifiées correctement à l'aide des systèmes commercialisés, avec une préférence pour les systèmes anciens (API 20NE®), les dénominations de la base de données n'étant cependant pas actualisées. Les principaux caractères phénotypiques permettant l'identification de ces genres sont résumés dans le tableau 34.4.4.

**TABLEAU 34-4-5**

**Caractères différentiels des bacilles à Gram négatif non fermentaires oxydase négative.**

| Caractères / Genres ou espèces | Pigment[a] | Mobilité | Croissance à 41 °C | Croissance cétrimide | Réduction $NO_3^-$ | LDC | ODC | Hydrolyse Urée | Hydrolyse Gélatine | Hydrolyse Esculine | Assimilation d Glucose | Assimilation Xylose | Assimilation Mannitol | Assimilation Lactose | Assimilation Maltose | Assimilation Sucrose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Acinetobacter* spp. | – | – | V | V | V | V | V | V | V | – | V | V | – | V | – | – |
| *Bordetella parapertussis* | – | – | – | – | V | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – |
| *Bordetella holmesii* | Brun | – | – | – | + | – | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – |
| *Pseudomonas luteola* | J | + | + | – | + | – | – | – | + | + | + | + | + | + | + | V |
| *Pseudomonas oryzihabitans* | J | + | V | + | – | – | – | + | – | – | + | + | V | – | – | – |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | B | + | V | – | V | + | – | – | + | + | + | V | – | V | + | V |

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.

Réaction importante

[a] B : brun, J : jaune.

# Famille des *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium, Chryseobacterium, Sphingobacterium, Myroides, Weeksella, Empedobacter*) et genres *Alcaligenes, Achromobacter, Agrobacterium, Ochrobactrum, Shewanella* et *Weeksella*

## Généralités

Les espèces pathogènes d'intérêt médical qui appartenaient au genre *Flavobacterium* ont été réassignées dans d'autres genres de la famille des *Flavobacteriaceae* aux cours des changements taxonomiques, limitant ainsi ce genre à des espèces environnementales. La famille des *Flavobacteriaceae* regroupe actuellement les genres *Flavobacterium, Chryseobacterium, Sphingobacterium, Myroides, Weeksella, Empedobacter* et *Capnocytophaga* (non traité dans ce chapitre).

## Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces appartenant à ces genres survivent (amibes) et se développent dans différents environnements hydriques (eau de mer pour certaines espèces). Ces bactéries sont également isolées à partir de plantes et d'aliments divers (fruits, légumes). À l'hôpital, ces bactéries sont retrouvées au niveau d'eaux contaminées (robinets, siphons, etc.) ou de matériels nécessitant l'utilisation d'eau (nébuliseurs, dialyse, etc.). Elles sont également isolées dans un contexte d'infections nosocomiales (bactériémie, péritonites) chez des patients qui sont le plus souvent immunodéprimés.

## Identification

Les clés d'identification des principales espèces de bacilles non fermentaires, isolés en pratique médicale, en dehors des *Pseudomonaceae*, sont présentées dans la figure 34.4.3.

## Groupe des bacilles oxydase positive – indole positif – immobiles (*Chryseobacterium, Weeksella, Empedobacter, Bergyella, Balneatrix*)

### *Pouvoir pathogène et habitat*

Dans ce groupe, *Elizabethkingia meningoseptica* (ex-*Flavobacterium* et *Chryseobacterium meningosepticum*) et *Empedobacter brevis* sont des agents d'infections nosocomiales (méningites, septicémies) qui surviennent à partir de matériel chirurgical contaminé. *E. meningoseptica* est également à l'origine d'infections primitives (méningites néonatales). Les autres genres sont rarement isolés : *Weeksella* dans des prélèvements génitaux mais de pouvoir pathogène incertain, et *Bergyella* dans des pus de morsure. *Balneatrix* a été responsable de cas groupés de pneumonies dans un centre de cure thermale.

### *Caractères bactériologiques*

Les caractères culturaux et d'identification sont présentés dans le tableau 34.4.6. Ces bactéries sont pour la plupart pigmentées en jaune. La faible production d'indole doit être réalisée après extraction au xylène. La résistance à la colistine permet également de conforter l'identification de certaines espèces (*Balneatrix, Chryseobacterium*) qui présentent par ailleurs une sensibilité aux macrolides.

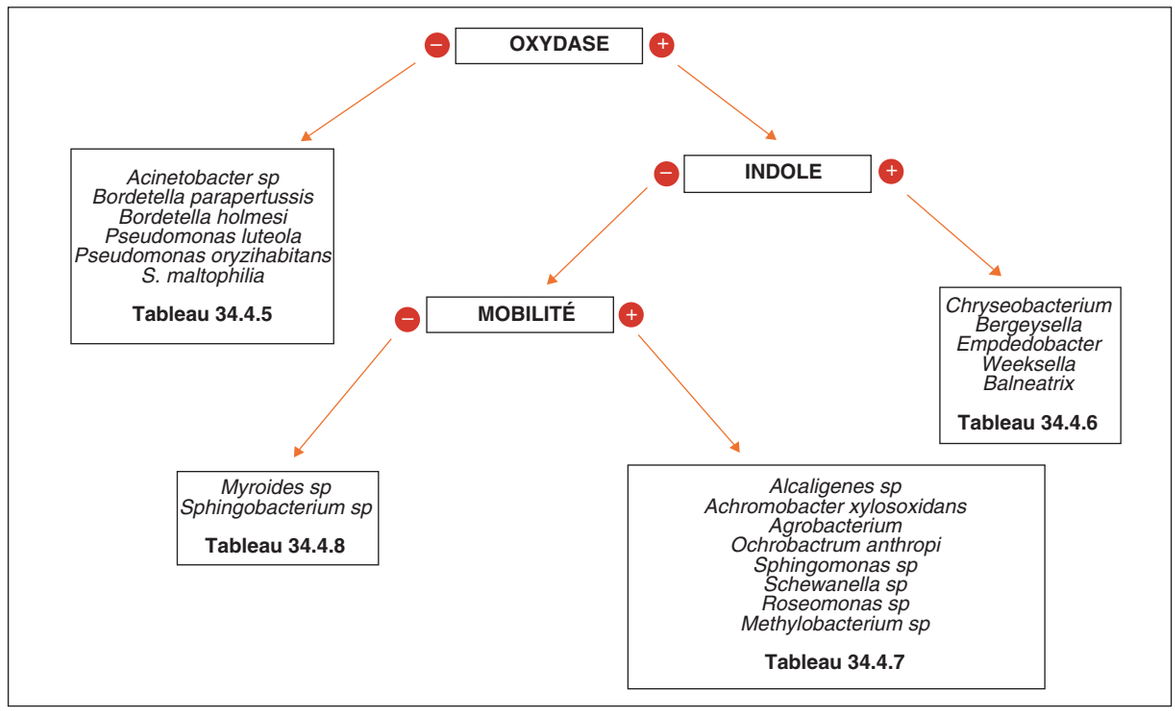



**Fig. 34.4.3.** – *Arbre décisionnel pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires n'appartenant pas aux Pseudomonaceae.*

**TABLEAU 34-4-6**

**Caractères différentiels des bacilles à Gram négatif non fermentaires oxydase positif, indole positif.**

| Caractères / Espèces | Pigment[a] | Mobilité | Oxydase | Production d'indole | Croissance à 41 °C | Réduction $NO_3^-$ | ONPG | Hydrolyse | | | | Assimilation | | | | | Colistine[b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | Urée | ADN | Gélatine | Esculine | d Glucose | Xylose | Mannitol | Maltose | Sucrose | |
| *Elizabethkingia meningoseptica* | J | – | + | + | V | – | + | – | + | + | + | + | – | + | + | – | R |
| *Chryseobacterium indologenes* | J | – | + | + | – | – | V | – | – | + | + | + | V | – | + | – | R |
| *Empedobacter brevis* | J | – | + | + | – | – | – | – | + | + | – | V | – | – | + | – | R |
| *Bergeyella zoohelcum* | – | – | + | + | – | – | – | + | – | + | – | – | – | – | – | – | R |
| *Weeksella virosa* | J | – | + | + | V | – | – | – | – | + | – | – | – | – | + | – | S |
| *Balneatrix alpica* | J | + | + | + | + | + | – | – | – | – | – | + | – | + | + | + | ND |
| CDC groupes IIc, IIe, IIg, IIh, IIi | J | – | + | + | V | – | V | – | V | V | V | V | V | V | V | V | V |

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.

Réaction importante

[a] J : jaune pâle.

[b] R : résistant, S : sensible.

## Groupe des bacilles oxydase positive – indole négatif – mobiles (*Alcaligenes, Achromobacter, Agrobacterium, Achromobacter, Ochrobactrum, Shewanella* et *Sphingomonas*)

### Pouvoir pathogène et habitat

Les espèces appartenant à ces genres sont assez rarement isolées et se comportent comme des pathogènes opportunistes pouvant être à l'origine d'infections nosocomiales sur cathéter, le plus souvent chez des sujets neutropéniques (*Alcaligenes, Achromobacter, Agrobacterium, Achromobacter*).

### Caractères bactériologiques

Les caractères culturaux et d'identification sont présentés dans le tableau 34.4.7. Les espèces des genres *Methylobacterium* et *Roseomonas* produisent un pigment rose.

## Groupe des bacilles oxydase positive – indole négatif – immobiles (*Flavobacterium, Myroides* et *Sphingobacterium*)

Les espèces d'intérêt médical qui appartenaient au genre *Flavobacterium* ont été reclassées dans différents genres (*Chryseobacterium, Myroides*, *Sphingobacterium* et *Empedobacter*).

### Pouvoir pathogène et habitat

Les infections causées par les espèces des genres *Myroides*, *Sphingobacterium* sont rares ; des infections urinaires sont principalement rapportées.

### Caractères bactériologiques

Les caractères culturaux et d'identification sont présentés dans le tableau 34.4.8.

**TABLEAU 34-4-7**

**Caractères différentiels des bacilles à Gram négatif non fermentaires mobiles, oxydase positif, indole négatif acidifiant ou n'acidifiant pas le glucose.**

| Caractères / Espèces | Pigment[a] | Mobilité[b] | Oxydase | Production d'indole | Croissance à 41 °C | Réduction $NO_3^-$ | ONPG | Hydrolyse | | | | Assimilation | | | | | Colistine[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | Urée | ADN | Gélatine | Esculine | d Glucose | Xylose | Mannitol | Maltose | Sucrose | |
| *Alcaligenes faecalis* | – | + | + | – | – | – | ND | – | – | – | – | – | – | – | – | – | |
| *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xyloxosidans* | – | + | + | – | – | V | ND | – | – | – | – | + | + | – | – | + | S |
| *Achromobacter xylosoxidans* subsp.*denitrificans* | – | + | + | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | |
| *Ochrobactrum anthropi* | – | + | + | – | – | V | – | + | – | – | V | + | + | V | V | V | S |
| *Agrobacterium radiobacter* | – | + | + | – | – | – | + | + | – | – | + | + | + | + | + | + | S |
| *Sphingomonas paucimobilis* | J | + | + | – | – | – | + | – | – | – | – | + | + | – | + | + | S |
| *Schewanella putrefasciens* | B | + | + | – | – | – | ND | | + | + | – | V | ND | – | V | V | |
| *Methylobacterium* spp. | R | + | + | – | – | – | ND | + | ND | ND | ND | V | V | ND | ND | ND | |
| *Roseomonas* spp. | R | + | + | – | + | – | ND | + | – | ND | V | V | V | – | – | – | |

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.

Réaction importante

[a] J : jaune pâle, R : rose, B : brun.
[b] Doit être recherchée à température ambiante et à 37 °C.
[c] R : résistant, S : sensible.

**TABLEAU 34-4-8**

**Caractères différentiels des bacilles à Gram négatif non fermentaires immobiles oxydase positif, indole négatif acidifiant ou n'acidifiant pas le glucose.**

| Caractères / Espèce | Pigment[a] | Mobilité[b] | Oxydase | Production d'indole | Réduction $NO_3^-$ | ONPG | Hydrolyse | | | | Assimilation | | | Colistine[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | Urée | ADN | Gélatine | Esculine | d Glucose | Xylose | Mannitol | |
| *Myroides odoratus/ odoratimimus* | J | – | + | – | – | – | + | + | + | – | – | | – | R |
| *Sphingobacterium multivorum* | J | – | + | – | – | + | + | – | – | + | + | – | – | R |
| *Sphingobacterium spiritivorum* | J | – | + | – | – | + | + | + | V | + | + | + | + | R |
| *Sphingobacterium thalpophilum* | J | – | + | – | + | + | + | + | V | + | + | + | – | R |
| *Sphingobacterium mirutae* | J | – | + | – | – | + | – | – | – | + | + | + | – | R |

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.

Réaction importante

[a] J : jaune pâle, R : rose, B : brun.
[b] Doit être recherchée à température ambiante et à 37 °C.
[c] R : résistant, S : sensible.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Blondel-Hill E, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th eds Washington DC : ASM Press; 2009. p. 734–48.

Boosshard PP, Zbinden R, Abels S, Bödinghaus B, Altwegg M, Böttger EC. 16rRNA gene sequencing versus the API 20NE system and the Vitek 2 ID-GNB card for identification of non fermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2006; 44 : 1359–66.

Dawson SL, Fry JC, Dancer B. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. J Microbiol Methods 2002; 50 : 9–22.

Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesnes G, Lenoir G, Berche P, et al. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches atypiques de bacilles à Gram négatif non fermentants isolés chez des patients atteints de mucoviscidose. Pathol Biol 2003; 51 : 405–11.

Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert D. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* Complex. J Clin Microbiol 2001; 39 : 1073–8.

Husson MO, Hamze M, Fruchart A, Izard D. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia* et *Pandoraea*. In : Freney J, Hansen W, Bollet C, Leclerc R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2003 [Section VIII, chapitre 4].

International Burkholderia cepacia Working Group http://www.go.to/cepacia.

Li Puma JJ, Currie BJ, Lum GD, Vandamme PAR. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandorea*, *Brevundimonas*, *Comanonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. In : Murray PR, J Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th eds Washington DC : ASM Press; 2009. p. 749–68.

Monteil H, Harf-Monteil C. Les bacilles à Gram négatif non-fermentants autres que les *Pseudomonas*. In : Freney J, Hansen W, Bollet C, Leclerc R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2003 [Section VIII, chapitre 5].

Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Hollis DG. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella*, and other non fermentative Gram negative rods. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th eds Washington DC : ASM Press; 2009. p. 769–802.

Chapitre 34.5

# *Acinetobacter*

## Généralités

Le genre *Acinetobacter* rassemble des bacilles à Gram négatif d'aspect coccoïde en phase stationnaire (1 à 1,5 µm sur 1,5 à 2,5 µm) et parfois difficilement décolorables par la technique de Gram. Ces bacilles aérobies stricts non pigmentés et non fermentaires sont dépourvus de flagelles, ne réduisent pas les nitrates et sont oxydase négatif. La plupart des souches peuvent se développer entre 20 et 30° C dans des milieux minimaux contenant une source de carbone. Le contenu en GC (guanine-cytosine) est compris entre 38 et 45 %, et le test de transformation proposé par Juni fait office de référence pour identifier une souche au niveau du genre *Acinetobacter*. Les génomes d'*A. calcoaceticus* BD413 et d'une douzaine de souches d'*A. baumannii* ont été caractérisés.

## Pouvoir pathogène et habitat

Les *Acinetobacter* sont des micro-organismes ubiquistes de l'environnement naturel et hospitalier, présents dans le sol, l'eau, les milieux aquatiques, les eaux d'égouts ; ils peuvent survivre à la fois sur des surfaces humides et sèches. Certaines espèces ont des particularités remarquables, à l'instar d'*A. venetianus*, capable de dégrader les hydrocarbures. D'autres espèces font partie de la flore cutanée de l'homme et des animaux, en particulier *A. baumannii*, agent fréquent de colonisation cutanée et muqueuse chez les patients hospitalisés en unité de soins intensifs. Cette bactérie est aussi responsable d'infections nosocomiales qui concernent essentiellement l'arbre respiratoire, l'appareil urinaire, les plaies, notamment sur cathéter, et peuvent évoluer vers une bactériémie. D'autres manifestations cliniques ont été observées : pleurésies, péritonite chez les dialysés, méningites, etc. Ces infections se manifestent souvent par bouffées épidémiques et sont dues à des souches multirésistantes. Un traitement antibiotique, un acte chirurgical et un séjour dans une unité de soins intensifs constituent les principaux facteurs de risque à la survenue de ces infections. La prévalence actuelle des infections à *Acinetobacter* est de l'ordre de 9 % dans les CHU, et un peu moindre dans les hôpitaux généraux (environ 7 %). Plus récemment, cette bactérie s'est illustrée comme une cause d'infections graves sur des plaies de guerre lors des conflits en Afghanistan et en Irak avec plus de 100 cas de bactériémies répertoriées.

Le genre *Acinetobacter* comprend actuellement 33 génomospecies dont 22 ont reçu un nom validé par les comités de nomenclature. D'autres n'ont pas reçu de nom du fait de la difficulté de l'identification par les procédés traditionnels. Le genre *Acinetobacter* est désormais inclus dans la famille des *Moraxellaceae*, elle-même incluse dans l'ordre des *Pseudomonadales* et la classe des *Gammaproteobacteria*. Les infections humaines sont dues principalement à *A. baumannii* mais d'autres espèces sont occasionnellement impliquées comme : *A. calcoaceticus, Acinetobacter pittii* (ex sp.3), *A. haemolyticus, A. junii, A. johnsonnii, A. lwoffii, A. radioresistens, Acinetobacter nosocomialis* (ex sp.13 Tjernberg et Ursing), *A. ursingii, et A. schindleri*.

## Prélèvements

Les urines, les cathéters, les aspirations bronchiques, les hémocultures constituent les prélèvements les plus fréquents à l'origine de l'isolement des *Acinetobacter*.

## Examen direct

Les *Acinetobacter* apparaissent sur les frottis de produits pathologiques colorés par la technique de Gram comme des bacilles à Gram négatif difficilement décolorables, souvent coccoïdes et parfois entourés d'une capsule (fig. 34.5.1).

## Milieux de culture

L'isolement en milieu solide peut être obtenu après incubation à température comprise entre 30 et 37 °C sur les milieux conventionnels tous germes (gélose au sang, gélose chocolat, gélose trypticase soja, gélose BCP, etc.) et sur les milieux dédiés aux bacilles à Gram négatif comme la gélose de MacConkey ou la gélose de Drigalski. En revanche, la gélose SS ne permet la croissance que de quelques espèces. Les colonies apparaissent en général lactose négatif sur les milieux lactosés car, lorsque l'attaque oxydative du lactose a lieu, celle-ci est souvent retardée. La réaction d'oxydase est négative. À ce stade, l'aspect à la coloration de Gram constitue une bonne orientation diagnostique.

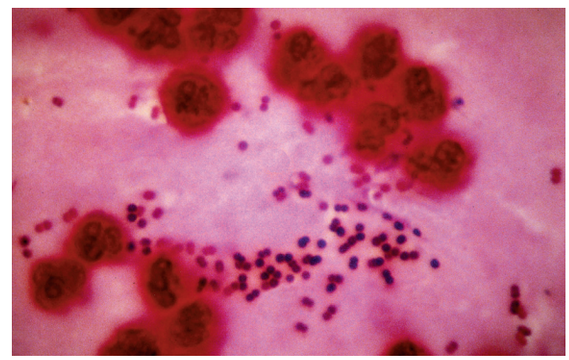


Fig. 34.5.1. – *Coloration de Gram à partir d'une culture sur milieu gélosé.*

## Diagnostic

### *Diagnostic du genre*

Il est en général aisé d'identifier une souche au niveau du genre *Acinetobacter* par le cumul des caractères aérobie strict, l'absence de nitrate réductase, la réaction à l'oxydase négative, l'absence de mobilité. En cas de nécessité, le test de transformation défini par Juni sert de référence. Il repose sur la « réparation » d'un mutant auxotrophe pour le tryptophane de la souche spontanément compétente BD413 qui devient prototrophe au contact d'un extrait d'ADN pourvu que celui-ci provienne d'une souche appartenant au genre *Acinetobacter*.

### *Diagnostic de l'espèce*

L'identification des diverses espèces est difficile. En pratique, l'identification repose sur la capacité de développement à 37, 41 et 44 °C en bouillon trypticase soja après 48 heures et l'hydrolyse de la gélatine et les galeries d'identification commercialisées (API 20 NE®, Biolog) (fig. 34.5.2). Ces procédés ne permettent pas le diagnostic de certitude de l'espèce ; par chance, *A. baumannii*, qui constitue l'espèce de loin la plus distribuée en pathologie humaine, se distingue des autres espèces par sa capacité de développement à 44 °C. Toutefois, certaines souches de l'espèce 13 TU partagent cette aptitude de croître à 44 °C (tableau 34.5.1). L'identification précise requiert les tests d'assimilation de dérivés carbonés ou le recours à différentes techniques reposant sur l'analyse électrophorétique des protéines d'enveloppe ou d'isoenzymes, l'analyse du polymorphisme de gènes amplifiés (spécifiques de l'ARN 16S, ADN gyrase, recA, etc.) ou des régions intergéniques 16S-23S. L'ARDRA (*amplified rDNA restriction analysis*) a été particulièrement documentée. Un protocole associant une PCR multilocus dirigée sur 9 gènes de ménage suivi d'une analyse par spectrométrie de masse a été proposé ; il permet l'identification de l'espèce en 4 heures.

Au sein d'*A. baumannii*, 19 biotypes ont été distingués par les tests d'assimilation et 34 sérovars ont été différenciés ; toutefois, l'identification antigénique n'a pas d'intérêt pratique.

## Recherche de facteur de virulence

Les *Acinetobacter* sont des bactéries peu pathogènes capables de provoquer des infections chez des patients affaiblis ou suite à une plaie traumatique chez les sujets normaux. Les facteurs de virulence sont encore mal élucidés. Le pouvoir pathogène expérimental a été démontré chez la souris grâce à un modèle de pneumopathie obtenu

**Fig. 34.5.2.** – *Identification d'*Acinetobacter *par l'utilisation de galerie API 20E® ou 20 NE®.*

**TABLEAU 34-5-1**

**Caractères différentiels des espèces d'*Acinetobacter* principalement rencontrées en clinique.**

| | *A. calcoaceticus* | *A. baumannii* | *Acinetobacter pittii (ex sp. 3)* | *A. haemolyticus* | *A. junii* | *A. johnsonii* | *A. lwoffii* | *Acinetobacter nosocomialis (ex sp.13 TU)* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Croissance à 37 °C | + | + | + | + | + | – | + | + |
| Croissance à 41 °C | – | + | + | – | + | – | – | + |
| Croissance à 44 °C | – | + | – | – | - | – | – | ± |
| Hydrolyse de la gélatine | – | – | – | + | - | – | – | – |
| Hémolyse | – | – | – | + | - | – | – | – |

après l'administration intratrachéale d'*A. baumannii*. *Acinetobacter*, à l'instar des autres bacilles à Gram négatif, est doté d'un lipopolysaccharide aux propriétés d'endotoxine. La capsule est vraisemblablement un élément majeur de la virulence, protégeant la bactérie de la phagocytose. Enfin, certaines souches produisent des polysaccharides de surface (slime) qui inhibent la migration des polynucléaires neutrophiles.

## Sensibilité aux antibiotiques

Les *Acinetobacter* sont résistants à la pénicilline G. La plupart des espèces expriment une céphalosporinase qui affecte l'activité des céphalosporines de première génération et de l'ampicilline. Les souches protéolytiques d'origine clinique (essentiellement *A. haemolyticus*) sont naturellement résistantes à la tobramycine, à la nétilmicine et à l'amikacine par production d'une 6′-*N*-aminoside acétyltransférase. En revanche, *A. baumannii* a la capacité d'acquérir facilement de nombreux gènes de résistance aux aminosides (par modification de l'antibiotique ou méthylation de l'ARN16S), β-lactamines, chloramphénicol, sulfamides, tétracyclines, etc. Ces déterminants sont portés par des éléments mobiles (plasmides, transposons et cassettes d'intégrons). La résistance aux fluoroquinolones, fréquemment observée, résulte de mutations de l'ADN-gyrase. Plusieurs pompes d'efflux peuvent également contribuer à la résistance. La pompe d'efflux AdeABC est présente chez plus de 60 % des *A. baumannii*; sa surexpression, fréquemment observée chez les souches cliniques, est responsable d'une résistance de bas niveau qui affecte l'activité des aminosides, des quinolones, des tétracyclines et de certaines β-lactamines. Deux autres systèmes d'efflux, AdeIJK et AdeFGH, contribuent par leur surexpression à la mutirésistance. Ces trois pompes affectent l'activité de la tigécycline qui constitue un traitement de recours vis-à-vis des souches multirésistantes.

La présence d'une β-lactamase à spectre élargi (VEB, PER, GES, etc.) a été décrite chez certaines souches épidémiques Sa détection nécessite la recherche de la synergie acide clavulanique–céphalosporine de troisième génération à l'aide de la technique par diffusion en utilisant un milieu de Muller-Hinton additionné de cloxacilline afin d'inhiber la céphalosporinase de l'espèce susceptible de gêner l'interprétation. En conséquence, l'imipénème constitue l'antibiotique le plus constamment actif. Malheureusement, la résistance à ce composé est de plus en plus souvent observée. Différentes carbapénèmases appartenant à des β-lactamases de classe A à l'instar de KPC, des métallo-β-lactamases (classe B), ou encore certaines oxacillinases (classe D), comme OXA-23, OXA-40, OXA-58 et OXA-72, ont été rapportées chez des souches d'*A. baumannii* résistantes à l'imipénème. Toutes ces enzymes sont facilement détectables par le test de Hodge. Les métallo-β-lactamases IMP, VIM et plus récemment NDM1 ont également été détectées chez *A. baumannii*, ce qui témoigne une fois de plus de l'étonnante capacité de ce microorganisme d'acquérir les différents gènes de résistance. La présence d'une métallo-β-lactamase est confirmée par la diminution de la résistance à l'imipénème en présence d'EDTA, mais il faut prendre en compte l'effet inhibiteur marqué de l'EDTA sur cette bactérie afin d'éliminer une mauvaise interprétation. Les infections dues à ces souches peuvent nécessiter l'utilisation de la colimycine, voire du sulbactam, ou aboutir à une situation d'impasse thérapeutique. La multirésistance généralement observée chez les souches à potentiel épidémique est pour partie responsable du taux élevé de mortalité des infections à *A. baumannii*. La détection de ces souches impose l'alerte des réseaux nationaux et localement la mise en place de mesures d'hygiène afin de prévenir toute dissémination.

## Conclusion

*A. baumannii* constitue de loin la principale espèce du genre *Acinetobacter* impliquée en clinique et est responsable de près de 10 % des infections nosocomiales. La multirésistance des souches épidémiques nécessite la surveillance stricte de ces infections et la mise en place de mesures prophylactiques, seules aptes à lutter efficacement contre cette bactérie.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus Acinetobacter with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonnii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol 1986; 36 : 228–40.

Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC, Gürtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from actived sludge. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53 : 953–63.

Dijkshoorn L, Van Harsselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. Syst Appl Microbiol 1998; 21 : 33–9.

Kämpfer P, Tjernberg I, Ursing J. Numerical classification and identification of Acinetobacter genomic species. J Appl Bacteriol 1993; 75 : 259–68.

Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2005; 11 : 868–73 Review.

Jones A, Morgan D, Walsh A, Turton J, Livermore D, Pitt T, et al. Importation of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp infections with casualties from Iraq. Lancet Infect Dis 2006; 6 : 317–8.

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumanii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol 2011; 162 : 393–404.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii* : Emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21 : 538–82.

# Bacilles à Gram négatif exigeants

## Chapitre 34.6

# *Bordetella*

F. Garnier, M.-C. Ploy

## Généralités

Le genre *Bordetella* regroupe une espèce strictement humaine (*B. pertussis*) et des espèces retrouvées à la fois chez l'homme et l'animal (*B. parapertussis*, *B. bronchiseptica B. avium, B. hinzii, B. holmesii* et *B. trematum)* ainsi qu'une espèce de l'environnement retrouvée très rarement chez l'homme (*B. petrii*).

Les bactéries du genre *Bordetella* pathogènes pour l'homme sont classiquement de petits coccobacilles à Gram négatif à coloration bipolaire, immobiles à l'exception de *B. bronchiseptica*.

*B. pertussis* est très court (0,2-0,3 µm X 0,5-0,8 µm) et immobile, d'autres espèces peuvent être plus longues (1-2 µm) voire devenir filamenteuses lors des repiquages.

## Habitat et pouvoir pathogène

Deux espèces de bordetelle sont responsables de la coqueluche, *B. pertussis* qui est strictement humain et *B. parapertussis.* La durée des symptômes est moins longue pour la deuxième espèce. *B. parapertussis* est aussi retrouvée chez les ovins.

*B. bronchiseptica* peut être pathogène pour des hommes fragilisés tels que des immunodéprimés de plus de 45 ans atteints de symptômes respiratoires et souvent fumeurs. Cette espèce se retrouve chez de nombreuses espèces animales.

*B. holmesii* est de plus en plus isolées, cette espèce est responsable de bactériémies survenant généralement chez des patients asplèniques ou drépanocytaires.

D'autres espèces telle que *B. avium, B. hinzii, B. trematum* et *B. petrii* sont rarement rencontrées, ce sont des germes opportunistes.

Depuis quelques années, en l'absence de rappel vaccinal, la transmission de *B. pertussis* ne se fait plus d'enfant à enfant, mais d'adultes ou d'adolescents à des nourrissons non vaccinés.

L'expression clinique de la coqueluche, qui est une maladie très contagieuse, est très variable selon les sujets et on distingue :

- la forme classique typique de l'enfant qui comporte 3 phases après une incubation de 7 à 10 jours :
  – **Phase catarrhale** (1 à 2 semaines) avec des signes non spécifiques d'infection des voies aériennes supérieures et une très grande contagiosité ;
  – **Phase paroxystique** (4 à 5 semaines) quintes de toux, reprises inspiratoires sonores (chant du coq), vomissement, cyanose et possibles complications infectieuses ;
  – **Phase de convalescence** (plusieurs semaines voire plusieurs mois)
- la forme du petit nourrisson (< 6 mois) peut se traduire par une détresse respiratoire avec défaillance polyviscérale et hyperlymphocytose majeure. Cette pathologie peut être grave voire mortelle.
- la coqueluche de l'adulte est souvent méconnue, elle est très fréquente et doit être évoquée devant une toux persistante durant plus d'une semaine.

Les autres bordetelloses se présentent sous forme de manifestations respiratoires, bactériémiques voire localisées par exemple auriculaires ou à type de surinfections de blessures.

## Prélèvements

Devant une suspicion de coqueluche, le prélèvement biologique doit être réalisé le plus précocement possible, on recommande chez le nourrisson l'aspiration nasopharyngée douce à l'aide d'une sonde molle et fine (fig. 34.6.1). Chez les adolescents ou les adultes une personne entraînée peut réaliser un prélèvement naso-pharyngé à l'aide d'un écouvillon en dacron. Afin de familiariser les biologistes avec ce genre de prélèvement et d'optimiser les résultats, une vidéo permettant de visualiser la pratique du prélèvement a été réalisée. On ne peut que conseiller sa visualisation sur le site du CNR (http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/bordet-index.html, Rubrique « activités de service » puis « Aide au diagnostic » puis « Comment faire un prélèvement nasopharyngée »).

Les *Bordetella* autres que *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont isolés à partir de divers prélèvements et sont assez souvent des découvertes fortuites car sans éléments cliniques d'orientation préalables.

## Transport

*B. pertussis* est très fragile et le prélèvement doit être acheminé immédiatement au laboratoire. Le biologiste doit

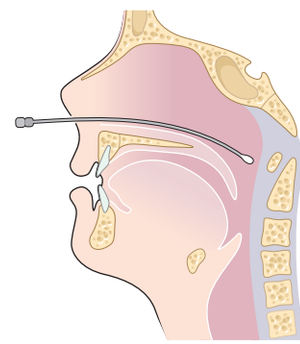


Fig. 34.6.1. – *Aspiration nasopharyngée.*

TABLEAU 34-6-1

**Caractère d'orientation diagnostique des *Bordetella*.**

| *Caractère* | *B. pertussis* | *B. parapertusis* | *B. bronchiseptica* | *B. holmesii* |
|---|---|---|---|---|
| délai de croissance sur Bordet Gengou | 3–5 j | 2 j | 1 j | 2 j |
| Croissance sur gélose au sang | – | + | + | + |
| mobilité | – | – | + | – |
| oxidase | + | – | – | – |
| uréase | – | + | + | – |
| Nitrate réductase | – | – | + | – |

avoir été prévenu afin de préchauffer des milieux de culture pour ensemencer le prélèvement sans délai à son arrivée, moins d'une demi heure après qu'il soit réalisé. Un milieu de transport Amies® avec charbon peut être utilisé si l'acheminement du prélèvement au laboratoire est trop long.

## Culture

Elle doit être tentée systématiquement (spécificité 100 %) dans les 3 premières semaines de la maladie, même si la sensibilité n'est que de 50–60 % durant la 1re semaine de toux.

La culture se fait en aérobiose et en atmosphère humide sur milieux spéciaux spécifiques des Bordetelles à base de pomme de terre : milieux solides de Bordet-Gengou (BG) ou de Regan-Lowe. La température d'incubation est de 35–36 °C et les premières colonies hémolytiques n'apparaissent qu'entre 3 et 7 jours. Celles-ci sont classiquement en « gouttelettes de rosée »

Le diagnostic d'orientation repose sur des tests assez simples (tableau 34.6.1) et peut être confirmé par un test d'agglutination sur lame avec un anti-sérum pour *B. pertussis*.

La viabilité des Bordetelles est très faible à l'exception de *B. bronchiseptica*.

L'antibiogramme est rarement pratiqué, mais il faut noter que les β-lactamines n'ont pas d'efficacité sur *B. pertussis*, les macrolides sont les molécules les plus utilisées pour traiter les infections.

Elle doit être réalisée systématiquement (spécificité 100 %) dans les 2 premières semaines de la maladie (Haut Conseil de la Santé Publique, www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/hcspr20080905_coqueluche.pdf) même si la sensibilité n'est que de 50–60% durant la 1re semaine de toux, période la plus sensible. La culture se négative en 3 à 5 jours après un traitement par macrolides, délai variable selon la molécule utilisée.

La culture se fait en aérobiose et en atmosphère humide sur milieux spéciaux spécifiques des Bordetelles à base de pomme de terre qui auront été préchauffé : milieux solides de Bordet-Gengou (BG) ou de Regan-Lowe. La température d'incubation est de 35–36° C et les premières colonies hémolytiques n'apparaissent qu'entre 3 et 7 jours. Celles ci sont classiquement en « gouttelettes de rosée » (fig. 34.6.2). Un résultat de culture négative ne peut être rendu qu'après 10 jours.

A noter que toute souche de *Bordetella* isolée doit être adressée au centre national de référence de la Coqueluche et autres Bordetelloses. Ces envois permettent au CNR d'étudier la sensibilité des souches aux antibiotiques, de rares souches résistantes à l'érythromycine ont été décrites aux États-Unis, ainsi que le polymorphisme des facteurs de virulence avec la récente description de souches n'exprimant pas la toxine pertussique ou la pertactine.

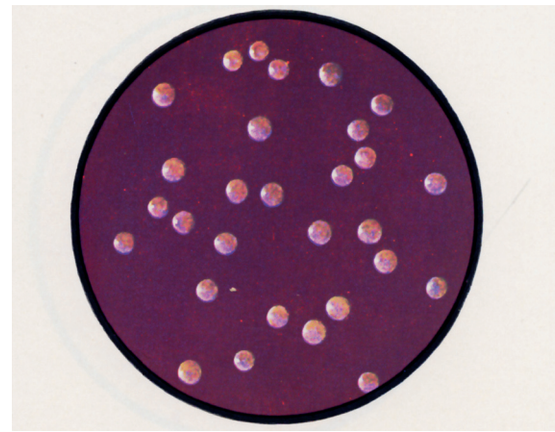


**Fig. 34.6.2.** – *Aspect des colonies de* Bordetella pertussis *sur milieu de Bordet-Gengou à fort grossissement.*

## *Recherche de constituants bactériens sans culture par PCR (polymérase chain réaction)*

L'ADN bactérien est recherché par PCR point final ou par PCR en temps réel pour porter le diagnostic de coqueluche et/ou de *Bordetella* directement sur produit pathologique, prélevé dans les mêmes conditions que pour la culture.

Différentes cibles peuvent être utilisées :

- le promoteur du gène codant la toxine de *pertussis* : une seule copie par génome, spécifique de *B. pertussis* avec une sensibilité de 65 à 80% ;
- des séquences d'insertion (IS), présentes en multi copies, de 10 à plusieurs centaines induisant une meilleure sensibilité, 80 à 100% selon les études.
  - IS*481*, permet la détection de *B. pertussis* et *B. holmesii*, mais parfois aussi celle de *B. bronchiseptica* ;
  - IS1001, permet la détection de *B. parapertussis* mais aussi celle de *B. bronchiseptica* dans certains cas.

La PCR permet de détecter le génome sur une période de trois-quatre semaines après le début de la toux. La positivité de la PCR ne saurait préjuger de la viabilité du germe. Cette technique reste la plus performante mais ne permet pas d'isoler la souche. Elle est soit développée localement en recourant à une technique dite « maison » comme celle recommandée lors de la réunion de consensus (Riffelmann, 2005), soit réalisées à l'aide de kits de détection par PCR en temps réel mis sur le marché par différentes firmes. Une étude comparant quatre kits, Bordetella R-geneÊ- Trousse de PCR en temps réel® (Argène), SimplexaTM Bordetella pertussis/parapertussis® (Eurobio), Bordetella pertussis kit PCR temps réel® (Bioadvance) et SmartCycler Bordetella pertussis/parapertussis assay smart dispenser® (Cepheid) à une PCR temps réel maison a été réalisée. Elle a permis de montrer que les kits n'étaient pas plus performants que les PCR maison et qu'il existait une grande disparité de performance selon les trousses.

Il est à noter que la PCR *B. pertussis* en association avec la PCR *B. parapertussis* est à la nomenclature depuis la parution du Journal Officiel du 15 février 2010 et qu'elle est recommandée chez toute personne ayant des signes cliniques depuis moins de 3 semaines.

## Diagnostic indirect : sérodiagnotic

La sérologie n'a d'intérêt qu'après 4 à 5 semaines de toux chez une personne non vaccinée depuis trois ans afin de pouvoir l'interpréter correctement. En effet, les anticorps n'apparaissent véritablement qu'après 4 à 5 semaines de toux avec un pic à 5 à 6 semaines et leur progression à l'exception du pic est parallèle à celle d'une personne vaccinée depuis moins de 3 ans (fig. 34.6.3). Elle ne doit donc jamais être réalisée chez les nouveau-nés, les nourrissons et les enfants, elle était possible chez les adolescents et adultes après avoir correctement évalué l'intérêt de cette prescription. La technique de référence est la détection par technique ELISA d'IgG anti-toxine Pertussis (PT) spécifique de *B. pertussis* dans le sérum. Actuellement, aucun kit commercial n'est validé en France et seul le CNR la pratique. Lorsque la sérologie est faite à bon escient, elle peut être rendue positive si le taux d'anticorps anti-PT est élevé (>100 U par ELISA) ou s'il existe une vraie augmentation du taux (x4) entre deux sérum prélevés à 3–4 semaines d'intervalle, résultats rarement obtenus en réalité.

Par contre, depuis la parution du *Journal Officiel* du 15 février 2010, la sérologie de *B. Pertussis* n'étant plus à la nomenclature, elle ne doit plus être réalisée mais remplacée quand cela est possible par une PCR pour une recherche simultanée de *B. pertussis* et *parapertussis*.

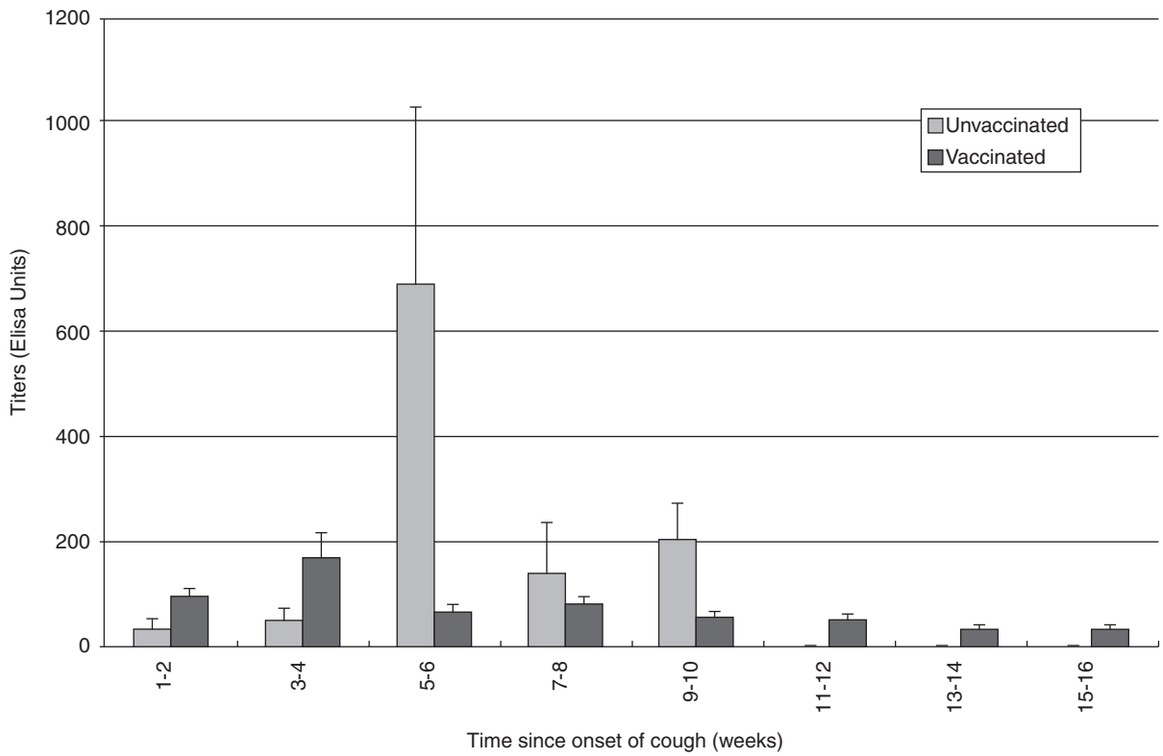



**Fig. 34.6.3.** – *Cinétique d'apparition des anticorps anti-PT (toxine* Pertussis*) après vaccination et après primo-infection.* D'après Simondon F, Iteman I, Preziosi MP, Yam A, Guiso N. Evaluation of an Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Pertussis* Toxin and Filamentous Hemagglutinin in Diagnosis of *Pertussis* in Senegal. Clin. Diag. Lab. Immun. 1998 5: 130–134.

### Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme n'est pratiqué que par le CNR, mais il faut savoir que les infections à *B. pertussis* sont traitées par les macrolides. De rares souches de *B. pertussis* résistantes à l'érythromycine ont été décrites aux USA, la plupart des fluoroquinolones sont très actives, tandis que les β-lactamines sont sans action. *B. parapertussis* est généralement moins sensible que B. pertussis. Quant aux autres Bordetella, elles ont des sensibilités comparables aux autres bacilles à Gram négatif non fermentant.

Il faut rappeler que l'épidémiologie de la coqueluche s'est complètement transformée avec la vaccination. Les vaccins à « germes entiers » ont été retirés du commerce et remplacés par les vaccins « acellulaires ». Six protéines sont actuellement bien connues et susceptibles d'induire une protection chez l'homme ; ces antigènes sont la toxine de *pertussis* (PT), l'adenyl cyclase-hémolysine (AC-Hly) et les adhésines telles que l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), la pertactine (PRN) et les fimbriae (FIM). Tous les vaccins contiennent au moins la PT et certains une ou plusieurs adhésines (FHA, PRN ou FIM). Il n'existe pas de vaccin anticoquelucheux seul, il est toujours combiné à différentes valences, diphtérie, tétanos, poliomyélite, *H. influenzae* b ou hépatite B, la formule variant selon les spécialités.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Bordetella*. In: Bactériologie Clinique. 3e ed. Paris : Ellipses Ed; 2000. p. 364–73.

Grimprel E, Njamkepo E, Begue P, Guiso N. Rapid diagnosis of pertussis in young infants: comparison of culture, PCR and infant's and mother's serology. Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4 : 723–6.

Guide des vaccinations 2006. Chap. Coqueluche. www.sante.gouv.fr/index.htlm.

Guiso N. Bordetella. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. «Actualités permanentes en Bactériologie clinique». ESKA; 2002. Section VIII-chap 19 20 p.

Haut Conseil de la Santé Publique. rapport relatif à la conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de coqueluche 5 septembre 2008. http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/hcspr20080905_coqueluche.pdf.

Journal Officiel du 15 Février 2010.

Kosters K, Riffelmann M, Dohrn B, Wirsing von Konig C. Comparison of five commercial enzyme-linked immunosorbent, assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7 : 422–6.

Njamkepo E, Guiso N. Bordetella pertussis. In: Denis F, editor. Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. Paris : John Libbey Eurotext; 2002. p. 163–81.

Riffelmann M, Wirsing von Konig CH, Caro V, Guiso N. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. J Clin Microbiol 2005; 43 : 4925.


**ADRESSES UTILES**


**Centre National de référence de la Coqueluche et autres Bordetelloses**
Unité de prévention et thérapie moléculaires des maladies humaines
Dr Nicole Guiso

Institut Pasteur
25–28, rue du Docteur-Roux
75724 Paris Cedex 15
Tel. : 01 45 68 80 05 - Fax : 01 40 61 35 33
E-mail : cnr-bordetella-coqueluche@pasteur.fr
Réseau Renacoq


## Chapitre 34.7

# *Moraxella* et *Oligella*

F. Denis, M.-C. Ploy

### Généralités

Ce genre occupe une place restreinte en pathologie sous nos latitudes.

Le genre *Moraxella* est constitué classiquement de coccobacilles, mais la morphologie peut varier, allant de formes coccoïdes à des formes bacillaires trapues disposées souvent par paires ou parfois en courtes chaînettes. Ce sont des bactéries à Gram négatif avec parfois une difficulté à la décoloration pouvant les rendre faussement à Gram positif, aérobies stricts, oxydase +, immobiles.

À ce jour, les *Moraxella* sont clairement différentes des *Acinetobacter* (formes bacillaires oxydase –) cultivant sur milieux usuels et des *Branhamella* par leur quasi-absence d'attaque des sucres. Il existe une vingtaine d'espèces appartenant au genre *Moraxella*, isolées chez l'homme ou l'animal.

Le genre *Oligella* comprend deux espèces, *O. urethralis* et *O. ureolytica*.

## Habitat et pouvoir pathogène

Les *Moraxella* ont pour habitat le tractus respiratoire supérieur, la sphère génitale et les conjonctives.

Les infections à *Moraxella* sont rares en pathologie humaine, mais certaines espèces sont associées plus spécifiquement à certaines infections. Ainsi, *M. lacunata* est l'agent de la conjonctivite subaiguë décrite par Morax, conjonctivite contagieuse et souvent bilatérale.

*M. nonliquefaciens* est retrouvé dans des pathologies respiratoires ; les espèces *M. atlantae, M. phenyl-pyruvica* sont surtout rencontrées chez les immunodéprimés.

Les espèces du genre *Oligella* ont été principalement décrites dans des infections du tractus urinaire.

## Diagnostic bactériologique

Le diagnostic est uniquement direct car il n'existe pas de sérodiagnostic.

### *Prélèvements*

En dehors des prélèvements conjonctivaux pour lesquels on peut faire une recherche orientée, les isolements de *Moraxella* sont découverts au hasard à partir de prélèvements respiratoires ou urogénitaux, beaucoup plus rarement d'hémocultures, les infections systémiques étant rares.

Ces germes sont assez fragiles ; aussi, le transport doit être rapide si l'on ne recourt pas à des milieux de transport.

L'examen direct peut être évocateur, uniquement dans un contexte de conjonctivite épidémique, avec observation de formes coccobacillaires

### *Culture*

Si toutes les souches de *Moraxella* sont susceptibles de cultiver sur gélose au sang de mouton ou de cheval à 5 %, certaines poussent mieux sur gélose « chocolat », voire nécessitent (ce qui n'est pas rare), notamment pour *M. lacunata*, l'addition de sérum. Les cultures se font en atmosphère humide à 33 à 35 °C et une atmosphère de $CO_2$ est conseillée.

Sur les géloses, on observe des colonies translucides convexes de petite taille en 18 à 24 heures qui peuvent atteindre 3 mm en 48 heures. Une hémolyse peut être observée pour certaines espèces. Les colonies de *M. lacunata* sont souvent de plus petite taille, avec un halo noir sur gélose chocolat.

L'identification de ces germes aérobies stricts à métabolisme oxydatif, oxydase +, souvent catalase + et inertes sur les hydrates de carbone est facilitée par le recours à des galeries miniaturisées (API 20 NE®, ID 32 GN®) qui permettent le diagnostic d'espèces, surtout pour *M. lacunata* et *M. oslensis*. *M. lacunata* est la seule espèce à posséder une gélatinase et une Tween 80 estérase. *M. atlantae* est la seule espèce à posséder une pyrrolidonyl aminopeptidase.

La morphologie est parfois d'interprétation difficile et un Gram pratiqué sur des colonies proches de disques de pénicilline permet parfois de trancher en faveur de formes bacillaires.

Les principaux caractères distinctifs figurent au tableau 34.7.1.

Le diagnostic d'espèce est parfois difficile et nécessite le séquençage de l'ARN 16S.

### *Sensibilité aux antibiotiques*

Les *Moraxella* et *Oligella* sont le plus souvent sensibles aux β-lactamines, aminosides, quinolones, mais *M. lacunata* et *M. nonliquefaciens* peuvent produire des β-lactamases.

**TABLEAU 34-7-1**

**Caractères d'identification des principales espèces de *Moraxella* et d'*Oligella*.**

| | *Moraxella* | | | | | | *Oligella* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *lacunata* | *bovis* | *nonliquefaciens* | *atlantae* | *phenyl-pyruvica* | *osloensis* | *urethralis* | *ureolytica* |
| Oxydase | ± | + | + | + | + | + | + | + |
| Catalase | + | ± | + | + | + | + | + | + |
| Nitrate réductase | + | – | + | – | (+) | ± | – | + |
| Uréase (Christensen) | – | – | – | – | + | – | – | + |
| Sérophilie | + | ± | – | – | – | – | – | – |
| Hémolyse | – | + | – | – | ± | – | ± | ± |
| Gélatinolyse | + | + | – | – | – | – | – | – |
| Citrate | – | – | – | – | – | – | – | + |
| Phénylalanine désaminase | + | + | + | + | + | – | + | + |

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil F. *Branhamella-Moraxella*. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses ; 2000. p. 107–12.

Catlin BW. Branhamella catarrhalis : an organism gaining respect as pathogen. Clin Microbiol Rev 1990 ; 3 : 293–320.

Kodgo A. *Moraxella*. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2002 [Section VIII, chapter 2].

Riou JY, Guibourdenche M. Méthodes de laboratoire *Neisseria* et *Branhamella*. Paris : Institut Pasteur ; 1992.

## Chapitre 34.8

# *Francisella*

F. Denis, M.-C. Ploy

## Généralités

Les bactéries du genre *Francisella* sont responsables de la tularémie. Ce sont des coccobacilles à Gram négatif (0,2 µm × 0,2 à 0,7 µm), immobiles, aérobies stricts.

Ce sont des pathogènes hautement contagieux dont l'isolement ne peut être réalisé que dans des laboratoires de sécurité de niveau P3.

La difficulté de culture et cette contrainte sécuritaire font que la recherche dans les laboratoires de routine est à proscrire.

## Habitat et pouvoir pathogène

Les *Francisella* sont largement distribuées dans l'environnement et peuvent résister plusieurs semaines au moins dans le milieu extérieur ou dans des cadavres d'animaux. Elles infectent de nombreuses espèces animales sauvages ou domestiques.

La tularémie est due à l'espèce *F. tularensis* qui et un pathogène obligatoire chez l'homme et l'animal. Il existe trois sous-espèces, *tularensis, holarctica* et *mediasiatica* qui ont une distribution géographique différente.

L'homme se contamine rarement par piqûre de tique (vecteur), le plus souvent par contact direct avec un animal porteur, fréquemment lors du dépeçage de l'animal (lièvre, lapin, etc.), parfois par inhalation, voire ingestion.

Selon la porte d'entrée, on rencontre des formes ulcéroganglionnaires des membres (membre supérieur le plus souvent), avec lésions vésiculopustuleuses et adénopathie axillaire volumineuse, des formes oculaires, oropharyngées, pulmonaires, thyphoïdiques, avec rarement une dissémination hématogène.

Certaines souches présentes dans l'eau peuvent être des pathogènes opportunistes chez l'homme (*F. novicida* et *F. philomiragia*).

## Diagnostic bactériologique

### *Diagnostic direct*

#### Prélèvements

La recherche de *Francisella* se fait le plus souvent à partir de lésions cutanées, de ponctions ganglionnaires, plus rarement à partir d'expectorations, de prélèvements conjonctivaux, pharyngés ou d'hémocultures.

#### Culture

L'isolement est difficile car la culture est lente, fastidieuse et peu sensible. On utilise des milieux riches : milieu de Francis, gélose « chocolat » avec isovitalex/polyvitex, ou milieu *Legionella* BCYE contenant de la cystéine. Les géloses seront incubées pendant 14 jours à 37 °C en aérobiose, et normalement les colonies commencent à apparaître au bout de 2 à 3 jours. Les colonies sont de 1 à 2 mm,

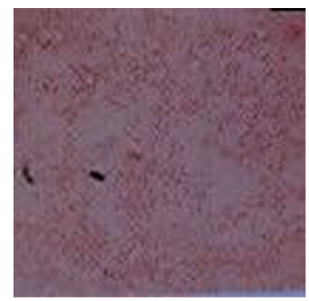


**Fig. 34.8.1.** – *Coloration de frottis révélant la présence de* F. tularensis *sous forme de coccobacilles à Gram négatif.* Photographie J.-M. Alonso.

grisâtres, glaireuses. Après coloration, on observe des coccobacilles à Gram négatif très fins (fig. 34.8.1). Il est préférable de réaliser la coloration de Gram avec de la fuchsine plutôt qu'avec de la safranine, les bacilles pouvant être à peine visibles avec une coloration à la safranine.

*F. tularensis* est oxydase –, faiblement catalase + et possède une β-lactamase, uréase –, et n'est pas exigeant en facteurs X et V. On peut identifier le genre *Francisella* par agglutination avec un sérum spécifique. Il n'existe pas de galeries biochimiques permettant d'identifier les espèces du genre *Francisella*, et les souches doivent être envoyées au laboratoire de référence pour une confirmation de l'identification.

Les souches de *F. tularensis* sont parfois capsulées, immobiles, oxydase –, nitrate réductase –, acidifient le glucose et le maltose, mais pas le saccharose.

On peut rechercher le pouvoir pathogène sur animal (animalerie protégée) (fig. 34.8.2).

## Sensibilité aux antibiotiques

À noter que l'activité des β-lactamines est faible. Les souches sont sensibles aux fluoroquinolones, aminosides, tétracyclines, chloramphénicol.

## Amplification génique

La PCR réalisée sur des lésions cutanées, des ponctions ganglionnaires, voire du sang permet de pallier les difficultés d'isolement. Une technique de PCR en temps réel permettant de différencier les types A et B a été récemment décrite. La PCR est plus sensible que la culture et a été utilisée à partir de différents prélèvements cliniques, mais il existe des réactions croisées avec *F. novicida*.

Cette technique est réservée aux laboratoires spécialisés.

**Fig. 34.8.2.** – *Étude du pouvoir pathogène de* F. tularensis *sur souris inoculée par voie intrapéritonéale.*

## Diagnostic indirect : sérodiagnostic

La sérologie est la méthode de diagnostic de la tularémie la plus utilisée. Les anticorps apparaissent habituellement après 2 semaines d'évolution, avec un pic au bout de 1 à 2 mois ; on utilise le plus souvent une réaction d'agglutination. Le seuil considéré comme significatif est le 1 : 160e, mais l'idéal est de disposer d'une paire de sérums prélevés à 15 jours d'intervalle (dont le premier aussi précoce que possible) et d'observer une séroconversion. À noter qu'il existe des réactions croisées avec les *Brucella* mais pas avec *F. novicida* et *F. philomiragia*).

La technique ELISA est peu répandue. Les anticorps peuvent persister 10 ans et la présence d'IgM ne signe donc pas toujours une infection récente.

Au total, le diagnostic direct de tularémie par culture ou PCR est réservé à des laboratoires spécialisés (sécurité niveau P3) et la très grande majorité des diagnostics est portée par la sérologie. Du fait de la difficulté du diagnostic, les résultats doivent toujours être confrontés à la clinique.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil F. *Francisella tularensis*. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 2000. p. 374–7.

Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, Petersen JM. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. Emerg Infect Dis 2006; 12 : 1799–1801.

Maurin M. *Francisella*. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2003 [Section VIII, chapter 7].

Thalhammer F, Eberl G, Kopetzki-Kagler U. Detection of *Francisella tularensis* in clinical specimens by use of polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1998; 26 : 764–5.


**ADRESSE UTILE**


**Centre national de référence *Francisella tularensis***
Pr Max Maurin
CHU de Grenoble, Service de bactériologie et virologie
BP 217
38043 Grenoble cedex
Tél. : 04 76 76 54 79. Fax : 04 76 76 59 12
E-mail : mmaurin@chu-grenoble.fr

Chapitre 34.9

# *Pasteurella*

F. Denis, M.-C. Ploy

## Généralités

Les *Pasteurella* sont des petits bacilles à Gram négatif à coloration habituellement bipolaire qui ont une forme allant de coccobacilles (0,3 à 1 µm) à des aspects plus longs (2 à 5 µm) (fig. 34.9.1). Les chaînettes sont rares. Ce sont des bactéries immobiles.

La température de croissance optimale est de 37 °C. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies dont la croissance est accrue en microaérophilie. Elles sont le plus souvent oxydase + et catalase +. Toutes les souches sont sensibles au composé vibriostatique O129.

Quatre espèces sont principalement impliquées en pathologie humaine : *P. multocida*, *P. dagmatis, P. canis* et *P. stomatis,* avec une nette prédominance de la première espèce. L'espèce *multocida* est divisée en trois sous-espèces : *multocida*, *septica*, *gallicida*.

## Habitat et pouvoir pathogène

Les *Pasteurella* sont des bactéries commensales du rhinopharynx de nombreux animaux, notamment de mammifères et d'oiseaux.

Elles peuvent survivre dans le milieu extérieur.

Les pasteurelloses d'inoculation sont assez fréquentes (100 à 500 cas par million d'habitants et par an en France), consécutives le plus souvent à des morsures de chiens ou de chats, ceux-ci étant pour près de la moitié d'entre eux porteurs asymptomatiques au niveau de la cavité buccale ; mais griffures ou léchages sont parfois à l'origine de l'infection.

La forme aiguë est caractérisée par la brièveté de l'incubation (quelques heures), avec des douleurs très vives qui irradient très vite au membre concerné ; la plaie est rapidement inflammatoire et œdématiée avant extension, à type de lymphangite. La fièvre est inconstante. Il existe des formes subaiguës.

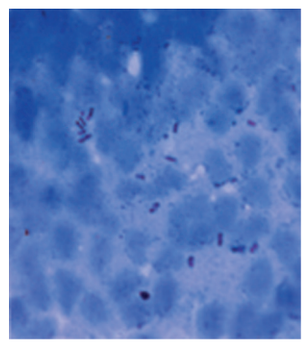


**Fig. 34.9.1.** – *Frottis de sang de cobaye montrant des* Pasteurella.

Le facteur majeur de pathogénicité est supporté par une toxine peptidique codée par le gène *tox A*, toxine qui a un pouvoir dermonécrotique et ostéolytique.

En dehors des pasteurelloses d'inoculation, on peut observer des septicémies, des endocardites, des formes pleuropulmonaires, des méningites et des manifestations diverses purulentes.

Dans tous les cas, *P. multocida* arrive en première place (près des trois quarts des souches isolées chez l'homme).

## Diagnostic bactériologique direct

### *Prélèvements*

Pour les formes locales ou locorégionales, on prélève précocement, avant mise sous traitement, la sérosité au niveau de la porte d'entrée en pressant si possible les berges.

On utilise soit un écouvillon, soit une ponction à l'aiguille fine. L'acheminement doit être rapide ou, à défaut, on a recours à un milieu de transport.

Pour les formes systémiques, le diagnostic est le plus souvent porté lors d'une découverte fortuite à partir d'hémocultures, de cultures de LCR, de liquide pleural, de prélèvements respiratoires. L'orientation diagnostique se fait essentiellement d'après les renseignements cliniques, la notion de morsure animale étant primordiale.

La coloration de frottis réalisée à partir du produit pathologique montre rarement des aspects évocateurs.

## Isolement et identification

Il est indispensable d'ensemencer deux types de milieux enrichis :

- une gélose au sang cuit incubée à 37 °C sur 72 à 96 heures en atmosphère de $CO_2$ ;
- une gélose au sang incubée en anaérobiose pendant au moins 48 heures à 37 °C.

Par ailleurs, on peut recourir à un milieu sélectif contenant 2 mg/l d'amikacine et 4 mg/l de vancomycine pour les prélèvements que l'on soupçonne d'être polymicrobiens. À noter que les *Pasteurella* ne poussent pas sur milieu au citrate de Simmons et généralement pas sur gélose de MacConkey.

Sur gélose au sang cuit, les colonies lisses peuvent atteindre un diamètre de 2 mm en 48 heures ; elles sont grisâtres ou jaunâtres (fig. 34.9.2). Les souches capsulées sont muqueuses. Sur gélose au sang, on n'observe pas d'hémolyse. En bouillon, un trouble homogène apparaît en 24 heures.

La nature du prélèvement, l'examen direct (petits bacilles à Gram négatif immobiles) (fig. 34.9.2) et les

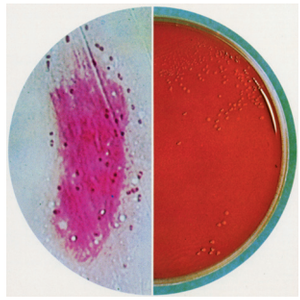


**Fig. 34.9.2.** – *Coloration de Gram montrant* P. multocida *à gauche, l'aspect des colonies sur gélose au sang à droite.*

caractères oxydase + (avec réactifs au tétraméthyl-p-phénylènediamine), nitrate-réductase +, la fermentation du glucose, l'absence de LDC, d'ADH, de gélatinase et la sensibilité au O129 (2,4 diamino-6, 7 diisoprophyl-ptéridine) par la méthode des disques (sensibilité retrouvée également pour *Actinobacillus*) permettent une orientation diagnostique.

Les milieux usuels d'identification des *Enterobacteriaceae* conviennent parfaitement à l'identification des *Pasteurella* galerie API 20E®, automates Vitek®, etc. Les principaux caractères conduisant au diagnostic d'espèce sont recensés dans le tableau 34.9.1.

On peut arriver au diagnostic de sous-espèces de *P. multocida* (tableau 34.9.2).

Sur les cinq types capsulaires reconnus au sein de l'espèce *P. multocida* désignés par les lettres A à F, seuls les types A et D ont été isolés chez l'homme. On peut les caractériser à l'aide de méthodes immunologiques ou par détection des gènes spécifiques par PCR.

## Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme par la méthode des disques doit être réalisé sur Mueller-Hinton supplémenté par 5 % de sang ou de sérum, en utilisant un inoculum à $10^6$ bactéries/ml à partir d'un bouillon de 18 heures ou une suspension ajustée à 0,5 de l'échelle de MacFarland.

Les pasteurelles sont habituellement sensibles à la pénicilline G et à l'ampicilline, mais des β-lactamases ont été décrites et elles doivent être systématiquement recherchées grâce au test à la nitrocéphine. Ces enzymes sont inactivées par l'acide clavulanique. Les céphalosporines de troisième génération sont actives, de même que les fluoroquinolones et le cotrimoxazole. Les aminosides ont une activité modérée.

## Diagnostic indirect : sérodiagnostic

Le sérodiagnostic repose sur la mise en évidence d'anticorps dirigés contre la capsule et le lipopolysaccharide (LPS). Le sérodiagnostic a peu d'intérêt en pratique, vu sa faible sensibilité.

**TABLEAU 34-9-1**

**Caractères distinctifs entre les principales espèces de *Pasteurella* et apparentées, dont *Mannheimia*.**

| | *Sensibilité au O129* | *ODC* | *Indole* | *Uréase* | *Fermentation* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Glucose | Maltose | Mannitol |
| *P. multocida* | + | + | + | – | + | – | + |
| *P. canis* | + | + | d | – | + | – | – |
| *P. dagmatis* | + | – | + | + | + gaz | + | – |
| *P. stomatis* | + | – | + | – | + | – | – |
| *« P. » pneumotropica* | + | + | + | + | + | d | – |
| *M. haemolytica* | + | – | – | – | + | + | + |

**TABLEAU 34-9-2**

**Caractères distinctifs de trois sous-espèces de *P. multocida*.**

| *Sous-espèce de P. multocida* | *Sorbitol* | *Dulcitol* |
|---|---|---|
| *multocida* | + | – |
| *septica* | – | – |
| *gallicida* | + | + |

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Pasteurella*. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 2000. p. 260–7.

Donnio PY. *Pasteurella*. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2006 [Section VIII, chapter 17].

Lemenand O, Donnio PY, Avril JL. Pasteurelloses. EMC (Elsevier SAS Paris) 2006; Maladies infectieuses 8-035-C-10.

## Chapitre 34.10

# Autres bacilles à Gram négatifs isolés de morsures

F. Denis, M.-C. Ploy

Ces bactéries sont présentes dans la flore buccale des animaux et peuvent être retrouvées dans des plaies ou lors de septicémies consécutives à des morsures. Ce sont de petits bacilles à Gram négatif, immobiles, oxydase +, catalase +, donnant de petites colonies qui se développent lentement sur gélose au sang ou gélose « chocolat » incubées dans une atmosphère enrichie en $CO_2$.

*Eikenella corrodens* est décrit après des morsures par des chiens ou des hommes. *Streptobacillus moniliformis* est décrit après des morsures par des rats. Les caractères permettant de les distinguer de *P. multocida* sont présentés dans le tableau 34.10.1.

**TABLEAU 34-10-1**

**Principaux bacilles à Gram négatif retrouvés dans des morsures.**

| *Caractères* | *Eikenella corrodens** | *P. multocida* | *Streptobacillus moniliformis* | *CDC EF-4* | *C. canimorsus** | *Neisseria weaveri* | *Bergeyella zoohelcum* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Croissance sur MacConkey | – | – | – | d | – | d | – |
| Attaque du glucose par voie fermentative | – | + | + | + | + | – | – |
| Réduction des nitrates | + | + | – | + | – | – | – |
| Production d'indole | – | + | – | – | – | – | + |
| Uréase | – | – | – | – | – | – | + |
| Gélatinase | – | – | – | d | – | – | + |
| ODC | + | + | | – | – | – | – |
| ADH | – | – | – | + | d | – | – |
| Production possible d'un pigment | | – | | + | – | + | – |

* Voir chapitre « Bactéries du groupe HACEK ».

## Chapitre 34.11

# *Haemophilus*

O. Barraud, F. Denis, M.-C. Ploy

## Généralités

Les bactéries du genre *Haemophilus* sont de petits bacilles à Gram négatif immobiles, non sporulés, polymorphes allant de formes coccobacillaires à des formes longues (0,3 µm × 0,5 à 2 µm), aéro-anaérobies facultatives. La température optimale de croissance est de 35 à 37 °C.

Les espèces du genre exigent pour leur culture un ou deux facteurs de croissance, le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide ou coenzyme I) et l'hémine, dénommés respectivement facteurs V et X.

Le genre comporte, outre l'espèce type *H. influenzae*, 15 autres espèces dont 2 exigent le facteur X, 10 le facteur V et 3 les deux facteurs (tableau 34.11.1).

**TABLEAU 34-11-1**

**Exigence en facteurs de croissance des souches d'*Haemophilus* rencontrées chez l'homme.**

| Exigence en facteurs | | |
|---|---|---|
| *X+V* | *X (hémine)* | *V (NAD)* |
| *H. influenzae*<br>*H. aegyptius*<br>*H. haemolyticus* | *H. haemoglobinophilus*<br>*H. ducreyi* | *H. parainfluenzae*<br>*H. parahaemolyticus*<br>*H. paraphrohaemolyticus*<br>*H. paraphrophilus*<br>*H. pleuropneumoniae*<br>*H. segnis* |
| X variable | | |
| | *H. aphrophilus (Aggregatibacter)* | |

## Habitat et pouvoir pathogène

Les *Haemophilus* font partie de la flore normale des voies respiratoires et de la cavité buccale de l'homme (50 à 80 % des individus) ; ils peuvent aussi être présents au niveau des muqueuses génitales, voire du tube digestif.

*Haemophilus influenzae* est une bactérie pyogène qui provoque des infections invasives graves (incidence de 1,2/100 000 habitants en 2008), tout particulièrement chez l'enfant de moins de 1 an (4,2/100 000) et le sujet très âgé (de 1,6/100 000 chez les 65–69 ans à près de 10/100 000 au-delà de 94 ans). Les facteurs de virulence comprennent une IgA1 protéase, des pili et la capsule polysaccharidique (6 types capsulaires de a à f), voire l'endotoxine. De 1998 à 2008, l'incidence des méningites à *H. influenzae* est restée stable (0,08/100 000 habitants) ; en revanche, les infections invasives à type de bactériémies isolées ont progressé, notamment chez les plus de 64 ans. Les souches capsulées sont à l'origine de méningites alors que, pour les bactériémies, il peut aussi s'agir de souches non capsulées. Les épiglottites surviennent chez le jeune enfant (2 à 7 ans). D'autres localisations sont observées lors d'infections systémiques : arthrites, cellulites, pneumonies, etc. Les otites moyennes, les sinusites, de même que les conjonctivites sont généralement dues à des souches non capsulées. Chez l'adulte, où les localisations pulmonaires et bronchopulmonaires sont les plus fréquentes, les souches sont généralement non capsulées. D'autres localisations sont néanmoins possibles.

L'épidémiologie des infections invasives de l'enfant (bactériémies, méningites, épiglottites, cellulites, etc.) dues à *H. influenzae* sérotype b a été complètement transformée par la vaccination qui a permis de diminuer non seulement le nombre de méningites à *H. influenzae* (près de 500 cas en 1991 contre moins de 50 en 2008), mais aussi le portage nasopharyngé grâce à des anticorps anti-PRP (polyribosil ribitol phosphate constitutif de la capsule) protecteurs. Les méningites dues aux autres sérotypes sont exceptionnelles (sérotype a chez les Indiens d'Amérique ou aborigènes du Canada, sérotype d chez un enfant au Portugal en 2010).

*H. ducreyi* est responsable du chancre mou.

*H. aegyptius* est classiquement un agent de conjonctivite aiguë dans les pays chauds, mais un clone particulier est aussi responsable d'une nouvelle pathologie, la fièvre purpurique brésilienne, pouvant entraîner purpura, collapsus et mort brutale.

*H. parainfluenzae* peut intervenir dans des infections de l'adulte rarement systémiques.

*H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. aphrophilus* (désormais *Aggregatibacter aphrophilus*) et *H. paraphrophilus* peuvent être responsables d'endocardites, voire d'abcès. Des bactéries appartenant à un groupe génomique proche d'*H. haemolyticus*, les *Haemophilus* génitaux, sont responsables d'infections maternofœtales et néonatales.

## Diagnostic bactériologique

### *Prélèvements*

Les prélèvements, a priori monomicrobiens (non contaminés par les flores commensales) sont les liquides céphalorachidiens (LCR), les hémocultures, les liquides d'épanchement, les prélèvements respiratoires profonds, etc. Ils sont plus simples à traiter, et l'isolement d'*Haemophilus* signera une forte imputabilité dans la pathologie.

À noter que, devant une suspicion de méningite ou de pneumopathie, on doit pratiquer, outre les prélèvements locaux, des hémocultures. Devant des cellulites, on pratique des hémocultures, et si le site anatomique s'y prête, une ponction ou un écouvillonnage sur fond de biopsie.

Les prélèvements venant de la sphère génitale ou du tractus respiratoire supérieur sont susceptibles d'être polymicrobiens et/ou contaminés. Les prélèvements génitaux (vaginal, endocervical voire endo-utérin), de même que ceux réalisés sur chancre à la recherche d'*H. ducreyi* sont traités à part dans cet ouvrage.

Pour les prélèvements de l'appareil respiratoire, on doit privilégier les prélèvements protégés (brossage distal protégé par exemple) ; la bactériologie, même quantitative, des lavages, aspirations bronchiques voire d'expectorations pose des problèmes d'interprétation.

## Transport

Même si les *Haemophilus* sont plus résistants qu'on ne le pense généralement, il est conseillé soit un transport rapide des échantillons, soit le recours à un milieu de transport (TGV, Portagerm®) si le délai d'acheminement est supérieur à 3 heures.

## Examen direct

L'observation de bacilles à Gram négatif polymorphes allant de coccobacilles à des formes filamenteuses, avec parfois une capsule visible, est évocatrice du genre *Haemophilus* lors de l'examen d'un LCR purulent après traitement par cytocentrifugation (la densité microbienne étant souvent élevée) (fig. 34.11.1A). La lecture est parfois plus délicate sous traitement (fig. 34.11.1B) et la confusion n'est pas exceptionnelle avec un pneumocoque capsulé et décoloré. L'interprétation des examens directs de produits pathologiques polymicrobiens est souvent difficile, même pour un observateur entraîné.

La recherche d'*H. ducreyi* nécessite d'autres colorations pour rechercher les bacilles et leur groupement en chaînette (chaînes de bicyclette).

## Culture

Les milieux de culture doivent contenir les facteurs X et V, même si les besoins en facteurs X sont réduits en anaérobiose.

Pour la mise en culture des **produits pathologiques attendus** « **monomicrobiens** », on ensemence des géloses au sang cuit obtenues par chauffage modéré entraînant la libération des facteurs X et V à partir des globules rouges. La gélose « chocolat » est un milieu nutritif complexe contenant de l'hémine auquel doit être ajouté du NAD.

Différents suppléments sont disponibles : VX® (Difco), Isovitalex® (BBL), Polyvitex® (bioMérieux). Rappelons que *S. aureus*, en produisant le facteur V, permet une culture satellite des souches d'*Haemophilus*, et ce sur gélose au sang qui apporte le facteur X.

Actuellement, les milieux commerciaux précoulés enrichis et les flacons d'hémoculture offrent toutes les garanties quant à la croissance des *Haemophilus*.

La recherche d'*Haemophilus* à partir de **produits potentiellement contaminées par de la flore commensale et donc polymicrobiens** (tractus respiratoire, prélèvements génitaux) utilise ces milieux enrichis rendus sélectifs par l'addition d'antibiotiques : bacitracine (75 mg/ml), voire bacitracine + vancomycine + clindamycine, ou bacitracine + vancomycine + amphotéricine B. Certains milieux sélectifs sont vendus précoulés (Oxoid, Becton-Dickinson, Sanofi Pasteur ou bioMérieux avec la « chocolat *Haemophilus*-gélose »).

L'incubation se fait en atmosphère humide enrichie de 5 à 10 % de $CO_2$, à une température optimale de 33 à 35 °C. La durée de surveillance des cultures va généralement de 18 à 48 heures ; elle peut être prolongée pour les hémocultures où certaines espèces particulières peuvent nécessiter des temps d'incubation plus longs.

Les colonies sont, pour les souches capsulées, assez grosses, muqueuses (3 mm de diamètre) ; elles sont plus petites, convexes ou plates pour les non-capsulées, et la coloration des frottis réalisés à partir de ces colonies révèle des bacilles à Gram négatif polymorphes.

## Éléments d'orientation

L'exigence en facteur X et V constitue la première étape du diagnostic différentiel (fig. 34.11.2). Pour cette recherche, l'inoculum bactérien ne doit pas apporter ces facteurs (bouillon d'hémoculture, sang) ; il est réalisé en partant de colonies prélevées en surface et mises en suspension en solution saline (9 ‰). Plusieurs méthodes sont utilisables. Nous préférons la méthode des disques imprégnés de facteurs X, V ou X + V (Oxoid, BBL, Rosco). Un inoculum léger (2 à 3 colonies en eau stérile) est ensemencé en nappe sur gélose trypticase-soja, puis on dispose, à distance, les trois disques. Après incubation, on recherche la croissance autour de chacun des disques permettant de préciser les exigences en facteur X, V ou X + V.

Dans certains cas, la diffusion de X et de V à partir des disques permet une culture en zone de confluence où les deux facteurs ont diffusé (fig. 34.11.3).

Il est aussi possible de réaliser un test à la porphyrine. Ce test est le meilleur pour confirmer les besoins en facteur X. Les souches X indépendantes peuvent métaboliser

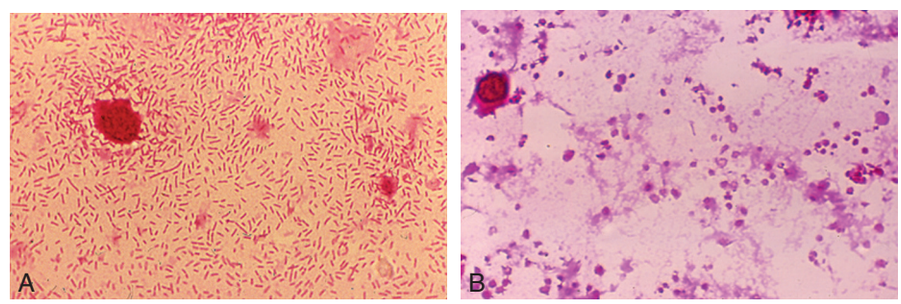



**Fig. 34.11.1.** – *Examen direct d'un liquide céphalorachidien de méningite à* H. influenzae *b avec, avant traitement (A), forte densité de bacilles à Gram négatif polymorphes, et (B) contrôle après traitement par ceftriaxone avec aspect de sphéroplastes.*

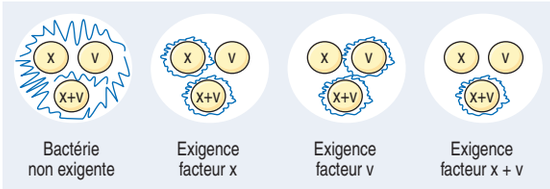



**Fig. 34.11.2.** – *Représentation schématique de l'aspect des cultures autour des disques permettant de préciser les exigences en facteur de croissance.*

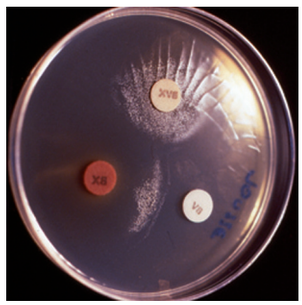


**Fig. 34.11.3.** – *Aspect de satellitisme observé montrant la double exigence en facteur X + V d'*Haemophilus influenzae.

l'acide delta-aminolévulinique en hémine (fig. 34.11.4), ce que ne peuvent faire les souches exigeantes. On peut fabriquer soi-même un milieu bien défini (encadré 34.11.1) et rechercher les métabolites (Kovacs ou UV), ou bien utiliser des tablettes porphyrine (d-ALA) (Rosco).

L'exigence en $CO_2$ est appréciée en comparant les cultures sous 5 à 10 % de $CO_2$ et en atmosphère usuelle.

L'oxydase est généralement lente à apparaître ; la recherche de la catalase, positive, est également utilisée. L'hémolyse sur gélose au sang doit être recherchée sur primo culture (à la faveur d'un test de satellitisme).

Ces caractères permettent une première orientation (tableau 34.11.2).

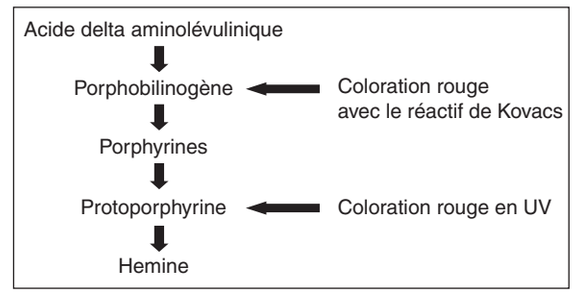



**Fig. 34.11.4.** – *Détection des composés intermédiaires dans la voie biosynthétique de l'hémine par les* Haemophilus.

**ENCADRÉ 34.11.1**

### Milieu pour recherche de la synthèse des porphyrines

Acide delta-aminolévulinique (Sigma) : 31,8 mg
$MgSO_4$ : 9,6 mg
Tampon phosphate pH 6,9 ; 0,1 µ : 100 ml
Pour le tampon $PO_4$ :
– 55,4 ml d'une solution à 14,2 g/l de $Na2HPO_4$
– 44,6 ml d'une solution à 13,6 g/l de $KH2PO_4$
Filtrer sur membrane : diamètre 0,45 µ
Congeler à –20 °C en aliquots (0,5 ml)
Garder jusqu'à 6 mois

## *Identification complète par galerie*

Le recours à des galeries d'identification toutes prêtes permet de préciser dans 90 % des cas les diagnostics pour *H. influenzae* et *parainfluenzae*. Elles ont des performances plus inconstantes pour les *Haemophilus* génitaux, *H. aphrophilus* et *paraphrophilus* ou *H. actinomycetemcomitans* devenus *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ces minisystèmes comportent la recherche d'activités enzymatiques et l'utilisation des sucres ; ils sont nombreux, distribués par AES, Becton Dickinson,

**TABLEAU 34-11-2**

**Caractère d'orientation vers le diagnostic d'espèces usuelles d'*Haemophilus*.**

| | *Exigence en facteur* | | *Synthèse porphyrine* | *Exigence $CO_2$* | *Oxydase* | *Catalase* | *Hémolyse* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *X* | *V* | | | | | |
| *H. influenzae* | + | + | – | – | + | + | – |
| *H. haemolyticus* | + | + | – | – | + | + | + |
| *H. parainfluenzae* | – | + | + | d | + | + | d |
| *H. segnis* | – | + | + | – | – | (+) | – |
| *H. aphrophilus** | – | – | + | + | – | – | – |
| *H. paraphrophilus* | – | + | + | + | + | – | – |

(+) faible ; d : variable.
* *Aggregatibacter aphrophilus.*

**TABLEAU 34-11-3**

**Caractères biochimiques des *Haemophilus* rencontrés chez l'homme.**

| | Synthèse porphyrines | Exigence facteur V | Hémolyse | Acidification D-glucose | D-fructose | Saccharose | Lactose | D-xylose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *H. influenzae* | – | + | – | + | – | – | – | + |
| *H. aegyptius* | – | + | – | (+) | – | – | – | – |
| *H. haemolyticus* | – | + | + | + ( g) | f | – | – | d |
| *H. parainfluenzae* | + | + | – | + ( g) | + | + | – | – |
| *H. parahaemolyticus* | + | + | + | + ( g) | + | + | – | – |
| *H. paraphrohaemolyticus* | + | + | + | + | + | + | – | – |
| *H. aphrophilus* | f | – | – | + ( g) | + | + | + | – |
| *H. paraphrophilus* | + | + | – | + ( g) | + | + | + | – |
| *H. segnis* | + | + | – | f | f | f | – | – |

| | D-ribose | D-mannose | D-galactose | Maltose | Mélibiose | Tréhalose | Raffinose | $H_2S$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *H. influenzae* | + | – | + | + | – | – | – | – |
| *H. aegyptius* | (+) | – | (+) | (+) | – | – | – | – |
| *H. haemolyticus* | + | – | + | + | – | – | – | + |
| *H. parainfluenzae* | – | + | + | + | – | – | – | + |
| *H. parahaemolyticus* | – | – | d | + | – | – | – | + |
| *H. paraphrohaemolyticus* | – | – | d | + | – | – | – | + |
| *H. aphrophilus** | + | + | + | + | – | + | + | – |
| *H. paraphrophilus* | + | + | – | + | + | + | – | + |
| *H. segnis** | – | – | f | f | – | – | – | – |

d : variable ; f : faible ; g : gaz
* *Aggregatibacter.*

Baxter Health Care ou bioMérieux. Il peut être utile de disposer des caractères détaillés (tableau 34.11.3).

À noter qu'une identification génotypique est possible grâce aux sondes froides gen-Probe® sur culture, mais non commercialisées en France.

La spectrométrie de masse par technologie MALDI-TOF permet d'identifier les espèces du genre *Haemophilus* en quelques secondes.

Pour les espèces *H. influenzae* et *H. parainfluenzae*, l'identification des biotypes est intéressante sur le plan épidémiologique. Elle repose sur trois caractères biochimiques : ornithine-décarboxylase, uréase et production d'indole. Kilian a distingué 8 biotypes pour *H. influenzae* et 3 pour *H. parainfluenzae* (tableau 34.11.4).

À noter que les souches invasives capsulées de *H. influenzae* appartiennent le plus souvent au biotype I, celles présentes au niveau des muqueuses respiratoires supérieures au biotype II. Les *Haemophilus* génitaux sont à prendre en considération en tant qu'agent d'urétrite ou de vaginite. Lorsqu'ils sont retrouvés en culture abondante ou pure, ils sont également responsables d'infections néonatales et maternofœtales ; ils ne peuvent être distingués phénotypiquement des *Haemophilus influenzae* de biotype 4 et ils sont génotypiquement proches d'*H. haemolyticus* et *H. influenzae* ; leur différenciation avec ces autres espèces est réalisée avec une PCR ciblant le gène de l'ARN16S (Quentin et al., 1996).

La sérotypie complète l'identification pour les souches d'*H. influenzae* capsulées. On distingue 6 sérotypes définis par M. Pittman désignés par les lettres a, b, c, d, e, f. On utilise des sérums monovalents (Difco, Murex, Pharmacia) pour agglutination sur lame ou contre-immunoélectrophorèse.

À noter que les latex d'*H. influenzae* b peuvent aussi être utilisés pour caractériser les antigènes capsulaires b, ce sérotype regroupant la majorité des souches invasives.

D'autres marqueurs peuvent être utilisés par des laboratoires spécialisés : électrophorèse de protéines de membrane externe, des isoenzymes, ribotypie, etc.

### Diagnostic rapide

La recherche d'antigènes capsulaires b d'*H. influenzae* (antigènes solubles) peut être pratiquée sur les liquides biologiques, LCR, sérum décomplémenté, urines concentrées, par différentes méthodes : latex sensibilisé, coagglutination, immunochromatographie, avec d'excellentes performances pour le LCR.

TABLEAU 34-11-4

**Biotypes d'*H. influenzae et parainfluenzae*.**

| Espèces \ Caractères | | Ornithine décarboxylase | Urée | Indole | ONPG | Oxydase | Catalase | Réduction des nitrates |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *H. influenzae* | | | | | | | | |
| Biotype | I | + | + | + | – | + | + | + |
| | II | – | + | + | – | + | + | + |
| | III | – | + | – | – | + | + | + |
| | IV | + | + | – | – | + | + | + |
| | V | + | – | + | – | + | + | + |
| | VI | + | – | – | – | + | + | + |
| | VII | – | – | + | – | + | + | + |
| | VIII | – | – | – | – | + | + | + |
| *H. parainfluenzae* | | | | | | | | |
| Biotype | I | + | – | – | + | + | d | + |
| | II | + | + | – | d | + | d | + |
| | III | + | + | – | d | + | + | + |

La recherche de génome d'*H. influenzae* par PCR (voire la détermination génomique du sérotype) fait partie du spectre des génomes bactériens recherchés par un nombre croissant d'hôpitaux essentiellement sur LCR et sérum en cas de suspicion de méningites bactériennes.

## Diagnostic indirect

La recherche et le titrage d'anticorps dirigés contre l'antigène capsulaire b ne sont réalisés en pratique que pour contrôler la réponse postvaccinale.

## Sensibilité aux antibiotiques

*H. influenzae* est habituellement sensible aux aminopénicillines, céphalosporines de 2e et 3e générations, aminosides, fluoroquinolones, rifampicine, triméthoprime, tétracyclines, chloramphénicol. Les macrolides et streptogramines sont peu actifs sur *Haemophilus influenzae*.

Cependant, les souches d'*H. influenzae* peuvent être résistantes à l'ampicilline par production de β-lactamase plasmidique de type TEM. Cela peut concerner 30 % des souches en France. Ces souches sont alors sensibles à l'association ampicilline + inhibiteurs de β-lactamase.

L'antibiogramme des *Haemophilus* est délicat et fait l'objet des recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). On peut recourir à la diffusion en gélose en utilisant un milieu au sang cuit supplément en Polyvitex®, un milieu HTM (*Haemophilus* Test Medium ; Sanofi Pasteur) ou Mueller-Hinton additionné d'extrait de Fildes (Difco).

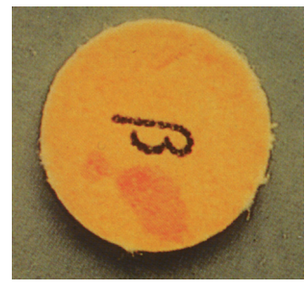


**Fig. 34.11.5.** – *Recherche positive de β-lactamase sur disque de nitrocefin avec coloration rouge à l'endroit du dépôt.*

Dans tous les cas, même si on se trouve devant une souche sensible aux β-lactamines, on doit pratiquer sur celle-ci, dès l'isolement, une recherche de β-lactamase par technique chromogénique (céfinase, nitrocefin) (fig. 34.11.5).

Mais il existe aussi des souches résistantes à l'ampicilline et ne produisant pas de β-lactamase. Ces souches, principalement isolées de prélèvements respiratoires, sont appelées BLNAR (β-*lactamase negative ampicillin resistant*) par opposition aux souches BLPAR productrices de β-lactamase. La résistance est alors de bas niveau et difficile à détecter ; elle est due à une mutation de la cible (diminution d'affinité des PLP3) ; les inhibiteurs de β-lactamase ne restaurent pas dans ce cas l'activité de l'ampicilline et doivent être catégorisés intermédiaires ; l'imipénem présente également une activité moindre ; les céphalosporines de 3e génération restent sensibles. Les souches d'*Haemophilus* BLNAR représentaient 15,5 %

des souches non typables en France entre 2001 et 2003. Cette résistance de bas niveau doit être recherchée à l'aide d'un disque de céfalotine selon les recommandations du CA-SFM. Environ 5 % des souches présentent les deux mécanismes de résistance : BLNAR et BLPAR.

Le cas d'*H. ducreyi* est abordé dans le chapitre des infections sexuellement transmissibles. Cette espèce de culture difficile nécessite des milieux de culture particuliers, souvent un diagnostic par PCR. L'agent du chancre mou est sensible à l'azithromycine et à la ceftriaxone.

### Prophylaxie

La vaccination contre *H. influenzae* b est réalisée avec un vaccin conjugué. Elle comporte trois injections à 2, 3 et 4 mois suivies d'un rappel à 16 à 18 mois. Il s'agit d'un vaccin combiné penta- ou hexavalent qui a démontré une remarquable efficacité (taux d'anticorps protecteurs requis : 0,15 µg ml) et entraîné une régression spectaculaire des infections invasives. Les rares échecs sont le plus souvent associés à des vaccinations incomplètes ou à des déficits immunitaires.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Haemophilus*. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 2000.

Direction Générale de la Santé, Comité technique des vaccinations. Guide des vaccinations. Paris : INPES; 2006.

Kilian M. *Haemophilus*. In : Lennette H, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, editors. Manual of clinical microbiology. Washington : American Society for Microbiology; 1985. p. 387–93.

Quentin R, Renaud F, Freney J. *Haemophilus*. In : Précis de bactériologie clinique. 2 Paris : ESKA; 2007. p. 1407–26.

Quentin R, Ruimy R, Roseneau A, Musser JM, Christen R. Genetic indentification of cryptic genospecies of *Haemophilus* causing urogenital and neonatal infections by PCR using specific primers targeting genes coding for 16S rRNA. J Clin Microbiol 1996; 34 (6) : 1380–5.


**ADRESSE UTILE**


**Centre national de référence *Haemophilus influenzae***
Dr Olivier Gaillot
Pôle de biologie pathologie génétique du CHU
de Lille
Boulevard du Pr J. Leclercq,
59 037 Lille cedex
Tél. : 03 20 44 53 80 – Fax : 03 20 44 48 95
E-mail : olivier.gaillot@chru-lille.fr


## Chapitre 34.12

# *Yersinia*

F. Denis, M.-C. Ploy

## Généralités

Le genre *Yersinia* regroupe des bacilles droits, parfois coccobacillaires de 0,5 à 0,8 µm × 1 à 3 µm à Gram négatif présentant parfois une coloration bipolaire, non capsulés, non sporulés, immobiles à 37 °C et pour certaines espèces mobiles à 30 °C. Les bactéries appartenant à ce genre ont un développement optimal vers 30 à 32 °C, mais une virulence ne s'exprimant qu'à 37 °C.

Les *Yersinia* sont actuellement rattachées aux *Enterobacteriaceae* avec les caractères oxydase négative, catalase positive, aéro-anaérobies facultatifs, fermentation du glucose et le plus souvent réduction des nitrates en nitrites.

Ce genre comporte actuellement trois espèces pathogènes principales : *Y. pestis*,*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*.

## Habitat et pouvoir pathogène

*Y. pestis* est responsable de la peste. Le couple puce–rongeur constitue le réservoir, mais la bactérie survit plusieurs mois dans le sol ou les terriers. La puce transmet *Y. pestis* de rongeur à rongeur et accidentellement des rongeurs à l'homme. À partir de la piqûre, la multiplication bactérienne entraîne une nécrose tissulaire puis un bubon ou adénite pesteuse qui siège le plus souvent au niveau de l'aine, plus rarement au cou ou à l'aisselle, localisation dépendant du siège de la

porte d'entrée. La bactérie se dissémine précocement par voie lymphatique, provoquant la peste bubonique précédant parfois des formes septicémiques et pulmonaires. La transmission interhumaine est possible par les sécrétions bronchopulmonaires provoquant des pestes pulmonaires primitives. La contamination par aérosols est possible dans les laboratoires ou dans un contexte bioterroriste. La transmission interhumaine respiratoire se fait si la distance est inférieure à 2 mètres. Sur ces 20 dernières années, une vingtaine de pays a notifié plus de 30 000 cas de peste. Les gènes de virulence sont essentiellement plasmidiques et les facteurs produits permettent une multiplication extracellulaire efficace et une inhibition du système immunitaire. La virulence de *Y. pestis* explique que le pronostic vital est engagé, tout particulièrement dans les formes pulmonaires ; certaines formes foudroyantes entraînent la mort en quelques heures. Le bacille de la peste peut persister plusieurs années dans le sol sans perdre sa virulence. Il peut donc recontaminer les rongeurs.

*Y. pseudotuberculosis* a pour réservoir le sol ; l'homme se contamine par contact direct avec des animaux proches de l'homme (chat, rongeurs « domestiques ») qui éliminent la bactérie dans leurs fèces, voire par ingestion d'aliments souillés.

*Y. enterocolitica* a un réservoir très vaste : environnement (eaux, sols), ou animaux (rongeurs, porcs, etc.), avec souches adaptées ou non à des espèces animales voire à l'homme. Ainsi, les biovars 4 (sérogroupe O : 3), 3 (O : 5) et 2 (O : 9) sont les plus fréquents chez l'homme en Europe.

La contamination se fait essentiellement par voie digestive, exceptionnellement par contact ou griffure de chat.

*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* sont responsables des yersinioses, infections qui se présentent sous formes digestives (adénolymphite mésentérique, plus rarement iléite chez les grands enfants ou les adultes, gastro-entérites fébriles chez les enfants de moins de 6 ans), septicémiques sur terrain fragilisé, ou extradigestives.

*Y. enterocolitica* est responsable d'entérocolite chez le jeune enfant, d'adénite mésentérique chez l'adolescent et l'adulte jeune. Les formes septicémiques sont plus rares et surviennent sur un terrain fragilisé, immunodéprimé, et des manifestations cliniques variées ont été décrites (abcès profonds, endocardite, méningite, etc.).

À noter la possibilité de choc septique lors d'une transfusion de globules rouges ou de plaquettes, *Y. enterocolitica* étant en effet capable de se multiplier à 4 °C.

*Y. pseudotuberculosis* est surtout responsable d'adénite mésentérique.

Une arthrite réactionnelle (surtout chez les sujets HLA B27) ou un érythème noueux sont assez communs au décours d'une infection à *Yersinia*.

## Diagnostic bactériologique direct

### Prélèvements

Pour la peste, il faut rappeler que la culture doit être pratiquée dans une unité de haute sécurité (P3 ou P4). La recherche s'effectue à partir de ponction de bubon, d'expectorations, voire d'hémocultures ; en post mortem, on réalise les mêmes prélèvements et on pratique en plus des mises en culture de prélèvements hépatiques, spléniques et pulmonaires.

Pour les yersinioses non pesteuses, la recherche est réalisée sur selles ou ganglions mésentériques. La découverte de *Yersinia* dans des hémocultures ou autres prélèvements est fortuite (hors produits sanguins avec recherche classique de *Y. enterocolitica*).

*Y. enterocolitica* peut persister dans les selles plusieurs semaines après la guérison et peut être aussi être retrouvé dans les selles dans les cas d'atteintes articulaires ou d'érythème noueux, ce qui n'est pas le cas pour *Y. pseudotuberculosis*.

### Transport

Pour *Y. pestis*, les prélèvements doivent être conservés à basse température (4 °C) voire ensemencés sur place en milieu de transport de Carry Blair.

Pour les autres *Yersinia*, le transport doit s'effectuer également au froid ; ce procédé peut constituer un moyen d'enrichissement.

## Diagnostic bactériologique proprement dit

### Examen direct

*Y. pestis* est un petit bacille à Gram négatif pléiomorphe à coloration bipolaire que l'on peut voir sous forme capsulée sur frottis d'organe ; on le recherche de préférence avec la coloration de Wayson.

Les autres *Yersinia* ont une morphologie comparable, avec pour *Y. pseudotuberculosis* une coloration bipolaire plus marquée que pour *Y. enterocolitica*.

### Culture

*Y. pestis* se développe sur milieux gélosés usuels Drigalski, MacConkey, etc., et sur milieu sélectif CIN (cefsulodine, irgasan, novobiocine). La température optimale est de 25 à 28 °C et les colonies n'apparaissent le plus souvent qu'en 48 heures sur milieu gélosé. Les hémocultures doivent être conservées 4 à 5 jours à 25 °C. En milieu liquide, le trouble est inhomogène avec un voile en surface et un aspect floconneux en profondeur.

Un des caractères importants est l'immobilité à 22 °C comme à 37 °C par manque de ciliature. La galerie « entérobactéries » doit être incubée à 28 °C, sauf pour uréase et ONPG, recherchées à 37 °C. Les caractères biochimiques différentiels sont indiqués dans le tableau 34.12.1. On distingue trois biotypes chez *Y. pestis* (tableau 34.12.2), biotypes ayant des répartitions historiques et géographiques différentes.

Le diagnostic différentiel entre *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* est parfois délicat (90 % d'homologie) et requiert l'étude de la séquence nucléotidique du gène *rpoB*. À noter que, récemment, un test immunochromatographique a été

**TABLEAU 34-12-1**

**Caractères différentiels des espèces du genre *Yersinia*.**

| Caractères / Espèces | *Y. pestis* | *Y. pseudo tuberculosis* | *Y. entero colitica* | *Y. inter media* | *Y. frederik senii* | *Y. kristen senii* | *Y. nuckeri* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mobilité 25 °C | – | + | + | + | + | + | d |
| Lysine-décarboxylase | – | – | – | – | – | – | + |
| Ornithine-décarboxylase | – | – | + | + | + | + | + |
| Uréase | – | + | + | + | + | + | – |
| Citrate de Simmons (25 °C) | – | – | – | + | d | – | + |
| Vosges-Proskauer (25 °C) | – | – | ± | + | + | – | d |
| Production indole | – | – | d | + | + | d | – |
| γGT | – | d | + | + | + | + | + |
| Acidification | | | | | | | |
| Rhamnose | – | + | – | + | + | – | – |
| Saccharose | – | – | + | + | + | – | – |
| Glucoside | – | – | – | + | – | – | – |
| Sorbitol | – | – | + | + | + | + | – |
| Raffinose | – | d | – | + | – | – | – |
| Mélibiose | d | + | – | + | – | – | – |
| Test ONPG | + | + | + | + | + | + | + |

d : variable.

**TABLEAU 34-12-2**

**Différenciation des biotypes de *Y. pestis*.**

| *Biotype* | *Glycérol* | *Nitrate* | *Répartition* |
|---|---|---|---|
| *Antiqua* | + | + | Afrique et Asie Centrale |
| *Medievalis* | + | – | Kurdistan, Caspienne |
| *Orientalis* | – | + | Mondiale |

développé ; il est rapide (10 minutes), simple (réalisable au lit du patient), applicable aux prélèvements humains (liquides de bubon, expectorations), avec des performances comparables à la culture. Il est réservé bien sûr aux zones d'endémie.

La recherche de marqueurs épidémiologiques, sérotypie, lysotypie, ribotypage, etc., est du domaine de laboratoires spécialisés, de même que la recherche de facteurs de pathogénicité.

Pour les autres *Yersinia*, on peut, pour les prélèvements polymicrobiens (selles, aliments, etc.), tenter un enrichissement durant plusieurs jours ou semaines à basse température (+ 4 °C) en milieu liquide (eau peptonée, tampon PBS).

Soit directement, soit à partir du milieu liquide d'enrichissement, on va, pour les selles, utiliser des milieux sélectifs pour coproculture, incubés à 30 °C :

- milieux contenant des sels biliaires (MacConkey, Hektoen, Wauters, SS, DCL) ;
- milieu sélectif (CIN).

Sur CIN, les colonies sont petites (0,5 mm) en 24 heures, pour atteindre 2 à 3 mm en 48 heures, avec un centre rouge foncé caractéristique (fig. 34.12.1).

Certaines souches de *Y. pseudotuberculosis* ne poussent pas sur CIN.

L'isolement à partir des autres prélèvements tient au hasard, les *Yersinia* n'étant pas exigeantes.

*Y. enterocolitica* et *pseudotuberculosis* possèdent une uréase très active qui peut être recherchée par un test rapide. Ensuite, une identification biochimique complète sera réalisée.

En dehors des caractères généraux des entérobactéries, on peut être orienté par une mobilité à 25 °C (par ciliature péritriche) et une immobilité à 37 °C, des caractères TDA/PDA négatifs (ce qui permet une différenciation avec les *Proteus*), un test ONPG positif sans que les souches possèdent une β-galactosidase, des caractères LDC –, ADH –. La galerie « entérobactérie » permet de confirmer

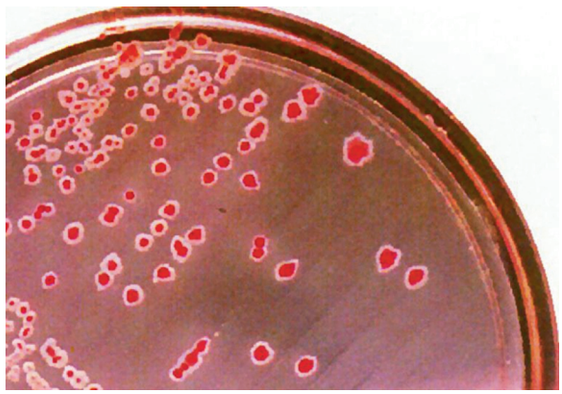


**Fig. 34.12.1.** – *Aspect des colonies d'*Y. enterocolitica *sur gélose CIN.*

**TABLEAU 34-12-3**

**Différents chimiotypes (biovars) d'*Yersinia enterocolitica*.**

| *Caractère* | *Biovar* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1* | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Production indole | + | + | – | – | – |
| Désoxyribonucléase | – | – | – | + | + |
| Lipase (Tween 80) | + | – | – | – | – |
| Réduction nitrates en nitrites | + | + | + | + | – |
| Acidification | | | | | |
| D-xylose | + | + | + | – | d |
| Saccharose | + | + | + | + | d |
| D-Tréhalose | + | + | + | + | – |

* Il existe 2 biotypes A et B esculine, salicine, pyramidase tous + pour 1A et – pour 1B.

l'espèce (*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*). On différencie ces deux espèces notamment sur les caractères ODC, VP et saccharose, négatifs pour *Y. pseudotuberculosis*, positifs pour *Y. enterocolitica*.

À noter que certains caractères, tels que le citrate de Simmons et le VP, sont plus nets et plus rapides à 25 °C qu'à 37 °C.

Le diagnostic différentiel d'espèce avec des espèces plus rares se fait sur la galerie (tableau 34.12.1).

On peut, en outre, au sein de l'espèce *Y. enterocolitica*, distinguer 5 biovars entre eux (tableau 34.12.3).

Par la caractérisation des sérovars au sein des antigènes O, on dénombre pour *Y. pseudotuberculosis* 8 sérogroupes (I à VIII) et pour *Y. enterocolitica* sensu stricto plus de 29 antigènes O. Ce typage est réalisé par le Centre national de référence (CNR). Les sérovars O : 3 et O : 9 sont les plus fréquents chez *Y. enterocolitica*, et pour *Y. pseudotuberculosis*, le type I prédomine.

### *Sensibilité aux antibiotiques*

La sensibilité aux antibiotiques de *Y. pestis*, à la streptomycine, la tétracycline, le chloramphénicol, molécules couramment utilisées dans les traitements curatifs, est classique. Toutefois, l'isolement récemment à Madagascar de souches multirésistantes, y compris vis-à-vis de ces antibiotiques, doit faire pratiquer cette recherche de résistance liée à un plasmide autotransférable.

Sur antibiogramme standard, on observe habituellement pour *Y. pseudotuberculosis* une sensibilité aux β-lactamines, aminosides. En revanche, *Y. enterocolitica* est naturellement résistant à l'ampicilline et amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline et aux céphalosporines de 1re génération par production d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase. Les souches sont sensibles aux céphalosporines de 3e génération, aux aminosides et aux fluoroquinolones.

## Diagnostic indirect ou sérodiagnostic

Dans la peste, on observe une positivité des anticorps 6 à 10 jours après le début de la maladie, avec un pic vers le 15e jour de la maladie. On recherche les anticorps dirigés contre la capsule (fraction F1) d'*Y. pestis* ; la technique la plus utilisée est l'hémagglutination passive (PHA) de globules rouges de mouton, mais la spécificité est médiocre. Aussi, rien ne remplace le diagnostic direct, même si les performances d'un test ELISA sont prometteuses.

Pour les autres yersinioses, on utilise généralement des techniques d'agglutination en ayant recours à des antigènes de I à V pour *Y. pseudotuberculosis* et O : 3, O : 5 et O : 9 pour *Y. enterocolitica*. On tente de mettre en évidence une montée des anticorps en sachant que le pic est atteint durant la 2e semaine de la maladie ; à défaut, les titres supérieurs ou égaux au 1/200e par agglutination classique et au 1/40e en microagglutination sont considérés comme significatifs.

Des communautés antigéniques entre *Y. enterocolitica* O : 9 et les *Brucella* sont observées ainsi qu'entre *Y. pseudotuberculosis* (II et IV) et *Salmonella*.

La sérologie est surtout utile dans les formes extradigestives des yersinioses.

## Conclusion

Si le diagnostic bactériologique de peste ne se pose que dans les zones d'endémie, la recherche des *Yersinia pseudotuberculosis* et *enterocolitica* fait partie de la routine d'un laboratoire de biologie, notamment à partir des selles.

À noter que la peste est une maladie à déclaration obligatoire (numéro 9).

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Yersinia*. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 2000. p. 220–9.

Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica* : the charisma continues. Clin Infect Dis 1997; 10 : 257–76.

Butler T. *Yersinia infections* : centennial of the discovery of the plague Bacillus. Clin Infect Dis 1994; 19 : 655–63.

Croze M, Monnet D, Freney J. Autres entérobactéries. In : Freney F, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2 Paris : ESKA; 2007. p. 1087–119.

Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G, et al. Multidrug resistance of *Yersinia pestis* mediated by a tranferable plasmid. N Engl J Med 1997; 337 : 677–80.

Hovette P, Camara P. Peste. Encycl Med Chir 2001; 8 Maladies infectieuses 8-039-V-20.

McEvedy C. La peste bubonique. Pour la Science 1988; 4 : 72–8.

Pinon G, Colloc ML, Parvery F. Tribu des Yersiniae. In : Carbonnelle B, Denis F, Marmonier A, Pinon G, Vargues R, editors. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris : SIMEP; 1987. p. 135–6.

Simonet M. *Yersinia pestis*. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2 Paris : ESKA; 2007. p. 1081–6.

Simonet M, Catteau M. *Yersinia enterocolitica* et alimentation humaine. Bull Soc Fr Microbiol 1997; 12 : 359–63.

**ADRESSE UTILE**

**Centre national de référence Peste et autres Yersinioses**
Institut Pasteur, Laboratoire des *Yersinia*
28, rue du Docteur Roux,
75724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83 26 – Fax : 01 40 61 30 01
E-mail : cnr.yersinia@pasteur.fr

## Chapitre 34.13

# Bactéries du groupe HACEK

P. Riegel

## Généralités

Les bacilles à Gram négatif sont constitués par des bactéries de bonne croissance comme les entérobactéries, les *Pseudomonas* et apparentés et les espèces du groupe *Vibrio-Aeromonas-Plesiomonas*, mais aussi par des bactéries de croissance difficile nécessitant des conditions de culture particulières. Parmi ces dernières, il est décrit un groupe d'espèces dont les caractères communs sont une croissance nulle ou faible sur milieux nutritifs simples, mais nettement plus abondante sur une gélose supplémentée par du sang et/ou par l'addition de $CO_2$ dans l'atmosphère d'incubation. Ces bactéries sont pour la plupart commensales des muqueuses, notamment de celle de la cavité buccale, mais elles peuvent être responsables d'endocardites et d'abcès cérébraux. Il a été ainsi défini un groupe de bactéries de croissance difficile dénommé HACEK qui comprend classiquement les espèces *Haemophilus* (*Aggregatibacter*) *aphrophilus*, *Actinobacillus* (*Aggregatibacter*) *actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et *Kingella kingae*. D'autres espèces, notamment des genres *Actinobacillus, Dysgonomonas*, *Haemophilus*, *Kingella,* ou *Neisseria*, présentent ces mêmes caractéristiques. De plus, les espèces du genre *Capnocytophaga* pourraient être intégrées dans ce groupe qui serait alors dénommé HACCEK. L'utilisation plus fréquente de la biologie moléculaire et l'apparition de nouvelles technologies comme outils d'identification ont permis depuis quelques années une meilleure reconnaissance de ces bactéries comme agents infectieux (tableau 34.13.1).

De même, des bacilles Gram négatif de l'environnement des genres *Methylobacterium* et *Paracoccus* présentent des croissances lentes et exigeantes. Bien que certaines de ces bactéries soient aérobies strictes, elles constituent toutes un diagnostic différentiel avec les bactéries du groupe HACEK.

Il ne faut pas oublier que toute bactérie peut voir son métabolisme modifié dans certaines conditions (présence d'antibiotiques, infections chroniques, etc.) et se révéler alors de culture exigeante.

**TABLEAU 34-13-1**

**Position du groupe HACEK parmi les principaux bacilles à Gram négatif.**

| *Exigence particulière de croissance* | *Fermentation* | *Principaux genres bactériens* |
|---|---|---|
| Aucune | + | *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pasteurella*, entérobactéries |
| | – | *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* |
| Addition de sang ± $CO_2$ | + | Groupe HACEK, *Actinobacillus, Capnocytophaga, Kingella, Streptobacillus, Haemophilus* (exigence en facteur V et/ou X) |
| | – | *Brucella*, *Neisseria* (espèces bacillaires), *Methylobacterium*, *Paracoccus* |
| Milieux et/ou conditions spécifiques | – | *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Bordetella pertussis*, *Legionella*, *Francisella* |

**Bactéries *fastidious* – Points à retenir**

- Toute bactérie peut devenir *fastidious*.
- Comprend le groupe HACEK mais aussi d'autres espèces.
- Origine : saprophytes des muqueuses humaines et/ou animales (morsure).
- Ne pas négliger la possibilité de *Brucella* ou de *Francisella*.
- Quelques espèces de l'environnement.
- Gram parfois variable.

## Taxonomie

Les espèces *Haemophilus aphrophilus* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ont été transférées en 2006 dans un nouveau genre, *Aggregatibacter*, inclus dans la famille des *Pasteurellaceae*. En même temps, l'espèce *Haemophilus paraphrophilus* est devenue un synonyme d'*A. aphrophilus*, avec antériorité pour cette dernière espèce qui comprend donc des souches dépendantes et des souches indépendantes en facteur V pour leur croissance, toutes les souches étant indépendantes en facteur X.

*Cardiobacterium hominis* est l'espèce type du genre *Cardiobacterium,* et constitue l'ancien groupe IId du Center for Diseases Control (CDC), proche de *Suttonella indologenes* (*Cardiobacteriaceae*). Une deuxième espèce, *C. valvarum*, a été décrite en 2004. Le genre *Eikenella* ne comprend qu'une seule espèce : *E. corrodens* (anciennement groupe HB-1 du CDC). *Kingella kingae* (ancien groupe M1 du CDC) est une des quatre espèces du genre *Kingella* qui appartient à la famille des *Neisseriaceae.*

## Culture

Les bactéries du groupe HACEK ont une croissance anaérobie facultative, mais sont plus exigeantes que les espèces des familles *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* et *Aeromonadaceae*. Leur croissance est très faible ou nulle sur milieu gélosé simple et la plupart d'entre elles ne poussent pas sur milieu sélectif pour bactéries à Gram négatif (fig. 34.13.1). Elles ont besoin de facteurs nutritifs qui peuvent être apportés par le sang, notamment le sang cuit contenu dans les géloses dites « chocolat », en plus de facteurs de croissance supplémentaires. Leur croissance est souvent améliorée ou même obligatoire (bactéries capnophiles, fig. 34.13.2) par l'addition de 5 à 10 % de $CO_2$ dans l'atmosphère ambiante d'incubation. Elles ne sont pas mobiles en raison de l'absence de flagelles. Leur isolement à partir de prélèvements cliniques prend souvent plus de 24 heures, ce qui justifie de laisser incuber les géloses « chocolat » au minimum 4 jours. Les flacons d'hémocultures sont classiquement incubés plus de 2 semaines en cas de suspicion d'endocardites à groupe HACEK, mais les automates récents détecteraient ces bactéries en moins de 5 jours.

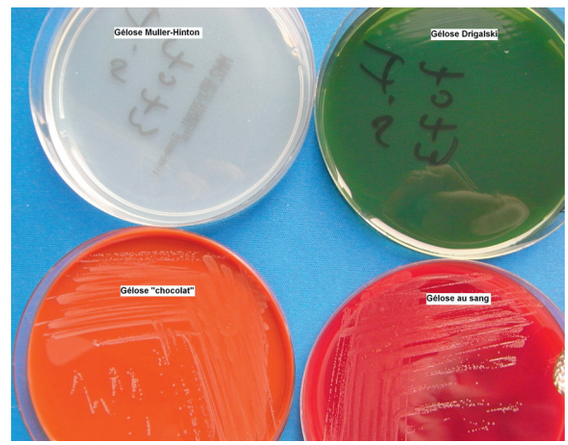



**Fig. 34.13.1.** – *Croissance d'*Haemophilus aphrophilus *sur différents milieux.*

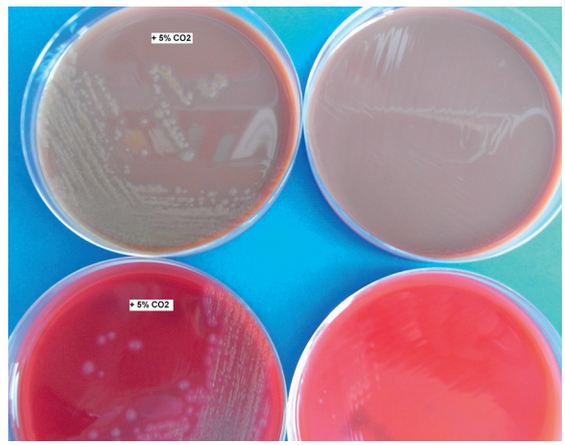



Fig. 34.13.2. – *Croissance capnophile de* Capnocytophaga gingivalis.

## Identification

Le principal problème soulevé par l'identification de ces bactéries tient à leur croissance faible qui se traduit par la nécessité de plusieurs boîtes d'isolement pour obtenir suffisamment de matériel et par la possibilité de donner des tests faussement négatifs s'ils sont lus après seulement 24 heures d'incubation. L'identification présomptive de ces bactéries est fondée sur l'aspect des colonies sur différents milieux et sous différentes atmosphères, la morphologie à la coloration de Gram et à quelques tests biochimiques simples : catalase, oxydase, et production d'indole (tableau 34.13.2).

**TABLEAU 34-13-2**

**Tests phénotypiques d'orientation du groupe HACEK.**

| |
|---|
| *Type respiratoire, incuber en différentes atmosphères à 37 °C* |
| – Atmosphère ambiante<br>– Atmosphère ambiante avec 10 % de $CO_2$ (bactéries capnophiles)<br>– Anaérobiose |
| *Tests biochimiques d'orientation* |
| – Oxydase : éviter la gélose « chocolat » (faux négatifs)<br>– Catalase : éviter de prendre de la gélose ou bien en milieu liquide |
| *Fermentation de sucre (lecture à 48 heures et jusqu'à 7 jours)* |
| – Utilisation des milieux liquides OF<br>– Incubation à 37 °C soit en atmosphère ambiante, soit sous $CO_2$ si nécessaire (les tubes doivent alors reposer 2 à 3 heures à température ambiante avant leur lecture) |
| *Décarboxylases (lecture après 48 heures, 4 jours et 7 jours)* |
| – Milieu de base de Moeller, avec un tube témoin<br>– Test limité aux bactéries utilisant le glucose (induction enzymatique à pH acide) |
| *Uréase (lecture à 48 heures, 4 jours et 7 jours)* |
| – Milieu de Christensen (pente) avec témoin négatif |

### *Identification différentielle*

Le tableau 34.13.3 montre les caractères phénotypiques permettant un diagnostic présomptif des espèces du groupe HACEK et des bactéries apparentées proches. Il

**TABLEAU 34-13-3**

**Principaux caractères différentiels du groupe HACEK et apparentés.**

| | *Catalase* | *Oxydase* | *Caractères culturaux* | *Morphologie* |
|---|---|---|---|---|
| *Aggregatibacter aphrophilus* | – | (–) | ± exigence en facteur V | Petits bacilles |
| *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* | + | (–) | Colonies adhérentes, aspect étoilé | Coccobacilles |
| *Cardiobacterium hominis* | – | + | Colonies grises, convexes, brillantes | Bacilles droits, Gram irrégulier |
| *Kingella* spp. | – | + | Légère β-hémolyse | Coccobacilles, courtes chaînettes, peu décolorables |
| *Eikenella corrodens* | – | + | Colonies creusant la gélose, odeur d'eau de Javel | Bacilles droits, assez fins |
| Groupe EF-4 (*Neisseria*) | + | + | Colonies jaunâtres à odeur de pop-corn | Coccobacilles |
| *Capnocytophaga* DF-1 | – | – | Colonies plates à bords frangés | Longs bacilles effilés |
| *Capnocytophaga* DF-2 | + | + | Colonies plates et irrégulières | Longs bacilles effilés |

est nécessaire de regarder attentivement ces cultures parfois sous une loupe binoculaire, et d'évaluer le caractère adhérent ou creusant la gélose (*pitting*). En cas de doute sur la nature du Gram, on peut devoir rechercher une alanine aminopeptidase (positive pour les Gram négatif). Certaines de ces bactéries présentent une relative sensibilité à la vancomycine (*Cardiobacterium hominis*, *Kingella kingae*) pouvant faire douter de la nature Gram négatif de ces bactéries.

La carte Vitek NH® (bioMérieux) permet une bonne identification des espèces du groupe HACEK. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique performante pour identifier ces bactéries, bien que les scores d'identification obtenus soient souvent inférieurs à ceux que l'on obtient habituellement pour les bactéries de bonne croissance.

Dans le cas d'infections sévères (endocardites notamment), l'identification par séquençage de gènes doit être entreprise en cas d'identifications phénotypiques non concluantes

## Antibiogramme

La réalisation de cet antibiogramme se heurte à des problèmes tenant à la croissance lente et à l'absence de standardisation de la technique à utiliser. Il n'existe pas de valeurs critiques spécifiques permettant l'interprétation des résultats obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé ou par la détermination des CMI en milieu liquide ou gélosé. En pratique, on utilise la technique par diffusion à partir de disque effectuée sur gélose au sang ou au sang cuit incubée à 37 °C en aérobiose.

Une recherche de production de pénicillinase par le test à la céfinase doit toujours accompagner l'antibiogramme de ces bactéries.

## Description des bactéries du groupe HACEK

L'orientation vers une de ces bactéries se fait à l'aide des caractères exposés dans les tableaux 34.13.1 et 34.13.3. L'identification de l'espèce peut être effectuée avec un petit nombre de caractères simples inclus dans le tableau 34.13.4.

### *Aggregatibacter* spp.

Ce genre bactérien de description récente comprend les espèces *A. actinomycetemcomitans* et *A. aphrophilus* (anciennement *Haemophilus aphrophilus*) qui constitue en partie le groupe HACEK, ainsi qu'*A. segnis*.

#### Habitat et pouvoir pathogène

*A. actinomycetemcomitans* est une bactérie strictement humaine retrouvée sur la muqueuse buccale. Elle est responsable d'endocardites, d'abcès cérébraux et de lésions périodontales. Elle peut être isolée en association avec une bactérie du genre *Actinomyces* dans le cas d'une actinomycose. *A. aphrophilus* est saprophyte de la cavité orale et des voies aériennes supérieures de l'homme, et peut aussi être responsable d'endocardites sur valves lésées ou prothétiques et d'abcès cérébraux. Cette espèce a aussi été isolée de prélèvements osseux, articulaires et de lésions oculaires (endophtalmie, canaliculite). Dans près de la moitié des cas, une intervention dentaire a précédé ces infections sévères. Cette espèce a également été isolée du chien. L'espèce *A. segnis* semble avoir le même habitat et la même pathogénicité que les autres espèces de ce genre.

#### Caractères bactériologiques

Ce sont des petits bacilles à Gram négatif, à croissance aéro-anaérobie facultative relativement lente. Il n'y a pas de réelle dépendance en facteur X, mais certaines souches demandent ce facteur de croissance à la primoculture. La dépendance en facteur V est variable (souches correspondant à l'ancienne espèce *H. paraphrophilus* et certaines souches d'*A. segnis*). Les colonies sont blanches ou grisâtres et non hémolytiques. *A. actinomycetemcomitans* présente des colonies légèrement adhérentes à la gélose en forme d'étoile à centre opaque, ces colonies pouvant être sous forme *rough*. L'oxydase est négative ou très faible. *A. actinomycetemcomitans* est différenciée d'*A. aphrophilus* par la présence d'une catalase et l'absence de β-galactosidase, et différenciée d'*A. segnis* par une fermentation du mannose (la catalase et la β-galactosidase étant variables pour cette espèce). *A. aphrophilus* présente une fermentation du lactose et du mannose, contrairement à *A. segnis*. *A. segnis* est difficilement différenciable de *Haemophilus parainfluenzae* biotype V (négatif pour les réactions de l'indole et de l'ornithine décarboxylase).

#### Sensibilité aux antibiotiques

On utilise la gélose au sang cuit. *A. actinomycetemcomitans* présente une sensibilité modérée vis-à-vis des β-lactamines (CMI : 0,25–4 mg/l pour l'amoxicilline) mais très bonne pour les céphalosporines de troisième génération (CMI : 0,03–0,06 mg/l pour le céfotaxime). L'activité des autres antibiotiques est variable, sauf pour les lincosamines constamment inefficaces. *A. aphrophilus* est habituellement bien sensible aux antibiotiques, les macrolides et les aminosides étant les moins efficaces. Ces espèces ne produiraient pas de pénicillinase.

### *Cardiobacterium hominis*

Le genre *Cardiobacterium* contient deux espèces : *C. hominis* et *C. valvarum.*

#### Habitat et pouvoir pathogène

L'habitat normal de *C. hominis* est le tractus respiratoire supérieur, mais cette espèce peut être retrouvée dans des échantillons génito-urinaires. Cette espèce est responsable d'endocardites dont le diagnostic est souvent évoqué plusieurs semaines à quelques mois après le début des symptômes. Les hémocultures deviennent positives assez

TABLEAU 34-13-4

**Identification des bactéries du groupe HACEK et apparentés.**

| Catalase | Oxydase | Production d'indole | Réduction des nitrates | Hydrolyse de l'esculine | Identification | Caractères différentiels |
|---|---|---|---|---|---|---|
| + | + | + | + | | *Pasteurella* spp. | |
| | | – | + | – | *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Actinobacillus ureae* | *A. ureae* : uréase + |
| | | | | | *Neisseria animaloris, Neisseria zoodegmatis* | Maltose –, uréase – |
| | | | | V | *Actinobacillus hominis* | Maltose +, uréase + |
| | | | – | V | *Capnocytophaga canimorsus, C. cynodegmi* | Aérobie-anaérobie facultatif |
| | | | | | *Neisseria weaveri, Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* | Aérobie strict |
| | – | + | – | + | *Dysgonomonas gadei* | |
| | | – | + | – | *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Actinobacilus ureae* | *A. ureae* : uréase + |
| – | + | + | + | – | *Pasteurella bettyae* | |
| | | | – | – | *Cardiobacterium hominis, Cardiobacterium valvarum* | *C. hominis* : saccharose + |
| | | – | + | – | *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* | Aérobie strict |
| | | | | | *Kingella denitrificans* | ODC –, maltose – |
| | | | | | *Aggregatibacter aphrophilus, A. paraphrophilus* | ODC –, maltose + |
| | | | | | *Eikenella corrodens* | ODC +, |
| | | | – | – | *Kingella kingae* | β-hémol. +, maltose + |
| | | | | – | *Cardiobacterium valvarum* | Maltose V |
| | | | | | *Neisseria elongata* subsp. *elongata* | Maltose – |
| | – | + | + | – | *Pasteurella bettyae* | |
| | | | – | V | *Dysgonomonas capnocytophagoides, D. hofstadii* | *D. hofstadii* : β-glucuronidase – |
| | | – | + | + | *Capnocytophaga haemolytica, Capnocytophaga sputigena* | |
| | | | | – | *Aggregatibacter aphrophilus* | |
| | | | – | V | *Capnocytophaga* spp. *(C.ochracea, C. gingivalis, C. granulosa)* | |
| | | | | – | *Dysgonomonas capnocytophagoides, Dysgonomonas mossii* | |

tardivement, le diagnostic pouvant être fait par amplification génique à partir des valves excisées. L'isolement de *C. hominis* d'autres sites infectieux est très rare. *C. valvarum* a été isolée de valve cardiaque dans quelques cas d'endocardites. Sa participation aux infections périodontales reste à être évaluée.

## Caractères bactériologiques

Ce sont des bactéries à Gram négatif mais dont les extrémités peuvent paraître à Gram positif. Il s'agit de bacilles droits, immobiles, se groupant en courtes chaînes ou en rosettes.

Leur croissance nécessite des milieux contenant du sang et celle-ci est favorisée par une atmosphère contenant 5 à 10 % de $CO_2$. Les colonies sont rondes, convexes, opaques et creusent légèrement la gélose. Il peut exister une légère hémolyse α. Les deux espèces sont oxydase positive et les tests catalase, uréase et nitrate-réductase sont négatifs. La différenciation entre les deux espèces semble difficile, *C. hominis* fermentant le mannitol alors que cette propriété est rare pour *C. valvarum*.

### Sensibilité aux antibiotiques

Les deux espèces sont sensibles à la plupart des antibiotiques, sauf les lincosamines et les glycopeptides, bien que des souches puissent présenter des CMI inférieures à 4 mg/l. Une production de pénicillinase est possible. Une résistance aux aminosides et au cotrimoxazole a été décelée chez quelques souches.

## *Eikenella corrodens*

### Habitat et pouvoir pathogène

*E. corrodens* est une espèce saprophyte de la cavité orale de l'homme et de certains animaux (singe, chat et chien). On peut aussi retrouver cette espèce dans la flore digestive et génitale. La majorité des infections sont localisées au niveau de la tête et du cou (abcès cérébraux, abcès thyroïdiens, sinusites, ethmoïdite, infections oculaires), mais on peut aussi l'isoler de prélèvements respiratoires, d'abcès digestifs ou rénaux. Dans la majorité des cas, on l'isole en association avec d'autres bactéries, en particulier des anaérobies et des streptocoques. Une altération de la muqueuse buccale suite à une chimiothérapie explique souvent le passage de cette espèce de l'état saprophyte à l'état pathogène. *E. corrodens* fait partie des causes peu fréquentes d'endocardites, parfois avec hémocultures négatives. Il faut aussi noter sa présence dans environ 8 % des cas de surinfections de plaies après morsure humaine contre 0,5 % pour les morsures de chat ou de chien. Cette espèce jouerait un rôle dans certaines périodontites de l'enfant et de l'adulte jeune, toujours en association avec d'autres bactéries.

### Caractères bactériologiques

Ce sont des bacilles à Gram négatif, fins, droits, immobiles.

La croissance aérobie-anaérobie facultative est assez lente (2 à 3 jours), sur des milieux contenant du sang. Il n'y a pas de culture sur milieu non enrichi ou MacConkey.

Les colonies sont grisâtres, difficiles à prélever, avec un centre plus clair entouré d'une zone perlée. Elles sont non hémolytiques mais on relève la présence d'un halo de verdissement sur gélose au sang. Après 4 à 5 jours de culture, on observe un creusement de la gélose et une coloration jaunâtre (fig. 34.13.3). La culture a une odeur d'eau de Javel.

Ces bacilles sont oxydase +, catalase –, nitrate réductase +, ODC et LDC +, urée et indole. Il n'y a pas d'utilisation de glucose, ce qui en fait un caractère différentiel avec les autres bactéries du groupe HACEK.

### Sensibilité aux antibiotiques

*E. corrodens* est modérément sensible aux pénicillines (CMI 50 pénicilline = 2 mg/l et CMI 50 amoxicilline = 0,50 mg/l), mais bien sensible aux céphalosporines de troisième génération (CMI 50 céfotaxime = 0,125 mg/l). La présence de β-lactamase doit être recherchée.

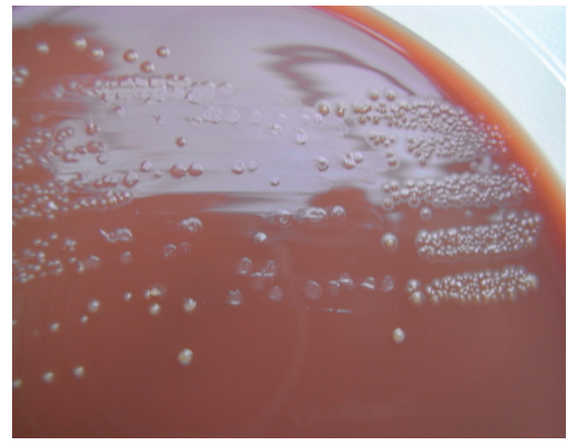


**Fig. 34.13.3.** – *Colonies incrustées d'*Eikenella corrodens.

*E. corrodens* est résistant à la clindamycine et au métronidazole, et de sensibilité variable aux macrolides et aux aminosides.

## Kingella *spp.*

### Habitat et pouvoir pathogène

Ce genre contient quatre espèces (*K. denitrificans*, *K. kingae*, *K. oralis* et *K. potus*). Ces espèces peuvent être isolées à partir d'échantillons humains. *K. kingae*, *K. oralis* et *K. denitrificans* sont des saprophytes de la sphère ORL, alors que *K. potus* a été isolée d'une plaie infectée suite à une morsure animale. *K. kingae* semble fréquente chez l'enfant (75 % des enfants de plus de 6 mois sont porteurs de cette bactérie au niveau pharyngé), en étant responsable d'infections ostéoarticulaires (ostéomyélites, arthrites septiques touchant une seule articulation, spondylodiscites), suite souvent à une infection ORL d'origine virale. Ces infections sont caractérisées par un syndrome inflammatoire modéré. De rares cas de méningites et d'infections oculaires ont été décrits chez l'enfant. Chez l'adulte, *K. kingae* est surtout responsable d'endocardites, mais aussi d'infections ostéoarticulaires et oculaires. *K. denitrificans* a aussi été isolée de patients souffrant d'endocardite, alors que *K. oralis* n'a été isolée que de prélèvements buccaux.

### Caractères bactériologiques

Ce sont des bacilles Gram négatif mais difficilement décolorables, assez courts, pouvant se mettre en courte chaînette (fig. 34.13.4). Ces espèces possèdent une oxydase mais pas de catalase et la réaction de l'indole est négative. *K. kingae* présente une β-hémolyse étroite sur gélose au sang. *K. denitrificans* possède une nitrate-réductase, mais pas de phosphatase alcaline, au contraire de *K. kingae* et de *K. oralis*. L'espèce *K. potus* ne possède pas les activités phosphatase alcaline et nitrate-réductase.

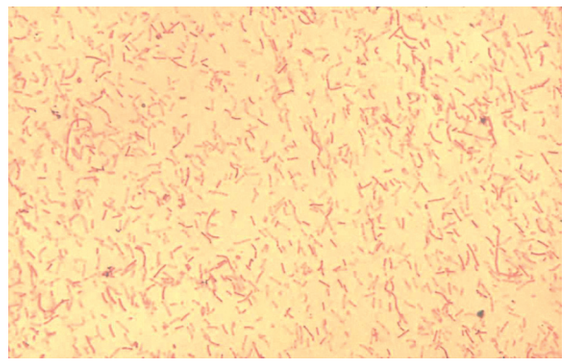


Fig. 34.13.4. – *Coloration de Gram de* Kingella kingae.

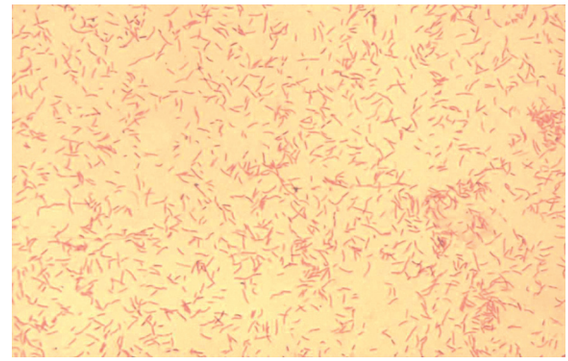


Fig. 34.13.5. – *Coloration de Gram de* Capnocytophaga canimorsus.

### Sensibilités aux antibiotiques

L'antibiogramme se fait sur gélose Mueller-Hinton enrichie en sang ou gélose au sang cuit. *K. kingae* est habituellement bien sensible aux antibiotiques à l'exception des lincosamines et des glycopeptides. Il y a la possibilité de production d'une pénicillinase, et de résistances touchant le cotrimoxazole, la ciprofloxacine ou l'érythromycine. L'unique souche de *Kingella potus* est sensible aux β-lactamines et à la ciprofloxacine, mais résistante à l'érythromycine, à la clindamycine et à la gentamicine.

- *Kingella kingae* est la première cause d'infections ostéoarticulaires chez le jeune enfant.
- *K. kingae* cultive mieux en flacons d'hémocultures.
- Une PCR universelle ou, mieux, spécifique permet de détecter plus de la moitié des infections à K. kingae à culture négative.
- *K. kingae* est β-hémolytique.

## Bactéries apparentées

### Capnocytophaga *spp.*

Ce genre contient plusieurs espèces qui peuvent être séparées en deux groupes. Les espèces *C. ochracea* (ancien groupe DF-1), *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. haemolytica, C. leadbetteri* et *C. granulosa* sont oxydase et catalase négatives et sont des saprophytes de la cavité buccale de l'homme. Les espèces *C. canimorsus* (ancien groupe DF-2) et *C. cynodegmi* sont oxydase et catalase positives et sont des saprophytes de la gueule du chien et du chat. Les bactéries saprophytes de l'homme sont principalement isolées d'infections ORL et peuvent être responsables d'endocardites chez les patients immunodéprimés présentant souvent une ulcération buccale. Les bactéries provenant des animaux, notamment *C. canimorsus*, sont isolées de plaies infectées après morsures ou griffures, pouvant se compliquer, surtout chez le patient immunodéprimé,

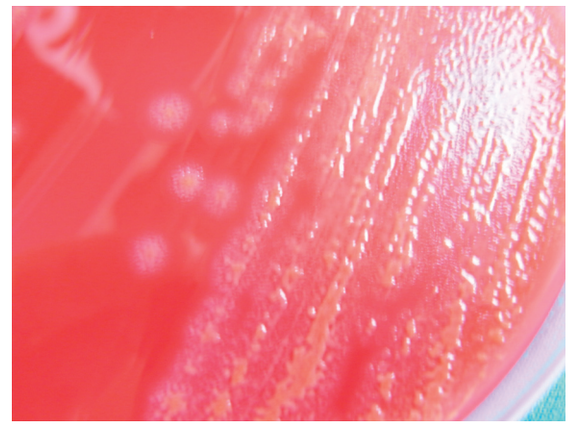


Fig. 34.13.6. – *Colonies de* Capnocytophaga gingivalis.

d'une dermohypodermite avec septicémie et localisations secondaires principalement méningées. Il s'agit de bacilles à Gram négatif longs et fins (fig. 34.13.5). Les colonies sur milieux enrichis au sang sont souvent étalées, à bords irréguliers, dentelées ou perlées, surtout pour les espèces d'origine humaine (fig. 34.13.6). Ces bacilles sont habituellement sensibles aux antibiotiques, sauf aux aminosides, mais la présence d'une pénicillinase est possible.

### Neisseria *spp. atypiques*

Les espèces *N. animaloris* (ancien groupe EF-4a), *N. weaveri* (ancien groupe M-5) et *N. zoodegmatis* (ancien groupe EF-4b) se présentent comme des coccobacilles ou bacilles à Gram négatif qui semblent appartenir à la flore normale de la gueule de certains animaux. On les retrouve donc à partir de plaies infectées après morsures animales. Les espèces *N. elongata* et *N. bacilliformis* montrent aussi des formes bacillaires, mais sont isolées habituellement de l'homme. L'oxydase est positive. La catalase est positive pour *N. animaloris*, *N. weaveri* et *N. zoodegmatis*, mais variable pour *N. elongata* et *N. bacilliformis*. Ils sont sensibles à la plupart des antibiotiques, sauf aux aminosides pour certaines souches, et aux lincosamines.

### Dysgonomonas *spp.*

Ce genre contient trois espèces : *D. capnocytophagoides* (ancien groupe DF-3), *D. gadei* et *D. mossii*. Ces espèces sont humaines et ont été isolées de selles (*D. capnocytophagoides*), d'un calcul urinaire (*D. gadei*) et de divers prélèvements humains pour *D. mossii*. Ce sont des bacilles courts à Gram négatif qui forment des colonies convexes, gris pâle, non hémolytiques, à odeur fruitée. Ces espèces sont oxydase négative. *D. gadei* est catalase positive à l'inverse des deux autres espèces. *D. mossii* peut être différenciée de *D. capnocytophagoides* par la production de β-N-acétyl-glucosaminidase. Ces bactéries sont peu sensibles aux aminosides, macrolides et β-lactamines, sauf aux associations avec un inhibiteur de β-lactamase et à l'imipénème, mais sensibles aux tétracyclines, à la rifampicine et au cotrimoxazole.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Riegel P, Archambaud M, Clavé D, Vergnaud M. Bactéries de culture et d'identification difficiles. Ed BioMérieux; 2006.

Vergnaud M. Bacilles à Gram négatif inhabituels. In : Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2007. p. 1445–57.

Vergnaud M. HACEK et dysgonic fermenters. In : Antibiogramme. Paris : ESKA; 2006. p. 511–9.

Von Graevenitz A, Zbinden R, Mutters R. *Actinobacillus, Capnocytophaga, Eikenella, Kingella, Pasteurella*, and other fastidious or rarely encountered Gram-negative rods. In : Murray P, et al., editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed Washington : ASM Press; 2007. p. 621–35.


## Chapitre 34.14

# *Afipia, Bartonella* : agents de la maladie des griffes du chat

F. Denis, C. Martin

### Généralités

Ces bactéries sont classées parmi les protéobactéries du groupe α2 sur la base de la séquence de l'ARN 16S ribosomal. Dans ce groupe, on trouve parmi les bactéries pathogènes pour l'homme les genres *Afipia*, *Brucella* et *Bartonella*.

Ce sont de petits bacilles à Gram négatif difficiles à mettre en évidence au Gram, auquel on préfère la coloration de Gimenez.

### Habitat, maladie

Après contact et le plus souvent après morsure ou griffure de chat, on peut observer la « maladie des griffes du chat ». Il s'agit d'une infection bénigne caractérisée par une pustule ou une papule au site d'inoculation, survenant 4 à 6 jours après griffure ou morsure, rapidement suivie d'une adénopathie associée ou non à d'autres manifestations telles que fièvre, fatigue, malaise, splénomégalie. La lésion ganglionnaire est très rarement suppurative et les complications sont rares.

Les agents étiologiques et leur classification ont donné lieu à des polémiques. On reconnaît à ce jour deux agents étiologiques :

- *Afipia felis* a été isolé à plusieurs reprises à partir de ganglions de patients présentant une maladie des griffes du chat, mais les sérologies sont rarement positives. D'autres espèces d'*Afipia* ont été décrites, leur réservoir hydrique probable les fait suspecter dans des infections respiratoires, notamment nosocomiales ;
- *Bartonella henselae* (ex. *Rochalimaea henselae*) serait l'agent étiologique le plus fréquent de la maladie des griffes du chat avec *B. clarridgeiae*. Cette espèce est par ailleurs impliquée dans l'angiomatose bacillaire (forme généralisée et survenant chez des patients immunodéprimés). *B. henselae* pourrait aussi être retrouvée dans la péliose hépatique, des septicémies, des endocardites voire dans des atteintes neurologiques.

## Diagnostic direct

### Prélèvement

Il s'agit le plus souvent de prélèvements (biopsies de ganglions, foie, peau, moelle osseuse) de patients présentant une maladie des griffes du chat, voire par hémoculture. Le sang peut être prélevé par le système Isolator® de centrifugation-lyse avant de procéder à la mise en culture du culot.

### Culture

*A. felis* cultive habituellement sur gélose BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) ou gélose au sang frais en atmosphère ordinaire placé à 25 à 30 °C. Après une incubation de 10 à 15 jours en primoculture (3 jours en sous-culture), on note l'apparition de petites colonies (0,5 à 1,5 µm) grisâtres, opaques et convexes.

L'inoculation de lignées cellulaires, cellules Hela ou cellules endothéliales humaines (HMEC-1), permet également l'isolement.

À partir des colonies, on peut visualiser sur frottis *A. felis* grâce à la coloration de Gimenez révélant des bacilles de petite taille (0,2 à 0,5 µm × 0,2 à 0,5 µm) ou par immunofluorescence directe.

La bactérie est mobile par ciliature polaire, oxydase positive, catalase négative, uréase positive, réduisant les nitrates en nitrites mais n'attaquant pas le glucose, le lactose, le maltose, le sucrose, l'esculine, et elle ne produit pas d'indole. À côté d'*A. felis*, ont été décrites différentes espèces (*A. clevelaudensis*, *A. massiliensis*, etc.) et différents *genospecies*.

*B. henselae* est un bacille à Gram négatif de 0,5 à 0,6 µm × 1,0 à 2,0 µm légèrement incurvé et immobile. Cette espèce aérobie a également une croissance longue et difficile ; elle nécessite de l'hémine et une atmosphère enrichie en $CO_2$. La température optimale de croissance est 37 °C.

La culture se fait sur gélose au sang cuit cœur-cervelle supplémentée de 5 % de sang.

La culture nécessite plus de 15 jours d'incubation, voire jusqu'à 4 semaines. Les délais de culture se raccourcissent lors des repiquages (3 à 5 jours).

Les colonies sont petites (< 1 mm) blanches et sèches.

*B. henselae* apparaît oxydase, catalase, uréase et indole négatives, et présente une faible activité métabolique.

### Sensibilité aux antibiotiques

*A. felis* est une espèce très résistante aux antibiotiques. Seuls l'imipénem et les aminosides sont actifs in vitro. De plus, les membres de cette famille seraient bactéricides en intracellulaire. En revanche, *B. henselae* est très sensible aux antibiotiques : β-lactamines, aminosides, rifampicine, cyclines.

### Diagnostic moléculaire d'*A. felis* et de *B. henselae*

La recherche d'ADN et d'ARN 16S dans des échantillons ganglionnaires a été un échec pour *A. felis,* alors que l'ADN *Bartonella* spp. (gène de la citrate synthétase ou sous-unité 16S de l'ARN ribosomal) a été retrouvé respectivement dans 96 et 60 % des cas certains et des cas probables de maladie des griffes du chat.

## Diagnostic indirect : sérodiagnostic

Des techniques d'immunofluorescence indirecte ont montré une fréquente positivité des sérums des patients présentant une maladie des griffes du chat pour *B. henselae* (88 %) et des résultats rarement positifs pour *A. felis* (5 %). Des taux d'IgG ≥ 1 : 100 en IFI sont significatifs pour la maladie des griffes du chat et ≥ 1 : 800 pour une endocardite. Des techniques ELISA sont en cours d'évaluation ; la sensibilité de l'ELISA serait légèrement supérieure à l'IFI.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997 ; 10 : 203–19.

Bergmans AMC, Groothedde JW, Schellekens JFP, et al. Etiology of cat scratch disease : comparison of polymerase chain reaction detection of *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) and Afipia felis DNA with serology and skin tests. J Infect Dis 1995 ; 171 : 916–23.

Brenner DJ, et al. Proposal of Afipia gen. nov., with *Afipia felis* spp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* spp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomae* sp. nov. and three unnamed genospecies. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 2450–60.

Chomel BE, Rolain JM. *Bartonella*. In : Murray PR, Baron EJO, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed Washington : ASM Press ; 2007. p. 851–61.

Maurin M. *Afipia*. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007. p. 1545–50.

Regnery RL, Olson BA, Perkins BA, Bibb W. Serological response to *Rochalimaea henselae* antigen in suspected cat-scratch disease. Lancet 1992 ; 339 : 1443–5.

Rolain JM, Raoult D. *Bartonella*. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007. p. 1535–44.

Stewart BA. Human infection with *Bartonella species*. Clin Microbiol Infect 1997 ; 3 : 677–89.

Chapitre 34.15

# *Brucella*

J.-P. Lavigne, D. O'Callaghan

## Généralités

*Brucella* spp. sont des bactéries intracellulaires facultatives, agents d'avortements épizootiques chez plusieurs animaux, notamment d'élevage, et des maladies fébriles bactériémiques (fièvre de Malte) ou d'infections focalisées chez l'homme. Ce sont des coccobacilles à Gram négatif, aérobies strictes, catalase positive, oxydase habituellement positive. La plupart des souches isolées en pathologie humaine produisent une uréase d'action rapide et intense.

## Habitat et pouvoir pathogène

Le genre *Brucella* a été divisé en six espèces selon des caractères phénotypiques (tableau 34.15.1).

La brucellose est avant tout une maladie animale (zoonose) et les animaux domestiques (bovins, ovins, caprins, porcins) constituent le réservoir de l'infection pour l'homme, hôte accidentel (anthropozoonose). En France, l'incidence de cette maladie a considérablement diminué ces dernières années (< 0,1/100 000 habitants, < 50 cas déclarés par an). Les cas de contamination autochtone surviennent habituellement dans les régions montagneuses (Alpes, Pyrénées ou Corse).

L'homme peut se contaminer soit directement par voie cutanéomuqueuse au contact d'animaux infectés (maladie professionnelle : vétérinaire, agriculteur, éleveur, ouvrier d'abattoir), soit indirectement par voie digestive (lait, fromage), ou par inhalation de poussière ou d'aérosol de litière. *Les contaminations de laboratoire représentent une des sources majeures d'infection.*

Après une période d'incubation variable (1 à 4 semaines), la brucellose se caractérise dans sa phase aiguë par une bactériémie d'origine lymphatique. Cette phase se manifeste classiquement par une fièvre ondulante sudoroalgique (fièvre de Malte) correspondant aux passages bactériémiques. La maladie évolue ensuite vers une phase subaiguë, avec localisations secondaires (neuroméningées, cardiaques, ostéoarticulaires, hépatospléniques, ou génitales). Les formes chroniques se définissent par une évolution prolongée au-delà d'un an, avec ou sans

**TABLEAU 34-15-1**

**Classification dans le genre *Brucella*. Chaque espèce est pathogène pour un hôte préférentiel. Parmi les différentes espèces de *Brucella* pathogènes pour l'homme de *B. suis* bv 2 et 5* constituent une exception.**

| | *Espèces* | *Biovars* | *Répartition géographique* | *Hôtes préférentiels* |
|---|---|---|---|---|
| Pathogènes pour l'homme | *B. melitensis* | 1–3 | Bassin méditerranéen, Moyen-Orient | Caprins, ovins |
| | *B. abortus* | 1–6, 9 | Ubiquitaire | Bovins |
| | *B. suis* | 1, 3 | Amérique, Asie, Océanie | Porcins |
| | | 2* | Europe centrale et occidentale | Porcins, léporidés |
| | | 4 | Amérique du Nord, Russie | Rennes |
| | | 5* | Russie | Rongeurs sauvages |
| Pathogènes pour les animaux | *B. canis* | | Ubiquitaire | Chiens |
| | *B. ovis* | | Bassin méditerranéen | Ovins |
| | *B. neotomae* | | États-Unis (Utah) | Rat du désert |
| Nouvelles espèces* | *B. ceti*<br>*B. pinnipedialis*<br>*B. microti*<br>*B. inopinata* | | Inconnue<br><br>Europe<br>États-Unis | Cétacés, pinnipèdes, dauphins<br><br>Campagnols, renards, cas d'abcès sur des implants mammaires chez des femmes |

Les noms exacts des espèces dans le genre *Brucella* avec les détails sur les différentes souches bactériennes peuvent être consultés sur le site internet du comité ICSP sur la taxonomie des *Brucella* (http : //www.the-icsp.org/taxa/Brucellalist.htm).
* De nouvelles espèces sont en cours d'étude.

découverte d'un foyer infectieux focalisé (patraquerie brucellienne).

*Brucella* est un pathogène de classe III, considéré comme un agent potentiel du *bioterrorisme*.

## Diagnostic bactériologique direct

### *Prélèvements*

Le diagnostic de certitude de la brucellose demeure fondé sur l'isolement en culture des *Brucella*. Pour cela, la réalisation d'hémocultures aérobies lors des accès fébriles de la phase aiguë est la méthode de référence. Lors de la phase subaiguë, la myéloculture, les ponctions de liquide céphalorachidien, de ganglion ou de liquide articulaire peuvent aider au diagnostic. Les prélèvements doivent être réalisés avant tout traitement antibiotique. La culture du foyer infectieux, de sensibilité faible, peut s'avérer intéressante lors de cette phase. L'isolement de *Brucella* nécessite classiquement plusieurs jours d'incubation des cultures. Cet isolement est le plus souvent réalisé en moins de 5 jours dans les systèmes automatisés d'hémoculture. Il n'est donc pas nécessaire de prolonger l'incubation des hémocultures au-delà de 14 jours. La sensibilité des hémocultures est supérieure à 80 % en phase aiguë de la maladie, mais inférieure à 50 % en phase subaiguë ou chronique, ou si une antibiothérapie a été administrée avant prélèvement.

Le transport des prélèvements vers le laboratoire doit être rapide.

Lorsque les cultures sont négatives ou non réalisées, un prélèvement sanguin permet d'effectuer les sérologies. Ces sérologies représentent la majorité des diagnostics en France.

Toute suspicion de brucellose doit être signalée au laboratoire réalisant la mise en culture des prélèvements biologiques car le risque de contamination du personnel technique est élevé. Les manipulations des prélèvements et des cultures bactériennes doivent être impérativement réalisées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) ou, mieux, dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (NSB3).

### *Examen direct*

La coloration de Gram (nécessitant de doubler ou tripler le temps de recoloration à la fuschine) objective des coccobacilles à Gram négatif, de petite taille (0,5 à 1,5 µm de long ; 0,5 à 0,7 µm de diamètre), immobiles, isolés ou en paire, non capsulés, non sporulés (fig. 34.15.1). À l'état frais, *Brucella* est animée de forts mouvements browniens pouvant conduire à détecter une fausse mobilité.

### *Milieux de culture*

*Brucella* spp. poussent difficilement et lentement sur les milieux de culture, nécessitant des temps d'incubation prolongés (3 jours à 3 semaines). La croissance de ces bactéries nécessite l'utilisation de milieux gélosés à base de peptone enrichis au sang (5 % de sang de mouton). Certaines souches (*B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae*) se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10 % de $CO_2$. La température de croissance optimale est 34 °C avec un pH à 6,8.

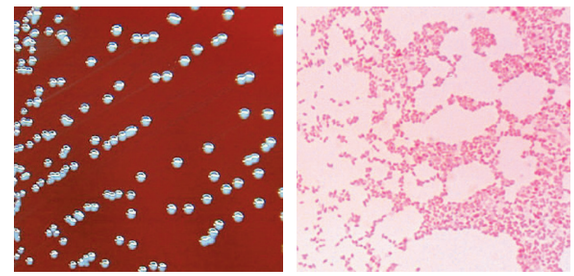


**Fig. 34.15.1.** – *À gauche, examen direct d'une culture de* Brucella melitensis. *À droite, aspect en culture des colonies de* Brucella *spp.*

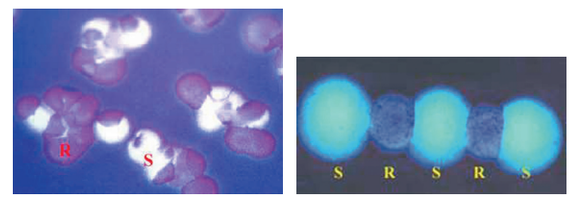



**Fig. 34.15.2.** – *À gauche, observation des colonies par transillumination oblique. À droite, coloration sur la gélose après culture selon le procédé de White et Wilson. S :* smooth *(lisse); R :* rough *(rugueux).*
*Source : www.microbes-edu.org*

La thiamine, la niacine et la biotine sont des vitamines indispensables. Les colonies sont très fines, de 0,5 mm de diamètre, transparentes, légèrement bleutées, bombées à bord régulier et non hémolytiques (fig. 34.15.1). L'exigence en $CO_2$ doit être déterminée sur la primoculture ou au plus tard sur le premier repiquage.

L'aspect des colonies (lisse ou rugueux) peut être évalué par différentes techniques (fig. 34.15.2).

## Diagnostic d'espèce

### *Caractères biochimiques* (tableaux 34.15.2 et 34.15.3)

Si le diagnostic de genre pour les *Brucella* est relativement aisé, le diagnostic d'espèce relève le plus souvent d'un laboratoire de référence.

*Brucella* spp. sont aérobies strictes et ont une catalase positive (*à ne réaliser que sous un PSM*) et une oxydase positive (sauf *B. ovis* et *B. neotomae*) (tableau 34.15.2). Ces bactéries ne fermentent pas les sucres. La majorité des autres caractères métaboliques sont négatifs : production d'indole, réaction de Vosges-Proskauer, citrate de Simmons, etc. En revanche, *Brucella* spp. ont une nitrate réductase positive, sauf *B. ovis*.

**TABLEAU 34-15-2**

**Différenciation des espèces de *Brucella*.**

| Caractères / Espèces | *B. melitensis* | *B. suis* | *B. abortus* | *B. canis* | *B. neotomae* | *B. ovis* | *B. pinnipediae (provisoire)* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Oxydase | + | + | + | + | – | – | |
| Exigence en $CO_2$ | – | – | +[b] | – | – | + | – B.p/+ B.c |
| Production d'$H_2S$ | – | +++ (1–6 j) | +[c] (2–5 j) | – | + | – | – |
| Hydrolyse de l'urée | > 90 min | < 90 min | > 90 min | < 90 min | > 90 min | – | + |
| Sérum monospécifique | | | | | | | |
| – A | + (sauf M1) | + | ± | – | + | – | |
| – M | + | – | ± | – | – | – | |
| Sérum monospécifique R (souche *rough*) | – | – | – | + | – | + | – |
| Sensibilité à des colorants bactériostatiques : | | | | | | | |
| – Fuschine basique | R | S[a] | R[d] | S/R | S | S | R |
| – Thionine | R | R | S | R | S | R | R |
| – Safranine | S | R | S | S | S | S | S |
| Amplification génique PCR | | | | | | | |
| – *Omp31* et *Omp25* | + | + | + | + | + | + | |
| – PCR IS711 | + | + | + | + | + | + | |
| Lysotypie : bactériophages | | | | | | | |
| – Tb | – | – | + | – | ± | – | – |
| – Wb | – | + | + | – | + | – | + B.p/–B.c |

Encadré noir : tests accessibles à tout laboratoire.
[a] sauf bv 3, [b] sauf bv 5,6,9, [c] sauf bv 5, [d] sauf bv 2.

Du fait d'une faible réactivité biochimique, l'identification de ces bactéries par les méthodes phénotypiques usuelles est difficile. L'utilisation de galeries d'identification de type API-NE® (bioMérieux) peut conduire à une fausse identification de *Moraxella phenylpyruvica*. De plus, elle expose le technicien à des aérosols.

Enfin, l'agglutination avec les sérums polyvalents et monospécifiques (BD Diagnostics®) permet d'orienter le diagnostic (fig. 34.15.3). Cette méthode est réalisée à partir d'une suspension dense dans du sérum physiologique chauffé 1 heure à 65 °C sous un PSM dans un laboratoire L3. Le sérum anti-*Brucella smooth* agglutine toutes les souches sauf *B. ovis* et *B. canis* (bactéries *rough*). L'agglutination doit apparaître en une minute. Un témoin négatif sera fait en parallèle avec un sérum normal.

## Classification des espèces

L'identification d'espèce, réservée en pratique aux laboratoires spécialisés, repose sur (tableau 34.15.2) :

- la lysotypie en évaluant la sensibilité à différents bactériophages (Tb, Wb, Bk, etc.) ;
- la production d'$H_2S$ qui doit se faire par la technique du papier à l'acétate de plomb coincé dans un tube de culture ensemencé. Cette production est variable selon les espèces ;
- l'hydrolyse de l'urée grâce à l'activité plus ou moins intense d'une uréase présente chez toutes les *Brucella* à l'exception de *B. ovis* ;
- l'étude de l'oxydation des glucides et des acides aminés notamment par le système en microplaques 96 puits contenant 95 substrats carbonés de 6 à 8 classes différentes (système Biolog™ [AES Chemunex®]), et l'étude de l'action bactériostatique de la fuchsine basique et de la thionine.

## Diagnostic génomique

Récemment, des techniques d'amplification génique ont été développées dans les laboratoires spécialisés.

TABLEAU 34-15-3

**Différenciation entre *Brucella* spp. et les autres coccobacilles à Gram négatif exigeants.**

| *Test* | *Brucella spp.* | *Bordetella bronchisep-tica* | *Acineto-bacter spp.* | *Haemophilus influenzae* | *Paste-urella spp.* | *Yersinia pestis* | *Eikenella corrodens* | *Moraxella phenylpyru-vica* | *Cardiobac-terium hominis* | *Oligella ureolytica* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Agglutination avec un antisérum de *Brucella* | +[a] | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Oxydase | + | + | – | + | + | – | + | + | + | + |
| Catalase | + | + | + | + | + | + | – | d | – | + |
| Mobilité | – | + | – | – | – | – | – | – | – | ± |
| Uréase | + | + | ± | ± | – | – | – | + | – | + |
| Réduction du nitrate | + | + | – | NA[b] | + | + | + | + | – | + |
| Croissance sur gélose au sang | + | + | + | – | + | + lente | Corrosion | + | + | + |
| Croissance en anaérobiose | Non | Oui | Non | Oui | Oui | Oui | Oui | Non | Oui | Oui |
| Morphologie au Gram | Coccobacille à Gram négatif, très court, rose pâle | Petit bacille ou coccobacille à Gram négatif, brillant | Bacille ou coccobacille à Gram négatif large et brillant, groupés par 2 ou en chaînette | Coccobacille à Gram négatif de petite taille | Bacille ou cocco-bacille à Gram négatif, groupés par 2, coloration bipolaire | Coccobacille à Gram négatif polymorphe, parfois à coloration bipolaire, aspect d'épingle de sûreté | Coccobacille à Gram négatif, droit, fin | Coccobacille à Gram négatif, très court, brillant | Coccobacille à Gram négatif à extrémités bulleuses (retenant le violet de gentiane), groupé le plus souvent en rosette | Coccobacille à Gram négatif, très court, se décolorant parfois mal, droits, aux extrémités arrondies |

d : variable.
[a] *B. canis* a une oxydase variable et n'agglutine pas avec les antisérums de *Brucella.*
[b] NA : non applicable.

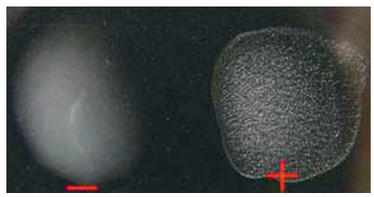


**Fig. 34.15.3.** – *Agglutination rapide sur lame avec un immunsérum monospécifique anti-*Brucella melitensis *et/ou anti-*B. abortus.
*Source : www.microbes-edu.org*

La PCR et la PCR en temps réel sont apparues comme des techniques sensibles et spécifiques, particulièrement utiles dans le cas où l'administration d'une antibiothérapie empirique empêche l'isolement de *Brucella*. L'amplification peut s'effectuer à partir du sang ou du sérum, mais aussi dans diverses suppurations ou biopsies tissulaires. À partir du prélèvement, la sensibilité de la PCR est variable selon les études (50 à 100 %) et la spécificité est comprise entre 60 et 98 %. Ces variations sont classiquement dues aux différentes méthodes d'extraction, des méthodes de détection et du type de prélèvements. Une amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S suivie d'un séquençage permet l'identification d'une bactérie du genre *Brucella*. Il en de même après amplification des gènes *omp31* ou *omp25* codant pour des protéines de membrane externe de 31 et 25 kDa, ou de la séquence d'insertion IS*711* dont plusieurs copies sont présentes dans le génome de *Brucella*. La présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les échantillons cliniques peut conduire à de faux négatifs, alors que les contaminations de laboratoire ou plus rarement des réactions d'amplification croisée peuvent induire des faux positifs. Le genre *Brucella* étant monospécifique (comprenant une seule espèce *B. melitensis*), la PCR ne permet pas de déterminer l'espèce en cause. La différenciation des espèces impliquées, voire de certains biovars, peut être obtenue par analyse de profil de restriction en champ pulsé du génome bactérien, par amplification de certains gènes suivie d'une restriction enzymatique, par PCR multiplex, par la technique d'amplification–hybridation (AMOS PCR) ou par MLST. Cette dernière technique permet de discriminer au mieux l'espèce et la sous-espèce.

Des identifications de *Brucella* par PCR directement à partir d'hémocultures ont été développées, mais leur spécificité reste controversée du fait de la détection d'ADN après traitement.

### *Diagnostic protéique*

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) est une technologie d'avenir en microbiologie du fait de sa rapidité, de sa précision et de son faible coût.

Son utilisation dans les diagnostics de brucellose vient d'être récemment décrite.

## Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Actuellement, la détermination de la sensibilité de *Brucella* spp. aux antibiotiques n'est pas indispensable. Les souches sont très majoritairement sensibles aux antibiotiques couramment prescrits contre cette infection (tableau 34.15.4) et il y a un fort risque de contamination du personnel de laboratoire. Seule la souche vaccinale RB51 est résistante à la rifampicine, mais elle n'est pas présente en Europe. Si un antibiogramme est tout de même réalisé, cela nécessite l'utilisation de techniques adaptées aux exigences de croissance de ces bactéries (utiliser des géloses de type Muller-Hinton ou au sang cuit). Il est réalisé en laboratoire équipé de niveau 3 de sécurité biologique.

### *Sérodiagnostic* (tableau 34.15.5 et fig. 34.15.4)

La sérologie n'est utile que lorsque la culture bactérienne est négative ou non réalisée. Elle nécessite l'utilisation de plusieurs techniques, et pose le problème essentiel de son manque de spécificité lié à la fréquence des faux positifs par réactions sérologiques croisées. De nombreuses trousses diagnostiques sont commercialisées. La détection des anticorps spécifiques se fait en moyenne 2 à 3 semaines après l'infection par *Brucella*. La plupart de ces tests utilisent comme antigènes des suspensions inactivées de *B. abortus*, et détectent principalement les

**TABLEAU 34-15-4**

**Antibiotiques actifs in vitro et efficacité in vivo sur *Brucella* spp.**

| *Familles d'antibiotiques actives in vitro* | *Efficacité in vivo* | *Molécules à utiliser* |
|---|---|---|
| β-lactamines | + | Pénicillines A, céphalosporines de 3e génération (céfotaxime et ceftriaxone), imipénem |
| Macrolides | + | Azithromycine, érythromycine |
| Chloramphénicol | + | Chloramphénicol |
| Sulfamides | V[a] | Cotrimoxazole |
| Aminosides | +++ | **Gentamicine**, nétromycine, tobramycine, **streptomycine** |
| Tétracyclines | ++++ | **Doxycycline** |
| Rifampicine | +++ | **Rifampicine** |
| Fluoroquinolones | ++ | **Ciprofloxacine, ofloxacine** |

[a] Variable en fonction des espèces ; en gras les antibiotiques recommandés par l'OMS.

**TABLEAU 34-15-5**

**Principaux tests sérologiques utilisables dans le diagnostic des brucelloses.**

| *Tests* | *Fournisseurs* | *Temps nécessaire à la positivité des résultats* | *Persistance de la positivité* | *Avantages – Inconvénients* |
|---|---|---|---|---|
| Épreuve de l'antigène tamponnée (test au rose Bengale EAT) : agglutination rapide sur lame | BioRad<br>bioMérieux<br>J2L Elitech | 3–4 semaines | > 1 an après la fin de la bactériémie | Simple, rapide, sensible, technique de dépistage qualitatif des IgG<br>Nombreux faux positifs (confirmation des tests positifs par une autre technique), cinétique des anticorps décalée restant plus longtemps positive comparée à SAW |
| Séro-agglutination de Wright (SAW) : agglutination lente en tubes | BioRad JEL Elitech | 10–15 jours après l'infection | < 1 an après la fin de la bactériémie | Technique de référence semi-quantitative (IgM, IgG)<br>Faux positifs (réactions croisées), faux négatifs (phénomène de zone, anticorps bloquants) |
| ELISA | MP BioMedicals<br>bioMérieux | > 4 semaines | Tardive (> 18 mois) | Titrage spécifique IgG, IgA et IgM, très utile en cas de brucellose chronique, sensibilité excellente, meilleure spécificité, diminution des réactions croisées<br>Tardive |
| Immunofluorescence indirecte | | > 4 semaines | Tardive (> 18 mois) | Titrage spécifique IgG, IgA et IgM, très utile en cas de brucellose chronique, sensibilité excellente, rapidité (2–3 h)<br>Tardive, lecture subjective |

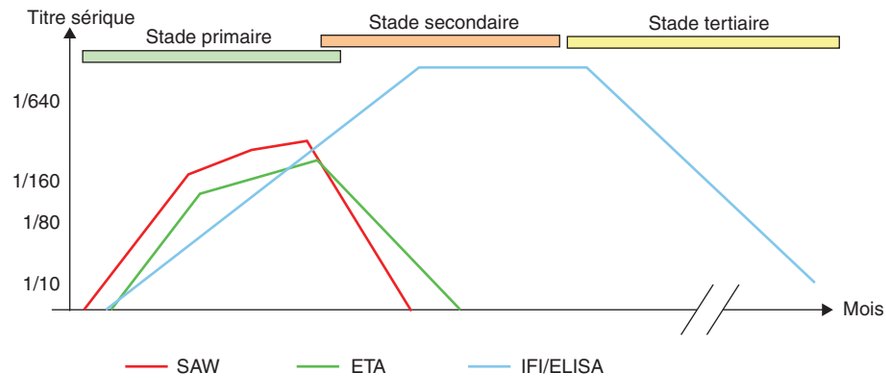



**Fig. 34.15.4.** – *Cinétique d'évolution des anticorps au cours de la brucellose.*

anticorps anti-LPS. Les sérologies doivent être interprétées en corrélation avec le tableau clinique.

## Technique d'agglutination en tube ou séroagglutination de Wright (SAW)

C'est la première technique sérologique décrite (en 1897) qui demeure la référence préconisée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) du fait de sa standardisation (sérum étalon international permettant une réponse en Unités internationales [UI]). La SAW est un test de séroagglutination lente en tube. Les antigènes détectés sont de type IgM +++ et IgG +. Elle est considérée comme significative à la dilution minimale de 1/80$^{e}$ (100 UI). Ce taux croît au fil du temps et peut atteindre, après quelques mois, des dilutions ≥ 1/5120. Les IgM apparaissent dans la semaine suivant l'infection suivies par les IgG. Après traitement, les IgG peuvent persister pendant plus d'un an. Un taux supérieur et persistant doit faire rechercher un foyer en évolution. Des faux négatifs sont observés par phénomène de zone en excès d'anticorps, ou du fait de la présence d'anticorps bloquants. L'évaluation de différentes dilutions du sérum test permet de détecter un phénomène de zone. L'absence d'agglutination après

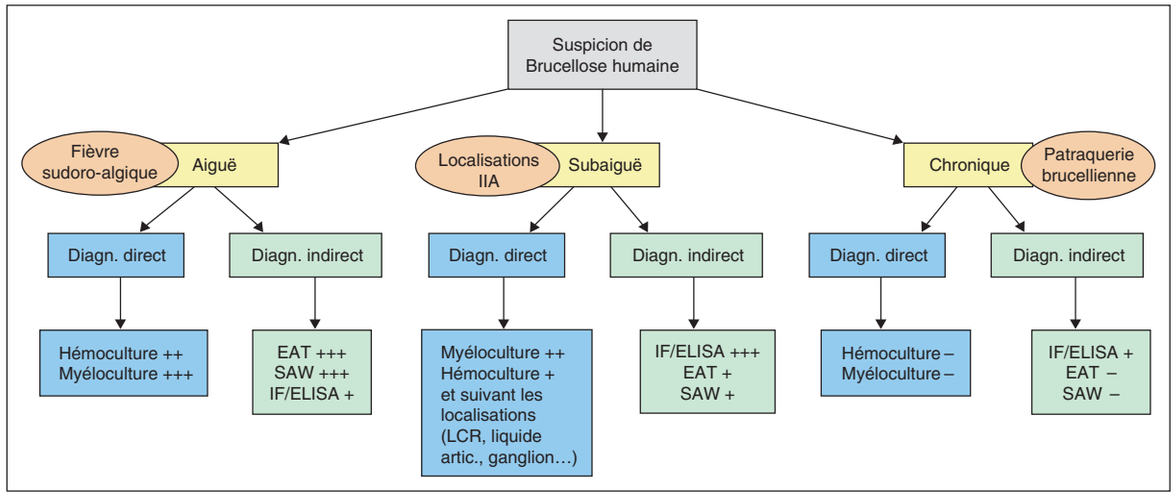



**Fig. 34.15.5.** – *Intérêts des différents prélèvements microbiologiques dans le diagnostic des brucelloses.*

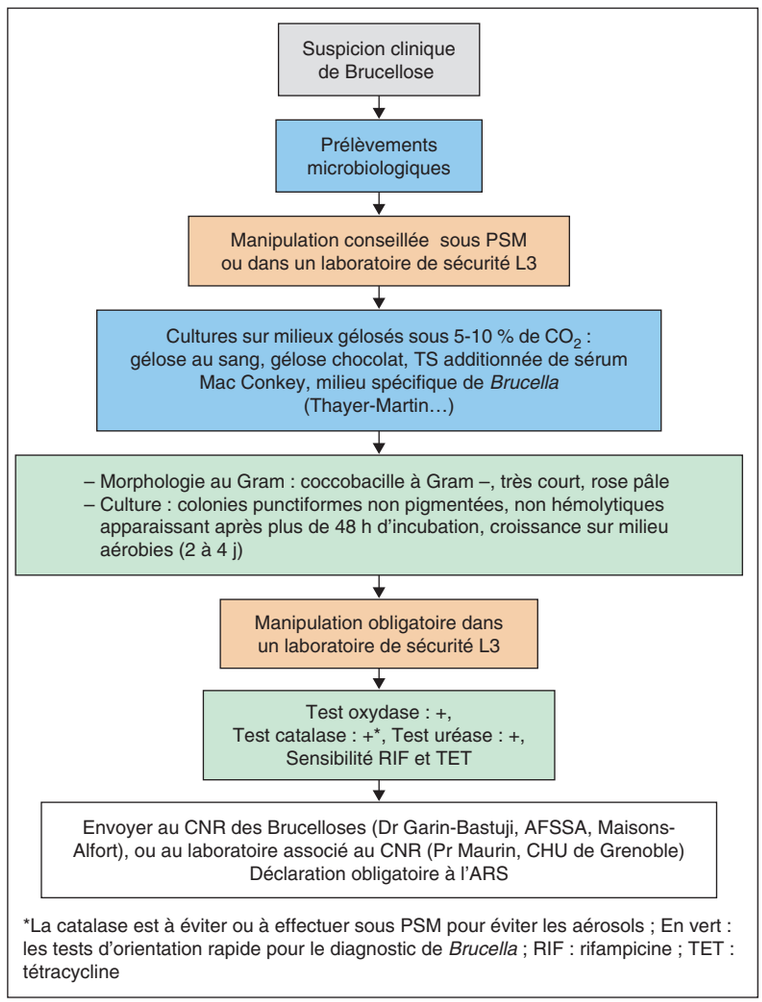



**Fig. 34.15.6.** – *Étapes du diagnostic bactériologique de* Brucella *spp.*

mélange d'un sérum positif contrôle au sérum test permet de révéler la présence d'anticorps bloquants. De plus, il est possible d'utiliser un test de Coombs indirect (anticorps antiglobuline humain) qui permet de détecter les anticorps de type IgG1 et IgG2 et les réactions faussement négatives ou positives avec la SAW. Enfin, les faux positifs peuvent être évités en diluant systématiquement les sérums au-delà de 1/320. Il faut noter que la SAW ne permet pas de détecter les anticorps de *B. canis* et de *B. ovis*. Ces deux bactéries nécessitent la recherche d'antigènes de la protéine majeure de la membrane externe (par exemple, Omp25).

### Technique d'agglutination sur lame ou épreuve de l'antigène tamponné (EAT) (ou test au rose Bengale)

C'est une méthode de criblage rapide (5 à 10 minutes) par agglutination sur lame ou sur carte à usage unique en utilisant le sérum non dilué et une suspension en milieu acide (pour inhiber les agglutinines non spécifiques) et tamponné de *B. abortus* inactivées et colorées au rose Bengale. La persistance parfois très longue des anticorps expose au risque de croire l'infection toujours évolutive, avec pour corollaire une poursuite inutile de l'antibiothérapie.

### Autres techniques sérologiques disponibles

Il s'agit principalement de la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI), des tests de microagglutination, des tests de Coombs indirect et des tests ELISA. Ces méthodes permettent d'apprécier au mieux le stade de l'infection en évaluant les divers isotypes d'anticorps. Les IgM ont valeur d'infection aiguë récente ou actuelle ; les IgA d'une infection focale traînante.

L'IFI est très sensible et est classiquement plus tardive que la SAW ou l'EAT. Elle peut donc être utilisée tout au long de l'évolution de la maladie (formes chroniques de brucellose). Elles complètent la SAW en limitant les faux négatifs et les faux positifs. Des titres en anticorps spécifiques > 160 en IgG-IFI sont habituellement considérés comme valeur seuil. L'ELISA est un test intéressant en cas de brucellose chronique, compliquée ou localisée quand les autres tests sont négatifs.

La persistance prolongée des anticorps après infection ne permet pas d'interpréter de façon fiable un titre sérologique unique. On recherche donc une séroconversion ou une multiplication par 4 au moins des titres sérologiques entre deux sérums, l'un prélevé en phase aiguë et l'autre en phase de convalescence. La limite essentielle au diagnostic sérologique de la brucellose est représentée par la fréquence des réactions croisées entre *Brucella* spp. et d'autres espèces bactériennes, dont principalement *Yersinia enterocolitica* O : 9, mais aussi *Francisella tularensis*, *Escherichia hermanii*, *E. coli* O : 157, *Salmonella* O : 30, *Afipia clevelandensis*, *Ochrobactrum anthropi, Stenotrophomonas maltophilia* ou les vaccinations contre le choléra (*V. cholerae* O : 1). La valeur prédictive positive des tests sérologiques est donc faible, en particulier dans les pays où la prévalence de la brucellose est faible, comme la France.

Une dernière technique consistait en une intradermoréaction à la mélitine (Burnet) réalisée au niveau du bras dans le but de détecter un état d'hypersensibilité qui apparaissait précocement (15 jours). Cette épreuve d'hypersensibilité retardée ne doit plus être utilisée du fait notamment de l'absence actuelle d'allergène disponible dans le commerce.

## Démarche diagnostique

Les figures 34.15.5 et 34.15.6 résument les différentes étapes pour parvenir au diagnostic de brucellose.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, Bahn P, Goellner C, Karges W, et al. Differential phenotyping of *Brucella species* using a newly developed semi-automated metabolic system. BMC Microbiol 2010 ; 10 : 269.

Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Antimicrob Agents 2010 ; 36S1 : S12–7.

Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis : a worldwide zoonosis. Curr Opin Microbiol 2001 ; 4 : 58–64.

CMIT. Brucellose. In : Pilly E. Maladies infectieuses et tropicales. Paris : Ed Vivactis Plus ; 2010. p. 280–1.

Durr U, Valenciano M, Vaillant V. La brucellose humaine en France de 1998 à 2000. In : Surveillance Nationale des maladies infectieuses. Institut de Veille Sanitaire ; 2003 Rapport 1998–2000.

Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. Lancet Infect Dis 2007 ; 7 : 775–86.

Klietmann WF, Ruoff KL. Bioterrorism : implications for the clinical microbiologist. Clin Microbiol Rev 2001 ; 14 : 364–81.

Maurin M. La brucellose à l'aube du 21e siècle. Méd Mal Infect 2005 ; 35 : 6–16.

Navarro E, Fernandez JA, Escribano J, Solera J. PCR Assay for Diagnosis of Human Brucellosis. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 1654–5.

Pappas G, Akritidis N, Tsianos E. Effective treatments in the management of brucellosis. Expert Opin Pharmacother 2005 ; 6 : 201–9.

Redkar R, Rosa S, Bricker B, DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. Mol Cell Probes 2001 ; 15 : 43–52.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Shapiro DS, Wong JD. *Brucella*. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology. Washington DC : American Society for Microbiology ; 1999. p. 625–31.

Vrioni G, Pappas G, Priavall E, Gartzonika C, Levidiotou S. An eternal microbe : *Brucella* DNA load persists for years after clinical cure. Clin Infect Dis 2008 ; 46 : e131–6.

Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol 2009 ; 9 : 1168–84.

**ADRESSES UTILES**

**Centre national de référence de *Brucella***
Dr Bruno Garin-Bastuji
AFSSA
Unité zoonoses bactériennes
23, avenue du Général de Gaulle – BP 67
94 706 Maisons-Alfort cedex
Tél. : 01 49 77 13 23 – Fax : 01 49 77 13 44
E-mail : b.garin-bastuji@afssa.fr

**Centre national de référence *Brucella*** – Laboratoire associé
Pr Max Maurin
CHU de Grenoble
Laboratoire de bactériologie
BP 217
38 043 Grenoble cedex 09
Tél. : 04 76 76 54 79 – Fax : 04 76 76 59 12
E-mail : mmaurin@chu-grenoble.fr

## Chapitre 34.16

# *Legionella*

M. Mounier, F. Denis, N. Pestourie

La légionellose est une maladie relativement récente, dont la première épidémie a été décrite en 1976, lors du 58e congrès de l'American Legion à Philadelphie, où, sur plus de 180 personnes atteintes, elle avait fait 34 morts. De nombreuses hypothèses avaient été évoquées, y compris le bioterrorisme… jusqu'à ce que Joseph McDade observe une « nouvelle » bactérie, en examinant un prélèvement du poumon d'un organisateur décédé. Cette bactérie sera dénommée quelques années plus tard *Legionella pneumophila.* Rétrospectivement, des épidémies dues au même germe ont été identifiées : en 1974, dans le même hôtel de Philadelphie, en 1965 dans un hôpital psychiatrique de Washington, et un isolement de la souche a même pu être obtenu à partir de prélèvements qui dataient de 1947.

La France n'a pas été épargnée par les épidémies. Ainsi, à Paris, une épidémie à l'hôpital Bichat provoque une douzaine de décès de novembre 1982 à mars 1983. En 1998, une épidémie survient. Elle est d'autant mieux repérée qu'un réseau de surveillance européen a été mis en place (European Working Group for Legionella Infection [EWGLI*J*). C'est la comparaison des empreintes génomiques des souches qui permit d'incriminer une tour aéroréfrigérante parisienne parmi toutes celles qui étaient contaminées. Dans les années 2000, c'est l'hôpital européen Georges Pompidou (HEGP) qui fait les frais d'une épidémie. Fin 2003, dans la région lensoise, l'épidémie de légionellose atteint des proportions jamais observées en France, avec 86 cas confirmés dont 18 décès. L'étude des souches a confirmé l'identité entre les souches retrouvées chez les patients et celles provenant de la tour aéroréfrigérante de l'usine pétrochimique mise en cause dans cette épidémie. En 2005, 34 cas ont été répertoriés à Lyon, sans causer de décès et sans que la source ait pu être mise en évidence. En 2009, 1206 cas ont été enregistrés en France, soit une incidence en France métropolitaine de 1,9 pour 100 000 habitants.

## Généralités

La classification officielle proposée par le Center for Diseases Control (CDC) distingue le seul genre *Legionella* dans la famille des *Legionellaceae.* La classification de l'International Committee on Systematic Bacteriology propose trois genres : *Legionella, Fluoribacter* et *Tatlockia.*

À ce jour, on distingue 50 espèces et 64 sérogroupes, mais ces chiffres sont en constante évolution. L'espèce type est *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* qui compte 15 types antigéniques. Il existe deux autres subsp. : *fraseri* et *pascuelli*.

À côté de ces espèces, existent des légionelles à développement intracellulaire obligatoire dites *legionella-like-amoebal pathogens* (LLAP) avec trois espèces.

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif qui prennent mal le Gram et sont colorés par cette technique uniquement si on utilise de la fuchsine phéniquée basique.

Ce sont des bacilles non sporulés, non capsulés, de 0,3 à 0,9 µm de large sur 2 à 20 µm de long. Ils sont cocobacillaires à l'examen direct et prennent un aspect morphologique plus filamenteux en culture.

Les légionelles sont mobiles pour la quasi-totalité des espèces, aérobies strictes avec des exigences nutritives en L-cystéine et en fer.

La température optimale de croissance varie de 25 à 37 ˚C. Les bactéries peuvent survivre à des températures inférieures à 25 ˚C et se multiplier jusqu'à 45 ˚C.

L'aspect des colonies est caractéristique, en « verre fritté », à la loupe binoculaire.

## Habitat et pouvoir pathogène

Les légionelles sont des germes hydrotelluriques qui affectionnent l'eau, surtout l'eau stagnante, de préférence tiède. Elles sont détruites lentement à 50 ˚C (quelques heures) et plus rapidement à 60 ˚C (quelques minutes).

Les réservoirs naturels des légionelles sont nombreux : lacs, rivières, puits, eau de pluie stagnante, mais aussi sols et composts humides. Les gîtes de prédilection restent les tours aéroréfrigérantes, l'eau chaude des stations thermales ou l'eau chaude sanitaire. Sa présence est favorisée par la température (25 à 45 ˚C), mais aussi par certains facteurs physicochimiques (dépôts organiques, nature des réseaux, stagnation de l'eau, etc.) et la présence d'autres micro-organismes (biofilm, cyanobactéries, amibes libres, etc.) dans lesquels elles survivent, sont protégées et peuvent ainsi réensemencer le réseau. En effet, ce germe, qui n'a pas de forme de résistance spécifique, est toutefois capable d'assurer sa survie en s'installant, voire en se multipliant à l'intérieur de cellules hôtes : amibes, cyanobactéries ou ciliées pour l'eau, et macrophages alvéolaires pour l'homme. De même, la forte représentation de protéines *eukaryotic-like* pourrait être un moyen pour la bactérie de manipuler la cellule hôte à son profit, ce qui expliquerait le parasitisme de nombreuses espèces eucaryotes.

La maladie se présente sous plusieurs formes :

- la maladie des légionnaires est la forme « classique » qui se manifeste par une pneumopathie fébrile, qui débute de manière plus ou moins progressive après une phase d'incubation cliniquement « muette », dont la durée classiquement admise est de 2 à 10 jours. Il peut y avoir aussi des manifestations extrapulmonaires : douleurs musculaires, anorexie, troubles digestifs (diarrhées), troubles psychiques, etc. Le tableau clinique peut être atypique, surtout dans les formes graves. Les pneumopathies à légionelles représentent entre 0,5 à 5 % des pneumopathies communautaires. Elles évoluent en cas sporadiques ou en cas groupés (au moins deux cas survenus dans un intervalle de temps inférieur à 6 mois). C'est une maladie grave et létale, en particulier chez les patients immunodéprimés (transplantés, cancers bronchiques, leucémies, etc.). Le tabagisme, l'éthylisme, le diabète, l'insuffisance rénale chronique, les affections cardiopulmonaires chroniques, l'âge (> 50 ans) sont rapportés seuls ou associés comme facteurs favorisants. C'est une maladie de l'adulte « mûr » qui atteint de manière exceptionnelle l'enfant ou l'adulte jeune. Le taux de létalité est important (14 % en 2004 en France). C'est une maladie à déclaration obligatoire. Il faut signaler que l'espèce *L. pneumophila* est responsable d'environ 95 % des cas de légionellose et plus de 80 % des souches appartiennent au sérogroupe 1 ;
- la fièvre de Pontiac est la forme bénigne de la maladie. Elle atteint les voies aériennes supérieures après une incubation courte (36 heures) et guérit spontanément. Elle passe souvent inaperçue ;
- les manifestations extrapulmonaires sont rares, mais des cas ont été documentés chez des patients immunodéprimés. La pathologie est variée : cellulites, sinusites, péricardites, pyélonéphrites, péritonites, pancréatites, endocardites, abcès rectal, etc. Des infections du site opératoire après chirurgie cardiothoracique ont été décrites et la source de contamination reliée à de l'eau contaminée par des légionelles.

## Prélèvements

### *Chez l'homme*

Chez l'homme, il n'y a pas de portage « sain ». La mise en évidence de la bactérie dans un prélèvement d'origine humaine signe la maladie.

- Les prélèvements d'urines permettent un diagnostic rapide par la recherche des antigènes solubles de *Legionella pneumophila* avec une bonne spécificité pour le sérogroupe 1 (VPP : 86 % et VPN : 95 %). Le prélèvement d'urine ne demande pas de conditions particulières et peut être réalisé comme pour un ECBU classique. Les urines peuvent être conservées plusieurs mois à +4 ˚C et plusieurs jours à température ambiante.
- Les prélèvements pulmonaires : le succès de la culture dépend de la qualité du prélèvement. Le liquide bronchoalvéolaire (LBA) et les aspirations trachéales et bronchiques sont les prélèvements à privilégier. Il ne faut pas négliger pour autant les crachats, même si le prélèvement ne contient pas de polynucléaires.
- D'autres prélèvements ont également permis l'isolement de légionelles : biopsies pulmonaires, liquide pleural, sang, etc. voire des prélèvements issus de localisations extrapulmonaires (cœur, foie, rate, rein, peau, etc.).

Ces prélèvements doivent être faits si possible avant antibiothérapie. Ils sont recueillis le plus stérilement possible en évitant l'utilisation d'anesthésiques locaux (lidocaïne).

Pour éviter la dessiccation, on utilisera de l'eau distillée stérile et pas de sérum physiologique qui risque d'inhiber la culture.

Si le délai de transport est supérieur à 30 minutes, il est conseillé de conserver le prélèvement à +4 °C. Si le délai d'ensemencement est supérieur à 3 jours, les prélèvements doivent être congelés (–20 °C).

## Diagnostic biologique

### *Recherche d'antigènes urinaires*

C'est une méthode rapide de diagnostic qui se fait par méthode immuno-enzymatique classique (ELISA) en quelques heures ou par immunochromatographie sur membrane, de performance identique aux kits ELISA, mais qui permet un résultat plus rapide (lecture après 15 minutes).

Ce test permet le diagnostic de plus de 80 % des légionelloses dues à *L. pneumophila* de sérogroupe 1 (Lp1) car les tests actuels permettent essentiellement la détection de ce sérogroupe. Un test négatif ne doit donc pas exclure le diagnostic de légionellose (sensibilité 56 %, spécificité 99 %).

L'ultrafiltration sélective augmente la sensibilité de la technique sans diminuer la spécificité. Il est donc souhaitable de réaliser une concentration des urines, même si cela allonge un peu le délai de réponse (quelques minutes à quelques heures).

Les antigènes urinaires sont détectables dès l'apparition des symptômes (3 à 4 jours) et le restent après la guérison (de 2 à plusieurs mois), avec une cinétique d'apparition et de disparition très variable en fonction des patients.

La facilité du prélèvement, la rapidité de la technique et du diagnostic ne doivent pas faire négliger les prélèvements classiques qui, seuls, permettront d'obtenir la souche responsable de l'infection.

En septembre 2004, des faux positifs ont été rapportés, entraînant la suspension de la commercialisation d'un lot de réactifs utilisés pour ce test.

### *Culture*

C'est la méthode de choix (le « gold standard ») qui seule permet de comparer des souches humaines et environnementales et de confirmer la source d'une infection. La spécificité est de 100 %, mais la sensibilité est faible (40 à 60 %).

Aucun prélèvement ne doit être rejeté sur les critères de la bactériologie classique, en particulier les crachats (quantité de polynucléaires, petit volume, etc.), car l'expérience prouve que même des prélèvements de « mauvaise » qualité peuvent donner des résultats positifs : une seule colonie suffit pour confirmer le diagnostic.

La demande diagnostique par culture est détaillée sur la figure 34.16.1.

#### Milieux de culture

Seuls des milieux spécifiques complexes (extrait de levure, L-cystéine, pyrophosphate de fer, charbon qui donne une coloration noire au milieu, ± antibiotiques, facteurs de croissance) permettent la croissance de la bactérie.

Pour les prélèvements humains, on utilise le *buffered charcoal yeast extract* (BCYE alpha) incubé à 35 °C sous 2,5 à 5 % de $CO_2$. Ce milieu peut être rendu sélectif par l'adjonction d'antibiotiques (colistine et vancomycine).

Pour les prélèvements d'environnement, on utilise un milieu BCYE supplémenté en vancomycine, glycine et colistine (GVPC).

#### Préparation de l'échantillon

Les prélèvements peuvent nécessiter une préparation avant ensemencement :

- les crachats doivent être fluidifiés ;
- les échantillons liquides peuvent être centrifugés ;
- les tissus (biopsie et post mortem) doivent être broyés dans de l'eau stérile et homogénéisés.

Dans le cas d'une contamination bactérienne importante, un traitement de l'échantillon est recommandé :

- par traitement acide (HCl 0,2 M) suivi d'une neutralisation (KOH ou NaOH 0,01M) ;
- ou par chauffage 30 minutes à 50 °C (sélection des légionelles thermotolérantes) ;
- ou par dilution ($10^{-2}$, $10^{-4}$) dans l'eau stérile pour diminuer la concentration en contaminants et en antibiotiques potentiellement présents.

#### Ensemencement

Tous les prélèvements non traités et traités sont ensemencés sur les milieux spécifiques :

- un milieu BCYE alpha ;
- ± un milieu ± supplémenté en antibiotiques, en sachant que ce milieu ne doit jamais être utilisé seul car il peut inhiber la croissance de certaines espèces de légionelles comme *L. micdadei* ;
- ± les milieux standard pour le prélèvement concerné.

#### Incubation

Les milieux sont incubés à 36 °C ± 1 °C, de préférence en présence de $CO_2$ (2,5 %).

Les milieux sont observés à J3, J5 et J10.

Si une contamination bactérienne est constatée dans les premières 24 heures de culture, le prélèvement peut être acidifié et réensemencé.

### *Identification*

L'exigence en L-cystéine est un élément fondamental car, dans la grande majorité des cas, en primoculture, les légionelles poussent uniquement sur milieu BCYE.

Les colonies ont un aspect typique en « verre fritté » quand on les observe à la loupe binoculaire (idéalement en lumière rasante) (fig. 34.16.2).

Les colonies suspectes sont prélevées et ensemencées sur BCYE avec et sans cystéine et sur gélose au sang.

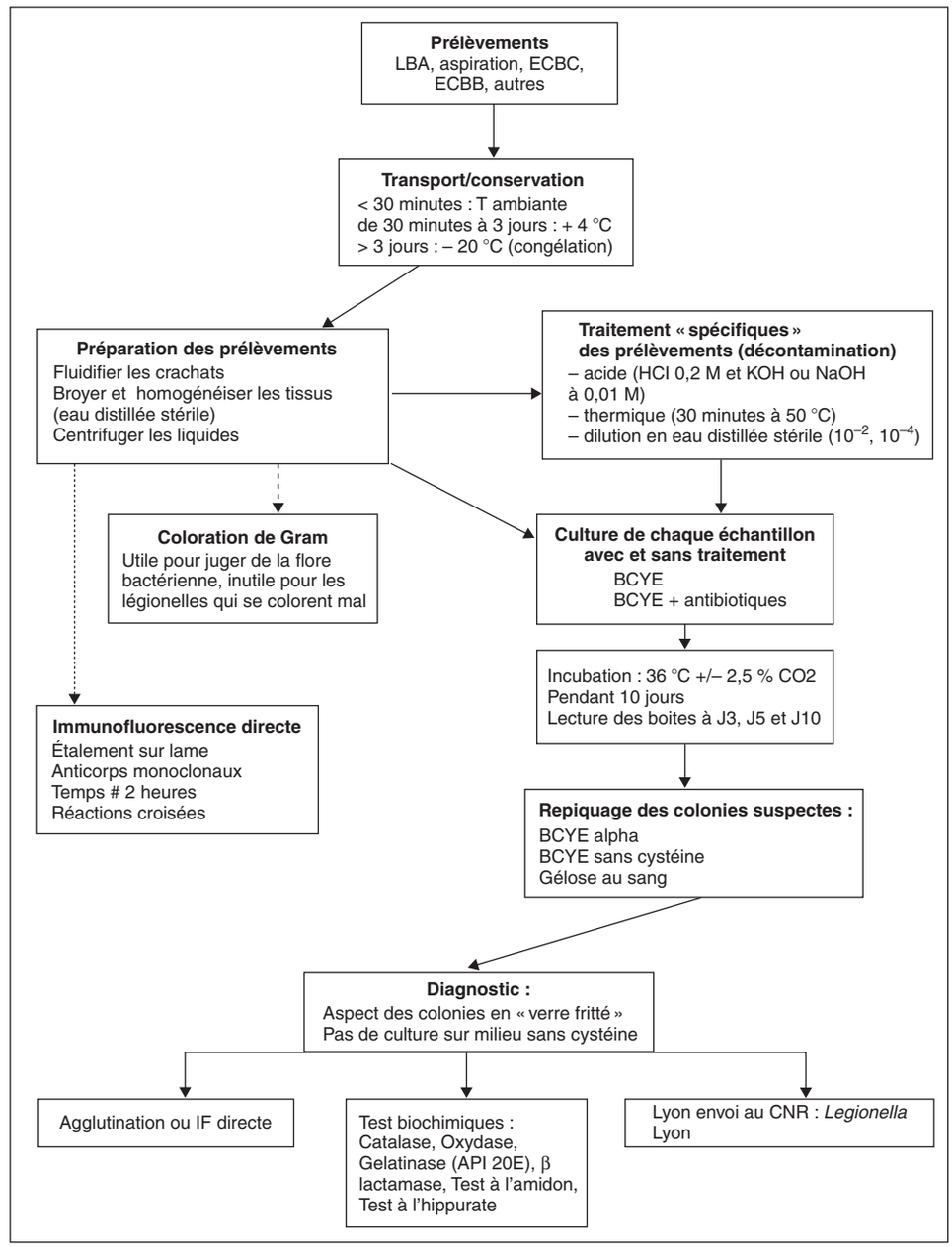



**Fig. 34.16.1.** – *Schéma récapitulatif du diagnostic par culture.*

Le genre légionelle est retenu sur les arguments suivants :

- aspect typique des colonies sur BCYE alpha ;
- absence de culture sur milieu BCYE sans cystéine (sauf pour *L. jordanis* et *L. oakridgensis*) ;
- absence de culture sur gélose au sang ;
- morphologie évocatrice du Gram et en immunofluorescence (fig. 34.16.3).

Les caractères biochimiques d'identification sont relativement pauvres (tableau 34.16.1) et, en pratique, devant une colonie suspecte, on peut effectuer :

- une galerie API 20® : tous les caractères sont négatifs, sauf la gélatinase pour les principales espèces ;
- l'oxydase et la catalase (négative seulement pour *L. worsleiensis*) ;
- des tests de l'hydrolyse de l'hippurate, de β-lactamase et un test à l'amidon (positif).

Le diagnostic différentiel entre *L. pneumophila* et les autres espèces est possible :

- soit par immunofluorescence directe à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine de la membrane externe (*major outer membrane protein*

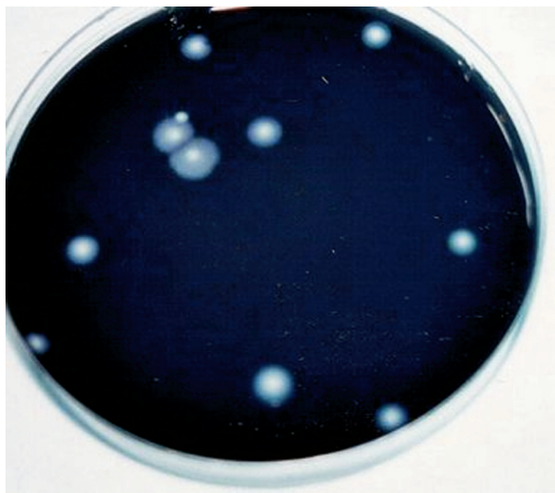


**Fig. 34.16.2.** – *Culture de légionelles : aspect des colonies.*

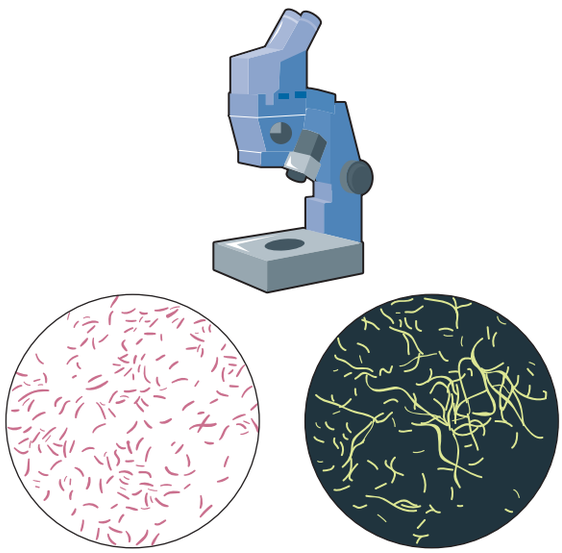


**Fig. 34.16.3.** – *Morphologie des légionelles vues au microscope (coloration de Gram à la fuchsine phéniquée à gauche et immunofluorescence à droite).*

[MOMP]) présente chez tous les sérogroupes de *L. pneumophila* et qui serait spécifique de cette espèce ;
- soit par agglutination de particules de latex qui permet de détecter *L. pneumophila* sérogroupe 1 ou *L. pneumophila* sérogroupes 2 à 14.

Les souches isolées doivent être envoyées au Centre national de référence (CNR ; Lyon) dans des emballages conformes à la législation en vigueur pour confirmer et finaliser l'identification.

Quand des souches à développement intracellulaire obligatoire (LLAP) sont suspectées en clinique humaine, on doit avoir recours à des cocultures amibiennes. L'étude de la sensibilité des légionelles aux antibiotiques relève de laboratoires spécialisés ; pour le traitement, on a souvent recours aux nouveaux macrolides (azithromycine et clarithromycine voire aux fluoroquinolones ou à la rifampicine).

## Immunofluorescence directe (IFD)

L'IFD se pratique avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux qui reconnaissent les sérogroupes de *L. pneumophila* pour la majorité des réactifs commercialisés.

L'intérêt majeur de cette technique est sa rapidité (2 heures) mais sa faible sensibilité (25 à 40 %) et le seuil de détection élevé (10 000 UFC/ml) font qu'elle est souvent délaissée au profit de la recherche des antigènes urinaires. De plus, il existe des réactions croisées avec certaines bactéries (*Pseudomonas, Bordetella, Bacteroides*, *Francisella,* etc.) dont l'impact peut être limité si l'opérateur a une bonne connaissance de la morphologie des légionnelles et si un des frottis a été coloré par la technique de Gram pour apprécier la flore dominante.

## Méthodes moléculaires

Des techniques de PCR et de PCR en temps réel ont été appliquées avec succès à divers prélèvements respiratoires ou de l'environnement avec des sensibilités supérieures à la culture.

Les techniques de biologie moléculaire comme l'amplification aléatoire de l'ADN (*random amplified polymorphic DNA [*RAPD]) ou des techniques de séquençage nucléotidique (gène *mip*) se développent très rapidement et sont des méthodes d'identification et de comparaison de souches performantes. Elles pourraient dans l'avenir remplacer les techniques actuelles.

Les méthodes moléculaires permettent des recherches qualitatives et quantitatives des légionelles donnant une réponse beaucoup plus rapide que les cultures.

À noter que les laboratoires pratiquant la recherche des légionelles dans l'environnement sont soumis à une demande d'accréditation spécifique dès l'année 2011.

## Diagnostic sérologique

L'immunofluorescence indirecte (IFI), mise au point par McDade lors de l'épidémie de Philadelphie, reste la méthode la plus employée. Les anticorps détectés sont en majorité dirigés contre le lipopolyssaccharide (LPS) de la membrane externe des légionelles.

Pour la détection de ces anticorps, deux types de préparations antigéniques sont proposés :
- antigène de Wilkinson : les légionelles sont cultivées sur milieu gélosé et inactivées par chauffage à 100 °C pendant 1 heure. L'antigène est ensuite dilué dans une suspension de sac vitellin ;
- antigène de Taylor : les légionelles sont cultivées sur œuf embryonné de 6 à 7 jours. Les sacs vitellins sont recueillis 5 jours plus tard. Les bacilles sont inactivés par le formol à 2,5 %. C'est ce type d'antigène qui est préparé par le CNR.

**TABLEAU 34-16-1**

**Caractères d'identification des principales espèces de *Legionella*.**

| | *Isolement chez l'homme* | *Oxydase* | *Gélatinase* | β-*lactamase* | *Hydrolyse de l'hippurate* | *Besoin en cystéine* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *L. pneumophila* | +++ | v | + | + | + | + |
| *L. longbeachae* | + | v | + | + | – | + |
| *L. oakridgensis** | + | – | + | v | – | – |
| *L. micdadei* | + | + | ± | – | – | + |
| *L. dumoffi* | + | – | + | + | – | + |
| *L. morganii* | + | – | + | + | – | + |
| *L. bozemanii* | + | v | + | + | – | + |
| *L. jordanis* | + | + | + | + | – | v |
| *L. wadsworthi* | + | – | + | + | – | + |
| *L. anisa* | + | v | + | + | – | + |
| *L. feelei* | + | – | – | – | f | + |
| *L. sainthelensi* | + | – | + | + | – | + |
| *L. birminghamensis* | + | v | + | + | – | + |
| *L. cincinatiensis* | + | – | + | + | – | + |
| *L. maceachernii* | + | + | + (v) | – | – | + |

+ = positif ; – = négatif ; v = variable ; f = faible.
* Immobile.

Ces antigènes polyvalents et monovalents sont commercialisés par différentes sociétés. Ils possèdent des différences de sensibilité et de spécificité qui peuvent entraîner des divergences d'interprétation du sérodiagnostic. De plus, il existe de nombreuses réactions croisées génératrices de faux positifs (mycobactéries, *Chlamydia, Mycoplasma, Coxiella burnetii, Campylobacter*, etc.).

Cette recherche n'a de valeur qu'en cas d'augmentation des anticorps sur deux sérums prélevés à 3 à 4 semaines d'intervalle ; elle n'a pas de valeur diagnostique sur un seul sérum en début de maladie. Les anticorps apparaissent le plus souvent une semaine après le début de l'infection ; le pic se situe le plus souvent 3 à 4 semaines plus tard, mais certains cas ne s'accompagnent pas de séroconversion. La disparition des anticorps est également imprévisible, allant de 2 à 18 mois.

La séroconversion a une sensibilité de 75 % et une spécificité de 95 à 99 %.

La recherche des IgM est sans intérêt.

La méthode ELISA proposée comme méthode de screening montre une bonne corrélation avec les résultats de l'IFI.

## Bactérie sous haute surveillance

En France, depuis 1987, la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire (fig. 34.16.4).

La surveillance a été renforcée en 1997 par un système interactif de signalement des cas de légionellose entre le

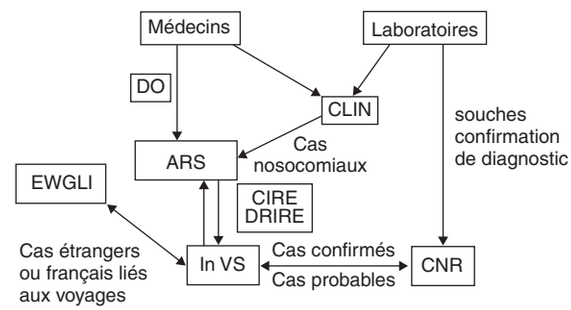



**Fig. 34.16.4.** – *Modalités de déclaration des légionelloses en France.*

CNR des *Legionella* et l'Institut national de veille sanitaire (InVS).

Il y a ainsi trois niveaux d'intervention :

- local : la déclaration peut être faite par le médecin traitant le malade et/ou par le laboratoire de biologie. Cette déclaration est faite à l'Agence Régionale de Santé (ARS) qui, dans le cas d'une épidémie, réalise avec l'aide de la Direction régionale de l'industrie de la recherche et de l'environnement (DRIRE) et de la Cellule inter-régionale d'épidémiologie (CIRE) une enquête afin d'identifier les expositions à risque, de rechercher d'autres cas liés à ces expositions et de prendre les mesures environnementales de contrôle appropriées. Si l'infection est nosocomiale, il faut également

avertir le Comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) de l'établissement ;
- national : l'action interactive du CNR et de l'InVS permet de connaître la fréquence, les tendances et les principales caractéristiques épidémiologiques de la maladie ;
- européen : l'activité du réseau EWGLI permet l'identification de cas groupés ou liés (surtout parmi les voyageurs) et permet de mettre en place, au plus vite, les mesures visant à contrôler et à prévenir la maladie.

Entre 1997 et 2005, le nombre de cas annuels déclarés est passé de 206 à plus de 1200. Le test urinaire représente à lui seul plus de 80 % des méthodes de diagnostic des cas de légionelloses déclarés. Si ce test permet un traitement et une déclaration plus rapides, il entraîne un recul important des diagnostics portés par culture, ce qui peut nuire à l'identification de la source de l'infection. Il est donc extrêmement important de « réclamer » les prélèvements pour culture.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Campese C, Maine C, Che D. Les cas de légionellose déclarés en France en 2009. BEH 2010 ; 31–32 : 334–5.

Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, et al. Evidence in *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nat Genet 2004 ; doi : 10.1038/ng1447 http://www.naure.com/naturegenetics Published online : 3 October 2004.

Dubrou S, Nahapetian K, Challemel O, Festy B. Protozoaires et prolifération des *Legionella* dans les réseaux privés de distribution d'eau. Journal Français d'Hydrologie 1993 ; 23 : 251–9.

Jarraud S, Reyrolle M, Etienne J. *Legionella* et legionellose. In : Freney J, Renaud F, Leclerq R, Riegel P, editors. Precis de bactériologie clinique. 2 Paris : ESKA ; 2007.

Kazandidjian D, Chiew R, Gilbert GL. Rapid diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 9546.

Kool JL, Bergmire-Sweat D, Butler JC, et al. Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial Legionnaires' disease : a cohort study of 15 hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 1999 ; 20 : 798–805.

Lattimer GL, Ormsbee RA. Legionnaires' disease. New York–Basel : Marcel Dekker, Inc ; 1981.

Miquel P, Haeghebaert S, Campese C, et al. Épidémie communautaire de légionellose, Pas-de-Calais, France, novembre 2003-janvier 2004. BEH 2004 ; 36–37 : 179–81.

Rouil L, Gardenas G, Marcel F. Évaluation de la dispersion atmosphérique d'aérosols potentiellement contaminés lors de l'épidémie de légionellose de la région de Lens. BEH 2004 ; 36–37 : 182–4.


**Quelques textes de références**


Circulaire du 6 août 2004 relative à la prévention du risque sanitaire lié aux légionelles dû aux tours aéroréfrigérantes humides.

Circulaire DGS/SD7A – DHOS/E4 n° 2003/306 du 26 juin 2003 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les tours aéroréfrigérantes des établissements de santé.

Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243 du 22/04/2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.

Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

Circulaire DGS/SD7A/DHOS/E4/DGAS/SD2 n° 2005-493 du 28 octobre 2005 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées.

L'eau dans les établissements de santé : guide technique Eau et santé. Ministère de la Santé et des Solidarités ; 2005.

Le risque lié aux légionelles : guide d'investigation et d'aide à la gestion. CSHPF ; 2005.

Circulaire DGS/SD7A/DHOS/E4 n° 2005-286 du 20 juin 2005 relative au référentiel d'inspection des mesures de prévention des risques liés aux légionelles dans les établissements de santé.


**ADRESSE UTILE**


**Centre national de référence *Legionella***
Pr Jérôme Étienne
Dr Sophie Jarraud
Groupement hospitalier Est, Université Claude Bernard
Centre de biologie et pathologie, Institut
de Microbiologie
59, boulevard Pinel
69 677 Bron cedex
Tel. : 04 72 12 96 25 – Fax : 04 72 35 73 35
E-mail : jerome.etienne@chu-lyon.fr

CHAPITRE

# 35 Bacilles à Gram négatif microaérophiles

## Chapitre 35.1

# *Campylobacter*

C. Burucoa

## Généralités

Les *Campylobacter* sont des bacilles à Gram négatif qui apparaissent incurvés, spiralés ou sous forme hélicoïdale dont l'épaisseur varie de 0,2 à 0,9 µm et la longueur de 0,5 à 5 µm (fig. 35.1.1 et 35.1.2).

Les *Campylobacter* sont considérés comme étant la principale cause bactérienne de gastro-entérites dans le monde avec une incidence croissante dans les pays développés.

Les *Campylobacter* ont été individualisés en 1963 par leur GC % (29 à 38 %) très inférieur à celui des *Vibrio* (40 à 52 %) par Sébald et Véron qui ont proposé ce genre nouveau. *Campylobacter* vient du grec λκαμπθλοσ, incurvé ; βαχτερ, bâtonnet.

Le genre *Campylobacter* contient 17 espèces dont les principales sont *C. jejuni* et *C. coli*, responsables d'entérites, et *C. fetus*, responsable de septicémies chez l'immunodéprimé.

Ce genre appartient à la superfamille VI de bacilles à Gram négatif, actuellement dénommée classe des *Epsilonproteobacteria*, qui comprend quatre genres : *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter* et *Wolinella.* Les deux premiers genres ont été regroupés dans la famille des *Campylobacteraceae*.

Au sein de cette famille, on a décrit dans le genre *Campylobacter* une espèce type *C. fetus* et 16 autres espèces ainsi que plusieurs sous-espèces (tableau 35.1.1).

Les espèces du genre *Campylobacter* sont principalement responsables de zoonoses avec de nombreuses espèces animales impliquées comme réservoirs infectieux.

La classification de ces espèces sur une base morphologique et physiologique est relativement difficile car les caractères distinctifs sont peu nombreux. Traditionnellement, ces espèces sont cependant divisées en deux groupes, selon qu'elles produisent ou non une catalase. Le fondement génétique de cette division phénotypique simple a été confirmé par de nombreuses études génétiques.

## Épidémiologie et pouvoir pathogène

Les *Campylobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de nombreux oiseaux et mammifères (tableau 35.1.1). Les oiseaux en général, le poulet en particulier, peuvent être considérés comme le réservoir naturel de *C. jejuni*. Cette bactérie vit au niveau du cloaque des oiseaux où elle est présente à de fortes concentrations ($10^6$ UFC/g de matière fécale). Cette colonisation est sans

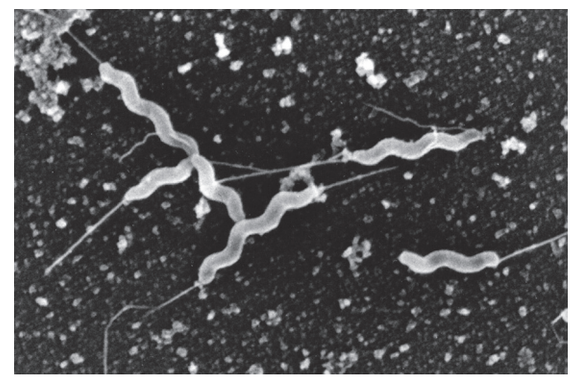


**Fig. 35.1.1.** – *Vue en microscopie électronique à balayage de* C. jejuni.
*Cliché : service d'anatomopathologie, CHU Poitiers.*

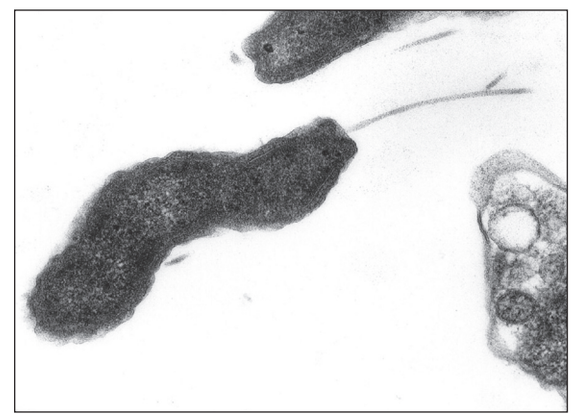


**Fig. 35.1.2.** – *Coupe de* C. jejuni *en microscopie électronique à transmission.*
*Cliché : service d'anatomopathologie, CHU Poitiers.*

**TABLEAU 35-1-1**

**Les espèces du genre *Campylobacter* et leurs hôtes préférentiels.**

| *Espèces et sous-espèces* | *Hôtes préférentiels* |
|---|---|
| *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* | Oiseaux, humains, bovins, ovins, chats, chiens |
| *Campylobacter jejuni* subsp.*doylei* | Humains |
| *Campylobacter coli* | Porcins, oiseaux |
| *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* | Bovins, ovins |
| *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* | Bovins, ovins |
| *Campylobacter sputorum* bv. *sputorum comprend C. sputorum* bv. *bubulus* | Humains, bovins, ovins, porcins |
| *Campylobacter sputorum* bv. *paraureolyticus* | Bovins, humains |
| *Campylobacter sputorum* bv. *fecalis* | Ovins, bovins |
| *Campylobacter mucosalis* | Porcins |
| *Campylobacter concisus* | Humains |
| *Campylobacter lari* | Oiseaux, chats, chiens |
| *Campylobacter rectus* | Humains |
| *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* | Porcins, bovins, hamsters |
| *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* | Porcins |
| *Campylobacter curvus* | Humains |
| *Campylobacter upsaliensis* | Chats, chiens, humains |
| *Campylobacter showae* | Humains |
| *Campylobacter helveticus* | Chats, chiens |
| *Campylobacter lanienae* | Humains |
| *Campylobacter gracilis* | Humains |
| *Campylobacter hominis* | Humains |
| *Campylobacter insulaenigrae* | Mammifères marins |

conséquence pathologique chez les oiseaux. La prévalence de *Campylobacter* au niveau du tube digestif des volailles est 8 à 20 fois plus élevée que celle de *Salmonella.* Selon les études, 40 à 80 % des carcasses de poulet à la distribution sont contaminées. *C. coli* est essentiellement rencontré chez le porc, *C. upsaliensis* chez le chien, *C. lari* chez la mouette. Ces espèces bactériennes peuvent toutefois être retrouvées chez d'autres animaux d'élevage destinés à l'alimentation humaine et des animaux de compagnie.

*Campylobacter* peut survivre dans l'environnement pendant plusieurs semaines à des températures proches de 4 °C, particulièrement dans l'eau ou le lait. Il ne peut se multiplier dans les aliments à la différence des *Salmonella*.

Dans les pays développés, la transmission des *Campylobacter* s'effectue selon deux modes : un mode sporadique qui représente la majorité des cas, et un mode épidémique, plus spectaculaire, mais moins fréquent.

La transmission est essentiellement d'origine alimentaire et la principale source d'infection est la consommation de viande de poulet crue ou insuffisamment cuite. Toute viande crue est susceptible d'être contaminée par *Campylobacter*, la volaille étant, de loin, la principale viande incriminée. La majorité des cas sporadiques est due à la consommation de volaille.

Lors d'épidémies, d'autres sources d'infection ont été décrites ; ainsi, le lait cru consommé par des collectivités d'enfants et les réservoirs d'eau potable notamment sont les sources les plus souvent incriminées. La contamination par l'eau de boisson explique la saisonnalité estivale des épidémies.

## Infection à *Campylobacter jejuni*

Les manifestations cliniques d'une infection entérique à *Campylobacter* sont identiques quelle que soit l'espèce de *Campylobacter. C. jejuni* en est le prototype.

L'entérite à *Campylobacter* survient préférentiellement chez les enfants de moins de 5 ans sous forme d'une diarrhée aiguë. La période d'incubation estimée est de 1 à 10 jours. L'entérite débute par une phase prodromique de 2 jours, associant fièvre élevée et frissons, puis survient la phase digestive caractérisée par des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales. La diarrhée apparaît ensuite, initialement aqueuse, puis parfois muqueuse, sanglante ou purulente. Ce syndrome dysentérique n'est pas distinguable de celui provoqué par *Shigella* et *Salmonella*.

La distribution saisonnière est moins marquée que celle des *Salmonella*, bien qu'un pic estival soit observé.

L'entérite à *Campylobacter* est spontanément régressive. La durée totale de l'épisode aigu est de 8 à 10 jours, mais les patients excrètent *Campylobacter* dans leurs selles pendant plusieurs semaines à parfois plusieurs mois après la guérison clinique. Des rechutes surviennent chez 25 % des patients, souvent limitées à des crises abdominales douloureuses.

Parmi les *Campylobacter*, l'espèce *C. jejuni* est la plus fréquemment isolée au laboratoire de biologie médicale (76 % des souches), suivie de *C. coli* (17 %) puis de *C. fetus* (5 %, dont 65 % isolé d'hémocultures). *Arcobacter butzleri* représente 1 % des *Campylobacteraceae* identifiés par le Centre national de référence (CNR).

En France, on estime à près de 18 000 le nombre de cas annuels d'entérites à *Campylobacter* confirmés et près de 3000 hospitalisations seraient imputables à ces germes.

Les bactériémies et les septicémies sont très rares lors des infections dues à *C. jejuni*, la plupart des souches étant sensibles à l'activité bactéricide non spécifique du sérum.

Un pour cent des malades développe une arthrite réactionnelle aseptique 7 à 10 jours après l'épisode diarrhéique.

Plus grave mais rare, le syndrome de Guillain-Barré (polyradiculonévrite ascendante régressive postinfectieuse) peut entraîner des troubles de la déglutition, voire des paralysies des muscles respiratoires nécessitant alors une ventilation artificielle en réanimation. Il est dû à une maladie démyélinisante aiguë des nerfs périphériques. L'infection à *C. jejuni* est l'une des causes principales du syndrome de Guillain-Barré dans les pays développés. L'apparition des premiers signes neurologiques survient 1 à 3 semaines après l'infection à *C. jejuni*.

Les malades atteints de ce syndrome présentent des traces sérologiques d'infection à *C. jejuni* dans 20 à 40 % des cas. Aux États-Unis et au Japon, 30 à 80 % des souches isolées de malades atteints de ce syndrome appartiennent au sérogroupe Penner 19, Lior 7. Ce sérogroupe ne représente que 3 % des souches isolées habituellement dans ces pays. Il existe des similarités moléculaires entre les antigènes de la paroi bactérienne et les composants de la gaine de myéline des nerfs ; la structure terminale de l'oligosaccharide du LPS du sérogroupe concerné est identique à la structure terminale du ganglioside GM1 du nerf.

## Infection à *Campylobacter fetus*

Contrairement à *C. jejuni*, *C. fetus* est rarement à l'origine d'entérite. Il provoque le plus souvent des syndromes fébriles prolongés compliqués d'atteintes focales touchant plus particulièrement l'endothélium vasculaire (endocardites, anévrismes de l'aorte, thrombophlébites). Les infections systémiques à *C. fetus* surviennent le plus souvent chez des malades souffrant d'une pathologie sous-jacente (cirrhose, cancer, diabète, immunosuppression, etc.).

L'infection à *C. fetus* pendant la grossesse peut se manifester par des signes respiratoires, de la fièvre, une bactériémie. L'évolution est toujours favorable pour la mère, alors que la mortalité fœtale est élevée.

*C. fetus* peut également être à l'origine d'infection du système nerveux central, d'arthrite septique, d'ostéomyélite, d'infection urinaire.

## Infections provoquées par les autres *Campylobacter*

*C. coli* est à l'origine des mêmes manifestations cliniques que *C. jejuni*. L'intensité des signes cliniques est cependant moins importante.

*C. upsaliensis* est à rapprocher de *C. fetus*. Il peut provoquer des entérites chez les patients immunocompétents accompagnées de bactériémies chez les patients immunodéprimés.

*C. lari* peut provoquer des diarrhées aiguës chez l'enfant et des bactériémies chez l'adulte immunodéprimé.

*C. hyointestinalis* peut être responsable de diarrhées hydriques chez l'enfant.

*C. concisus, C. curvus, C. rectus, C. gracilis* et *C. showae* ont été associés à des parodontopathies.

## Physiopathologie

Seules les bases moléculaires du pouvoir pathogène de *C. jejuni* ont fait l'objet de travaux. Les autres espèces ont été peu étudiées. *C. jejuni* est capable d'adhérer et de pénétrer des cellules épithéliales en culture. Les pili, la flagelline, les protéines de membrane externe et le lipopolysaccharide pourraient jouer le rôle d'adhésine. *C. jejuni* peut survivre à l'intérieur des vacuoles et induire l'apoptose et la production d'interleukine 8 (IL-8) médiateur de l'inflammation. *C. jejuni* peut transloquer par voie trans- ou paracellulaire. Enfin, *C. jejuni* produit une toxine distendant le cytosquelette.

*C. fetus* possède une microcapsule S qui le rend résistant à la phagocytose.

## Diagnostic

Le diagnostic est le plus souvent direct, reposant sur l'isolement de *Campylobacter* à partir des selles.

## Diagnostic bactériologique direct

### *Prélèvement*

La recherche de *Campylobacter* doit faire partie intégrante des coprocultures devant une diarrhée infectieuse aiguë ; elle est réalisable sur un échantillon de selles ou sur le produit d'un écouvillonnage rectal. L'écouvillon doit être ensemencé immédiatement ou stocké en milieu de transport car les *Campylobacter* sont sensibles à la dessiccation. L'échantillon de selles peut être conservé 24 heures à 4 °C. La découverte de *Campylobacter* dans les hémocultures est le plus souvent le fruit du hasard. Il faut néanmoins savoir y penser devant des cultures négatives et utiliser alors des milieux de culture adéquats.

### *Examen direct*

L'observation au microscope à contraste de phase permet de mettre en évidence les *Campylobacter* grâce à leur mobilité caractéristique en « vol de moucherons », proche de ce que l'on observe avec *Vibrio cholerae*. Un frottis coloré peut permettre à un observateur exercé de noter la présence de bactéries incurvées (fig. 35.1.1 et 35.1.2), de petite taille (0,2 à 0,9 µm × 0,5 à 5 µm), souvent associée à la présence d'hématies et de leucocytes. Malheureusement, l'examen direct de l'échantillon est une étape trop souvent négligée lors des examens de routine.

### *Recherche d'antigènes spécifiques de* Campylobacter *dans les selles*

Plusieurs trousses de détection d'antigènes spécifiques de *Campylobacter* dans les selles ont été récemment mises sur le marché. Deux mettent en œuvre une réaction immuno-enzymatique par ELISA en plaque de 96 puits (Premier Campy, Meridian et Ridascreen Campylobacter, R-Biopharm), peu pratique si on reçoit moins de 96 selles

par jour. Un test unitaire immunochromatographique (immunoCard Stat ! Campy, Méridian) répond mieux à un volume moindre d'examens. Ces tests pourraient s'inscrire dans une stratégie de dépistage des selles pour lesquelles la recherche de *Campylobacter* par culture ne serait effectuée qu'en cas de positivité, mais leur prix encore élevé limite leur utilisation.

## Milieux de culture

Rappelons que les *Campylobacter* sont microaérophiles, chimio-organotrophes, utilisant les acides aminés et les acides organiques comme source de carbone mais jamais les sucres. Ils possèdent tous une oxydase, mais la catalase est variable selon les espèces.

L'échantillon de selles doit être mis en culture sur des milieux contenant du sang (Skirrow, Butzler, Blaser, Campylosel, Preston) ou du charbon (Karmali, mCCD, CAT) et rendus sélectifs par l'addition d'antibiotiques inhibant la croissance des autres bactéries. En général, deux à trois antibiotiques parmi les suivants sont utilisés : triméthoprime, polymyxine, vancomycine, colistine, bacitracine, amphotéricine B, céfalotine, céfopérazone, rifampicine, actidione. Des milieux prêts à l'emploi sont commercialisés (Campylosel®). Des milieux non sélectifs peuvent être utilisés, à condition de filtrer au préalable l'échantillon de selles sur une membrane à pores de 0,65 µm qui retient la plupart des bactéries, mais qui laisse passer les *Campylobacter* en raison de leur petite taille et de leur mobilité. La combinaison de ces deux techniques, filtration et sélection, augmente la sensibilité de l'isolement.

Les milieux sont incubés au moins 48 heures en atmosphère microaérobie, de préférence à 37 °C pour ne pas inhiber la croissance des espèces thermosensibles (bien que la majorité des souches de *Campylobacter* entéropathogènes soient thermorésistantes et croissent à 41°C). L'atmosphère microaérobie est obtenue en jarre étanche à l'aide de générateurs chimiques de gaz exempts d'hydrogène et consommant une partie de l'oxygène de l'enceinte (Campygen®, Oxoid). Une incubation prolongée de 5 à 8 jours est parfois nécessaire.

**TABLEAU 35-1-2**

**Caractères d'identification des différentes espèces de *Campylobacter*.**

| | Cat. | Croissance | | Ind. | Uré ase | Hip. | Céf. | Nal. | Nit. | $H_2S$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 25 °C | 42 °C | acét. | | | | | | TSI |
| *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* | + | – | + | + | – | + | R | S* | + | – |
| *Campylobacter jejuni* subsp.*doylei* | +f/– | – | – | v | – | v | S | S | – | – |
| *Campylobacter coli* | + | – | + | + | – | – | R | S | + | +f |
| *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* | + | + | – | – | – | – | S | R | + | – |
| *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* | + | + | – | – | – | – | S | R | + | – |
| *Campylobacter sputorum* bv. *sputorum* | – | – | + | – | – | – | S | S | + | + |
| *C. sputorum* bv. *paraureolyticus* | – | – | + | – | + | – | S | S | + | + |
| *C. sputorum* bv. *fecalis* | + | – | + | – | – | – | S | S | v | + |
| *Campylobacter mucosalis* | – | – | + | – | – | – | S | R | + | + |
| *Campylobacter concisus* | – | – | + | – | – | – | R | R | + | + |
| *Campylobacter lari* | + | – | + | – | v | – | R | R | + | – |
| *Campylobacter rectus* | – | – | + | + | – | – | nd | S | + | + |
| *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* | + | – | + | – | – | – | S | R | + | + |
| *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* | + | – | + | – | – | – | S | R | + | + |
| *Campylobacter curvus* | – | – | + | + | – | – | nd | S | + | + |
| *Campylobacter upsaliensis* | +f | – | + | + | – | – | S | S | + | – |
| *Campylobacter showae* | + | – | v | v | – | – | S | S | + | v |
| *Campylobacter helveticus* | – | – | + | + | – | – | S | S | + | – |
| *Camplylobacter lanienae* | + | – | + | – | – | – | nd | R | + | – |
| *Campylobacter gracilis* | – | – | + | + | – | – | nd | v | + | – |

* 30 % des souches sont résistantes à l'acide nalidixique.
Cat : catalase ; Ind. acét. : indoxyl acétate estérase ; Hip. : hippurate ; Céf. : céfalotine ; Nal. : acide nalidixique ; Nit. ; nitrite réductase ; $H_2S$ TSI : production d'$H_2S$ en milieu TSI ; S : sensible ; R : résistant ; v : variable ; nd : non déterminé ; f : faible.

## Diagnostic d'espèce

L'identification au niveau du genre *Campylobacter* repose sur les exigences culturales, la microaérobiose, la morphologie incurvée, la coloration Gram négatif et la présence d'une oxydase.

L'identification au niveau de l'espèce nécessite des tests complémentaires. Des tests phénotypiques fondés sur la température de croissance et la sensibilité à l'acide nalidixique et à la céfalotine ont été proposés depuis longtemps pour l'identification des principales espèces d'intérêt médical (tableau 35.1.2), mais le faible pouvoir discriminant des tests basés sur la température de croissance et les perturbations des tests de sensibilité aux antibiotiques du fait de l'acquisition de plus en plus fréquente des résistances à ces antibiotiques rendent désormais peu fiables ces marqueurs diagnostiques.

En pratique occasionnelle d'isolement de *Campylobacter*, les conditions de température de croissance sont difficiles à apprécier, et la sensibilité à l'acide nalidixique qui devrait permettre la distinction entre *C. fetus* (naturellement résistant) et *C. jejuni* et *C. coli* (naturellement sensibles) est fortement perturbée par la fréquence élevée de la résistance aux quinolones de ces espèces (40 %).

La recherche d'une activité catalasique est facile à réaliser. Encore largement répandue et peu chère, elle permet de distinguer deux groupes de *Campylobacter* :

- les *Campylobacter* catalase positive (*C. jejuni, C. lari, C. coli, C. fetus, C. hyointestinalis* et *C. upsaliensis*) ;
- les *Campylobacter* très sensibles à l'oxygène qui sont catalase négative (*C. sputorum, C. mucosalis, C. concisus, C. rectus* et *C. curvus*). Mais les membres de ce groupe sont très rarement isolés en pratique médicale humaine.

*C. coli* ne se distingue de *C. jejuni* que par son inaptitude à hydrolyser l'hippurate. La détection de l'hydrolyse de l'hippurate par la méthode de Harvey (encadré 35.1.1) nécessite l'utilisation de substrats de préparation récente (particulièrement la ninhydrine) et une culture abondante qui oblige souvent à subcultiver l'isolement. De plus, des réactions faussement négatives et des souches de *C. jejuni* hippurate négatives ont été décrites.

La galerie d'identification commercialisée (Api Campy®, Biomérieux) utilise elle aussi des tests phénotypiques. Elle regroupe des tests biochimiques, la détection de la sensibilité à l'acide nalidixique et à la céfalotine, la détection de l'hydrolyse de l'hippurate. Elle est donc soumise aux mêmes restrictions que les tests qui la constituent. Bien que facile d'utilisation, sa base de données ne répertorie pas toutes les espèces et certaines espèces sont mal identifiées. Le diagnostic d'espèce est donc souvent retardé et parfois douteux.

En pratique quotidienne, le diagnostic de genre, reposant sur les exigences culturales (microaérophilie et milieux sélectifs), la morphologie au Gram et l'oxydase, est facilement posé. La présence d'une activité catalasique permet d'éliminer quelques espèces exceptionnellement isolées en pratique médicale humaine. La recherche de la sensibilité à l'acide nalidixique et à la céfalotine ne pourra être interprétée avec fiabilité qu'en cas de sensibilité à l'acide nalidixique. Une franche hydrolyse de l'hippurate permet l'identification de *C. jejuni* qui est l'espèce la plus souvent isolée. Dans les autres cas, les méthodes phénotypiques sont faiblement discriminantes et les techniques génétiques, bien que chères et encore peu diffusées, permettent un diagnostic d'espèce rapide et fiable.

Des méthodes génétiques utilisant les techniques d'hybridation à l'aide de sondes nucléotidiques spécifiques d'espèce ou des techniques d'amplification génique à l'aide d'amorces spécifiques d'espèces ont été développées. Les plus récentes utilisent la PCR temps réel ou le séquençage de l'ADNr16S. Aucune technique ne permet jusqu'à maintenant de distinguer les trois espèces les plus fréquentes (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus*) en une seule étape. Le séquençage de l'ADNr16S distingue bien les différentes espèces de *Campylobacter*, à l'exception de *C. jejuni* et *C. coli* qui ont la même séquence. Les techniques de PCR et PCR temps réel distinguent bien *C. jejuni* de *C. coli*, mais nécessitent souvent une autre réaction pour identifier *C. fetus*.

**ENCADRÉ 35.1.1**

### Hydrolyse de l'hippurate par la méthode de Harvey

**Substrat**

Hippurate de Na : 1 g
Tampon phosphate : 100 ml
Pour le tampon :
– 73,2 ml d'une solution à 9,07 g/l de $KH_2PO_4$
– 26,8 ml d'une solution à 11,87 g/l de $Na_2HPO_4$
Filtrer sur membrane 0,45 µ
Répartir à raison de 0,5 ml dans les tubes à hémolyse

**Exécution de la réaction**

Faire une suspension bactérienne laiteuse dans le substrat
Incuber à 37 °C pendant 2 h
Ajouter 0,2 ml d'une solution à 3,5 % de ninhydrine dans l'acétone/butanol 1 : 1
Incuber 10 minutes à 37 °C : si apparition d'une couleur violette, la réaction est positive

## Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est toujours indiqué en raison de la fréquence élevée de la résistance aux antibiotiques utilisés. On testera en priorité les fluoroquinolones (ciprofloxacine), macrolides (érythromycine), aminosides (gentamicine) et β-lactamines (ampicilline et amoxicilline/acide clavulanique). La réalisation technique et l'interprétation de l'antibiogramme de *Campylobacter* suivent les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). À partir d'une culture de 18 à 24 heures sur milieux d'isolement, un inoculum standardisé à 0,5 McFarland ($10^8$ UFC/ml)

est préparé en bouillon *Brucella* ou en solution saline (0,9 % NaCl), dilué au 1/100e et ensemencé par écouvillonnage ou par inondation sur une gélose de Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton ou de cheval. La lecture des diamètres d'inhibition est réalisée après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C en atmosphère microaérobie. Les fréquences de résistances sont de 5 % pour les macrolides, 10 % pour la tétracycline, 40 % pour les fluoroquinolones et 41 % pour l'ampicilline.

Les infections systémiques à *C. fetus* peuvent être traitées par une association de gentamicine (aucune résistance décrite) avec une β-lactamine (14 % de résistance à l'ampicilline) ou un macrolide (1,5 % de résistance à l'érythromycine). *C. fetus* est naturellement résistant aux quinolones.

### Diagnostic sérologique

La sérologie n'a pas d'intérêt dans les épisodes diarrhéiques aigus, pour lesquels l'isolement à partir des selles doit être privilégié. Lors des complications postinfectieuses observées au décours des infections intestinales, comme l'arthrite réactionnelle et le syndrome de Guillain-Barré, la sérologie permet un diagnostic rétrospectif d'infection à *Campylobacter* et apporte un élément étiologique. La réaction de fixation du complément est la plus pratiquée ; elle utilise des antigènes obtenus par extraction alcaline à partir des trois espèces *C. coli, C. jejuni* et *C. fetus*.

Une méthode ELISA utilisant comme antigène un extrait acide permet la recherche différentielle des IgG, A et M. Seule la réaction de fixation du complément est inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale (B 60). Les réactifs pour l'effectuer sont fabriqués par Virion et distribués par AES. La réaction de fixation du complément semble être un test robuste et adapté aux rares indications de diagnostic sérologique des infections à *Campylobacter*.

L'infection à *Campylobacter* n'est pas une infection à déclaration obligatoire. Elle fait l'objet actuellement d'une surveillance par l'Institut national de veille sanitaire (InVS) et est au centre des préoccupations de l'Agence française pour la sécurité sanitaire des aliments (Afssa).

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Communiqué du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie sur le site www.sfm.asso.fr/.

Euzéby JP. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/campylobacter.html.

Fauchère JL. Campylobacter. In : Courvalin P, Leclerc R, Bingen E. L'Antibiogramme. 2e éd. Paris : ESKA; (2006).

Rapport de l'Afssa sur l'appréciation des risques alimentaires liés aux campylobacters, application au couple poulet/*Campylobacter jejuni* www.afssa.fr/Ftp/afssa/22208-I.pdf.

**Site du Centre national de référence des Campylobacters et Hélicobacters** (Pr Francis Mégraud) : www.cnrch.u-bordeaux2.fr/.


## Chapitre 35.2

# *Helicobacter pylori*

C. Burucoa

### Introduction

Les *Helicobacter* sont des bacilles à Gram négatif de forme spiralée de 0,5 à 1 µm sur 2 à 4 µm (fig. 35.2.1). Si la présence de bactéries spiralées dans l'estomac avait été rapportée dès le XIXe siècle, *H. pylori* n'a été cultivé pour la première fois qu'en 1982 par Marshal et Warren. Cette découverte a valu en 2005 le prix Nobel de médecine à ces deux chercheurs australiens.

*Helicobacter pylori* colonise l'estomac de la moitié de l'humanité. Il est responsable de nombreuses pathologies gastroduodénales de la gastrite chronique aux ulcères gastriques et duodénaux jusqu'au cancer gastrique et au lymphome du MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*).

L'éradication de la bactérie de la muqueuse gastrique entraîne la guérison de la gastrite, des ulcères et de certains lymphomes du MALT, empêche les rechutes et prévient l'évolution vers le cancer gastrique.

La fréquence élevée des résistances aux antibiotiques (>20 % pour la clarithromycine) impose la détermination de la sensibilité aux antibiotiques avant la mise en route d'un traitement. L'isolement, la culture et l'antibiogramme d'*H. pylori* sont nécessaires pour répondre à cette indication. La PCR temps réel apporte une alternative intéressante à la culture.

Le genre *Helicobacter* appartient à la subdivision ε des *Proteobacteria*, ordre des *Campylobacterales*, famille des *Helicobacteraceae*. Cette famille comprend aussi les genres *Wolinella, Flexispira, Sulforimonas, Thiomicrospora* et *Thiovolum*. Les espèces du genre *Helicobacter* sont toutes microaérophiles et, dans la plupart des cas, catalase et oxydase positives. À ce jour, le genre *Helicobacter*

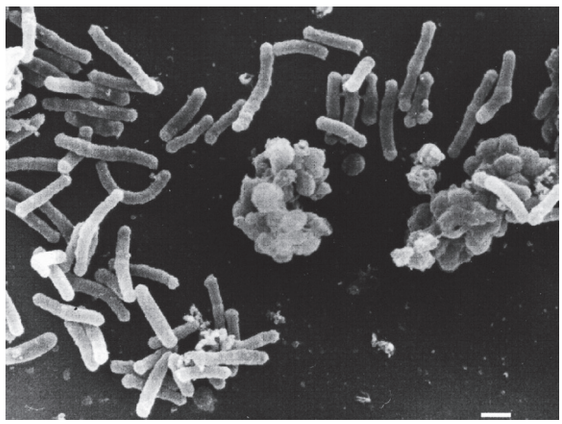


**Fig. 35.2.1.** – *Vue en microscopie électronique de formes bacillaires et coccoïdes d'*Helicobacter pylori.
*Cliché : N. Quellard, B. Fernandez, service de microscopie électronique du CHU de Poitiers.*

regroupe plus de 20 espèces reconnues, avec de nombreuses espèces en attente de reconnaissance. Elles colonisent la muqueuse digestive de l'homme ou d'animaux (tableau 35.2.1).

## Habitat et pouvoir pathogène

L'homme est le réservoir exclusif d'*H. pylori* et les rares animaux chez qui *H. pylori* a pu être isolé sont des animaux vivant proches de l'homme et vraisemblablement contaminés à son contact (porcs, cafards, moutons, singes en captivité). La transmission est strictement interhumaine, précoce dans l'enfance et intrafamiliale.

L'estomac de l'homme est le seul site où *H. pylori* peut être isolé sous forme cultivable. La voie de transmission d'*H. pylori* d'un hôte infecté à un nouvel hôte est encore une énigme. Trois voies de transmission sont suspectées : gastro-orale, oro-orale et féco-orale. La possibilité d'une transmission féco-orale faisant intervenir la forme coccoïde, présente en grand nombre dans les selles de

**TABLEAU 35-2-1**

**Les différents *Helicobacter* et leurs hôtes.**

| *Espèce* | *Hôte naturel* | *Hôte occasionnel* |
|---|---|---|
| ***Helicobacter* gastriques** | | |
| *H. acinonychis* | Guépard | |
| *H. bizzozeroni* | Chien | |
| *H. bovis* | Bovins | |
| *H. felis* | Chat, chien | |
| *H. heilmannii* | Homme, primates, chien, chat, porc | |
| *H. suis* | Cochon | |
| *H. mustelae* | Furet | |
| *H. nemestrinae* | Macaque | |
| *H. pylori* | Homme | Primates |
| *H. salomonis* | Chien | |
| *H. suncus* | Musaraigne | |
| ***Helicobacter* entérohépatiques** | | |
| *H. bilis* | Chien, souris | Homme |
| *H. canis* | Chien | Homme |
| *H. cinaedi* | Hamster | Homme |
| *H. cholecystus* | Hamster | |
| *H. fennelliae* | Hamster | Homme |
| *H. hepaticus* | Souris | |
| *H. muradirum* | Souris, rat | |
| *H. canadensis* | Oiseaux | |
| *H. rodentum* | Souris | |
| *H. trogontum* | Rat | |
| *H. typhlonicus* | Souris | |
| *H. rappini* | Chien, mouton | Homme |

patients infectés et pouvant contaminer l'environnement, est encore fortement discutée.

Dans les pays industrialisés, la prévalence s'élève progressivement avec l'âge. Le taux d'infection est de 5 à 10 % chez l'enfant et atteint 20 à 50 % chez l'adulte.

L'infection à *H. pylori* provoque constamment une gastrite, le plus souvent asymptomatique, qui persiste toute la vie de l'hôte en l'absence de traitement d'éradication. Elle peut évoluer vers des pathologies plus sévères comme les ulcères gastriques ou duodénaux dans 10 % des cas, le cancer gastrique dans 1 % des cas ou, beaucoup plus rarement, le lymphome du MALT.

*H. pylori* est la seule bactérie responsable d'un cancer chez l'homme. L'adénocarcinome gastrique est le deuxième cancer digestif en France, avec 9000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année.

L'évolution de la gastrite vers des pathologies sévères répond à des interactions complexes entre les facteurs de virulence bactériens, des facteurs génétiques de susceptibilité individuelle de l'hôte infecté, la localisation de l'infection dans l'estomac et des facteurs environnementaux essentiellement représentés par des pratiques alimentaires (fig. 35.2.2).

L'ensemble des souches cliniques d'*H. pylori* exprime des facteurs de colonisation qui lui permettent de survivre à l'acidité gastrique (uréase), de se mouvoir dans le mucus (flagelles), d'adhérer aux cellules de l'épithélium gastrique (adhésines), d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et de persister de manière chronique (leurres antigéniques, plasticité génomique). Une partie seulement des souches isolées exprime des facteurs de pathogénicité responsables de lésions plus importantes en altérant l'intégrité de la muqueuse (cytotoxine vacuolisante, VacA) ou en déclenchant puis modulant la nature de la réponse inflammatoire (îlot de pathogénicité *cag*, CagA). Les facteurs liés à l'hôte avaient été fortement suspectés par l'observation de familles gravement atteintes par le cancer gastrique. Le support génétique de cette susceptibilité

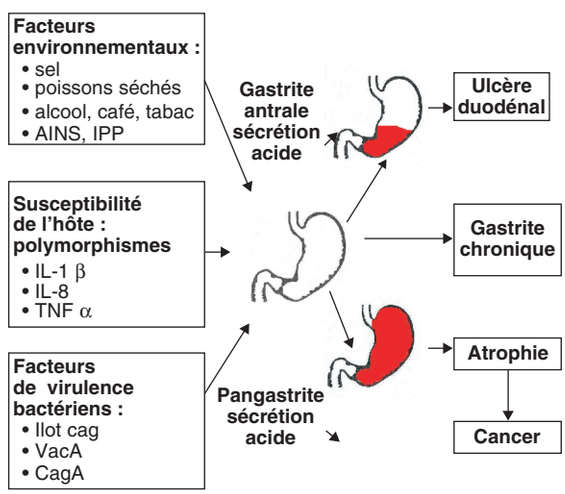



**Fig. 35.2.2.** – *Déterminisme pathologique de l'infection à* Helicobacter pylori.

serait représenté par certains polymorphismes de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire : gène de l'IL-8, de l'IL-1β et du TNFα.

Les sujets chez qui la sécrétion acide est augmentée développent une gastrite antrale qui pourra conduire à un ulcère duodénal. Les sujets chez qui la sécrétion acide est diminuée développent une pangastrite qui peut évoluer vers une atrophie de la muqueuse, favorisant l'apparition de métaplasies puis de dysplasies pour aboutir à un cancer gastrique.

La grande majorité des *Helicobacter* autres que *pylori* infectent différentes espèces animales et rarement l'homme. Leur pouvoir pathogène est encore controversé.

Parmi les *Helicobacter* gastriques autres que *pylori*, seul *H. helmannii* peut infecter l'homme. C'est l'hôte habituel du chien, du chat, du porc et des primates. Cette zoonose atteint l'homme de façon accidentelle. La prévalence de l'infection humaine à *H. helmannii* est très faible, de l'ordre de 0,5 %.

## Diagnostic direct

Les méthodes permettant de faire le diagnostic d'une infection à *H. pylori* sont nombreuses et peuvent être regroupées en deux types :

- invasives, nécessitant une biopsie de la muqueuse gastrique au cours d'un examen fibroscopique : examen anatomopathologique, culture, détection de séquences d'ADN spécifique par PCR, recherche d'une activité uréasique ;
- non invasives : test respiratoire à l'urée marquée, détection d'antigènes dans les selles, sérologie.

Les performances de ces techniques sont diverses et nécessitent une stratégie diagnostique associant plusieurs d'entre elles pour obtenir une sensibilité optimale (tableau 35.2.2). Certaines de ces techniques n'apportent que la notion de la présence ou non d'une infection à *H. pylori* (sérologie standard, antigènes dans les selles, test respiratoire, activité uréasique rapide). D'autres offrent la possibilité d'apprécier les conséquences de l'infection sur la muqueuse gastrique (anatomopathologie), d'établir l'antibiogramme et le typage de la souche infectante (culture), de rechercher certains gènes de résistance (culture, PCR sur biopsie). Le choix des techniques à mettre en œuvre sera fonction de l'étendue nécessaire des résultats recherchés et de la possibilité ou non de réaliser une endoscopie.

### *Méthodes invasives*

L'avantage des méthodes invasives est de pouvoir associer les techniques diagnostiques les plus sensibles, les plus spécifiques et les plus contributives avec l'observation endoscopique des lésions qui permet d'identifier les lésions gastriques et d'évaluer leur étendue. Leur inconvénient majeur est de nécessiter le recours à une endoscopie digestive haute. Cette technique est maintenant facilement accessible et peu dangereuse mais reste relativement coûteuse.

**TABLEAU 35-2-2**

**Méthodes diagnostiques de l'infection à *Helicobacter pylori*.**

| *Méthodes diagnostiques* | *Sensibilité* | *Indications* | *Contribution* |
|---|---|---|---|
| Invasives (biopsies) | | Celles de l'endoscopie | |
| Anatomopathologie | >95 % | Systématique si biopsie | Bien si pathologiste expert atrophie, cancer, lymphome |
| Culture | >95 % | À associer à anatomopathologie nécessaire car résistances | Permet antibiogramme délicat (12 jours) |
| PCR | >95 % | Complément de la culture | Rapide (4 heures) détection Résistance clarithromycine |
| Uréase | 80 % | Au lit du patient | Rapide (1 heure), à confirmer |
| Non invasives | | | Résultat : + ou – |
| Test respiratoire | >95 % | *Test and treat* et contrôle d'éradication | Équipement coûteux |
| Ag dans les selles | >90 % | | Simple, rapide (1 heure) |
| Sérologie | 80–90 % | Études épidémiologiques | Persistance des anticorps |

Les indications de la fibroscopie sont bien codifiées et reconnues pour les maladies dont le diagnostic formel est porté par l'endoscopie : la maladie ulcéreuse gastroduodénale, le lymphome du MALT et certaines gastrites ou gastropathies rares. L'éradication préventive de l'infection à *H. pylori* chez les patients présentant des antécédents familiaux de cancer gastrique est maintenant recommandée par le consensus européen d'experts. Dans ce cas, le recours à l'endoscopie se justifie pour établir un statut précis des lésions de gastrite précancéreuse.

## Test à l'uréase

Son principe repose sur la forte activité uréasique d'*H. pylori* qui hydrolyse l'urée en ammoniaque. L'ammoniaque libérée accroît le pH du milieu de réaction et fait virer de couleur l'indicateur de pH. Les tests sur gélose (CLO-test®) ou sur membrane (Pyloritek®) sont les plus pratiques d'emploi. La lecture est effectuée après un délai d'une heure pendant lequel le kit doit être maintenu à 37 °C pour augmenter la sensibilité du test. Ce test a une sensibilité moyenne de plus de 80 % et une spécificité de 95 %. La lecture précoce à 20 minutes, qui correspond plus à l'emploi pratique d'un test rapide, diminue la sensibilité et ne peut de ce fait être recommandée. La lecture à 24 heures est aussi à proscrire en raison de l'activité uréasique d'autres bactéries qui peuvent être présentes chez les malades hypo- ou achlorhydriques (*Proteus*). Ce test n'est pas actuellement remboursé par la Sécurité sociale ; il n'est pas facturé au patient et est donc à la charge de l'établissement. En pratique, ce test est contributif en cas de positivité précoce car il permet en salle d'endoscopie de conclure à la présence d'*H. pylori* et de mettre en route aussitôt un traitement d'éradication.

## Examen anatomopathologique

Il s'agit du moyen de détection le plus répandu. La sensibilité et la spécificité de cet examen sont supérieures à 95 %. Ces chiffres ne sont cependant obtenus qu'avec une standardisation rigoureuse de la méthode et une analyse par un anatomopathologiste expérimenté. La méthode doit comporter une fixation des biopsies dans le formol et adopter des colorations facilitant la reconnaissance de la bactérie au microscope (Giemsa modifié ou crésyl violet). En effet, la coloration habituelle à l'hémalun-éosine utilisée pour le diagnostic lésionnel visualise mal les bactéries. Cette méthode permet l'examen de la gastrite constamment associée à *H. pylori* et la recherche de complications telles que l'atrophie, la métaplasie intestinale avec dysplasie, le lymphome ou le cancer. La réalisation de biopsies multiples (au moins deux) dans l'antre et dans le corps (fundus) augmente la sensibilité.

Cette méthode a l'avantage d'être inscrite dans les habitudes des gastro-entérologues, d'être accessible et de nécessiter des conditions de transport extrêmement simples, puisque les biopsies plongées dans le formol peuvent être conservées à température ambiante lors de l'acheminement au laboratoire d'anatomopathologie. Sa sensibilité élevée en fait l'examen de référence pour le diagnostic invasif de l'infection, le couple histologie–culture étant toujours considéré comme le « gold standard ».

## Culture

La culture est la méthode diagnostique la plus spécifique. L'intérêt principal de la culture est la détermination de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques.

### *Prélèvement*

Deux biopsies, antrale et fundique, sont recommandées pour obtenir la meilleure sensibilité.

### *Milieux de transport*

*H. pylori* est très sensible à la dessiccation. Les biopsies gastriques doivent être acheminées rapidement au

laboratoire dans un récipient stérile contenant 0,5 ml de bouillon thioglycolate ou de sérum physiologique stérile et ensemencées dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Si le transport au laboratoire est prolongé plusieurs heures, un milieu de transport doit être utilisé et transporté à 4 °C. Plusieurs milieux de transports sont recommandés : bouillon Brucelle avec 20 % de glycérol, milieu de transport de Stuart (Oxoid), Portagerm® pylori (bioMérieux). Si le délai de transport dépasse 24 heures, la biopsie doit être acheminée congelée dans un tube sec. L'utilisation d'un container d'azote liquide est assez pratique entre l'unité de fibroscopie et le laboratoire.

Ces contraintes de transport sont un obstacle à la diffusion de la culture en pratique courante. Néanmoins, la mise en place d'un protocole de prélèvement et de transport des biopsies avec les gastro-entérologues est facilement réalisable.

### Broyage des biopsies

Les biopsies doivent être broyées à l'aide d'un pilon à usage unique adapté aux microtubes, ou bien dilacérées au scalpel dans une boîte de Petri stérile.

### Examen direct

Le produit de broyage est étalé en frottis sur une lame de microscope et coloré par la méthode de Gram. On peut également réaliser une empreinte par écrasement d'un fragment biopsique sur la lame. Il est préférable d'utiliser plutôt de la fuscine comme contre-colorant lors de la coloration de Gram que la safranine habituelle. *H. pylori* apparaît comme une bactérie incurvée, spiralée, à Gram négatif.

*H. pylori* existe sous deux formes. Une forme bacillaire, spiralée, longue de 2 à 4 µm et large de 0,5 à 1 µm que l'on ne retrouve naturellement que dans l'estomac des malades infectés. C'est une forme cultivable, mobile par 5 à 7 flagelles polaires et engainés. Elle est caractérisée par sa forme en hélice qui a déterminé l'appellation du genre *Helicobacter*. C'est celle que l'on observe à l'examen direct des biopsies gastriques et des cultures. Elle est Gram négative.

Si l'on soumet les formes spiralées d'*Helicobacter* à des conditions de stress comme l'épuisement des ressources nutritives lors d'une culture prolongée, une atmosphère aérobie ou anaérobie pour cette bactérie microaérophile, la présence d'antibiotiques ou une température basse, la morphologie des bactéries se transforme. On observe tout d'abord des formes en U puis des formes en anneau pour aboutir à des formes rondes dites coccoïdes (fig. 35.2.1).

Les formes coccoïdes sont aussi observées in vivo. On retrouve des formes coccoïdes dans l'estomac au niveau des lésions de la muqueuse, mais aussi dans la bouche, la plaque dentaire, l'intestin et les selles de patients infectés.

Les bactéries sont parfois regroupées en banc de poisson. La lecture de la lame à fort grossissement en immersion doit être suffisamment prolongée pour conclure à la négativité de l'examen direct ; 30 à 50 champs doivent être observés.

Dans notre expérience, 75 % des examens directs de biopsies qui seront positives en culture permettent d'observer des bacilles incurvés Gram négatif.

### Ensemencement

Le produit de broyage ou de dilacération est ensemencé en séparation sur milieu constitué d'une base gélosée (milieu *Brucella*, cœur-cervelle, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton) additionnée de 10 % de sang de cheval ou de mouton ou de sérum de veau fœtal. La base Columbia additionnée de 10 % de sang de mouton convient à la plupart des souches. Les milieux commercialisés conviennent également.

Des mélanges sélectifs peuvent être utilisés pour inhiber la croissance des contaminants occasionnels. Le mélange de Skirrow utilisé pour l'isolement sélectif de *Campylobacter* est adapté à l'isolement sélectif d'*H. pylori*. Il comprend de la vancomycine (10 mg/l), du triméthoprime (5 mg/l), de l'amphotéricine B (2 mg/l) et de la polymyxine (2500 UI/l). Nous conseillons de ne pas utiliser de gélose fraîchement préparée. Un vieillissement de 2 à 7 jours à 4 °C améliore la sensibilité de la culture.

### Incubation

Les géloses sont incubées à 37 °C sous atmosphère humide et microaérobie, c'est-à-dire appauvrie en oxygène (5 %). Cette atmosphère est obtenue dans une jarre étanche à l'aide de sachets générateurs d'atmosphère microaérobie (Campygen®, Oxoid). En subculture, de nombreuses souches poussent en atmosphère enrichie en $CO_2$ à 10 %.

### Isolement

En primoculture, les colonies apparaissent en 3 à 12 jours. Elles sont petites, ronde et luisantes. En subculture, la croissance est plus rapide, en 2 à 4 jours. Les primocultures doivent être incubées jusqu'à 12 jours et examinées tous les 2 jours à partir du 3e jour. Nous conseillons de ne pas attendre d'avoir de grosses colonies pour repiquer les cultures. La transformation en forme coccoïde peut être rapide et diminue fortement la cultivabilité de la souche ; ne pas attendre plus de 2 à 3 jours après l'apparition des colonies. Un réétalement sur la boîte d'isolement dès l'apparition des premières colonies permet une première amplification des souches, à condition que la zone de réétalement ne contienne pas de contaminant. La subculture à partir de colonies isolées est très difficile à obtenir, bien plus qu'à partir de l'ensemble des colonies récoltées à l'écouvillon et déchargé dans 100 µl de bouillon *Brucella*. Néanmoins, l'obtention de clones purs à partir de colonies isolées a un intérêt puisque l'infection par plusieurs souches d'*H. pylori* est possible (10 % des cas) et, surtout, le mélange de clones résistants et sensibles aux antibiotiques de la même souche est également observé dans 10 % des cas.

L'isolement d'*H. pylori* est donc délicat. La positivité des autres techniques mises en œuvre (uréase, examen direct, PCR, histologie, etc.) motivera la prolongation de l'incubation et surtout l'acharnement à obtenir la subculture des quelques colonies qui émergent sur la boîte d'isolement.

Le délai de réponse est de 3 à 12 jours en fonction des caractéristiques de la souche. La sensibilité de la culture dépend des performances du laboratoire et des conditions de transport. Elle est d'au moins 95 % si l'on prend pour référence le test respiratoire ou la sérologie.

### *Identification bactériologique*

L'identification du genre et de l'espèce *H. pylori* ne pose pas de problème. Les exigences culturales (microaérophilie, gélose au sang, milieu sélectif), l'aspect spiralé à l'observation microscopique après coloration de Gram d'une colonie étalée sur une lame permettent d'identifier *Helicobacter*. La présence d'une activité catalasique, oxydasique et uréasique forte permet l'identification de l'espèce *pylori*. Les *Helicobacter* non *pylori* ne cultivent pas dans les conditions décrites. Seul *H. helmannii* peut infecter l'estomac humain, mais sa morphologie à l'examen direct est caractéristique.

### *Test à l'uréase au laboratoire*

Si l'activité uréasique n'a pas été recherchée au lit du malade, une partie du produit de broyage peut être mise en suspension dans 100 µl de milieu urée indole et placée à 37 °C. Le virage colorimétrique observé dans les heures qui suivent l'ensemencement permet de suspecter la présence d'*H. pylori*. Dans notre expérience, la sensibilité de ce test est faible, puisque 68 % des biopsies pour lesquelles la culture sera positive présentent une activité uréasique. Les faux positifs sont extrêmement peu nombreux, de l'ordre de 1,5 %, même quand l'incubation est prolongée jusqu'au lendemain. Ce test rapide a l'avantage au laboratoire de motiver, quand il est positif, un réexamen soigneux de l'examen direct initialement jugé négatif.

### *Congélation, envoi de souches*

*H. pylori* peut être conservé plusieurs années à –80 °C en bouillon *Brucella* supplémenté de 20 % de glycérol. Il est conseillé de congeler des cultures de moins de 48 heures contenant moins de 10 % de formes coccoïdes.

On peut éviter l'envoi de souche en Carboglace™ en coulant dans un tube à vis de 5 ml une gélose Columbia pauvre en agarose (5 g/l) et supplémentée de 10 % de sang de mouton dans laquelle on plonge et on casse l'extrémité d'un écouvillon stérile fortement chargé d'une culture de moins de 48 heures contenant moins de 10 % de formes coccoïdes. Un tel milieu de transport permet la conservation d'une souche à température ambiante pendant 2 à 3 jours.

## Détection par amplification génique (PCR) de séquences d'ADN spécifiques d'*H. pylori*

La difficulté, le manque de sensibilité et le long délai de réponse de la culture ont motivé la mise au point de techniques génétiques rapides et spécifiques par PCR et maintenant par PCR temps réel. L'extraction de l'ADN à partir d'une biopsie gastrique est possible à l'aide de kits commercialisés voire d'extracteurs automatiques après une lyse par la protéinase K. De nombreuses amorces ont été proposées ; celles qui apportent une sensibilité et une spécificité maximales sont celles qui permettent d'amplifier des fragments des gènes *glmM* codant la phosphoglucosamine mutase, *ureA* codant la sous-unité A de l'uréase, 26-kDa SSA et l'ARNr16S. L'utilisation d'une sonde d'hybridation pour révéler le fragment amplifié, soit par *Southern-blot*, soit maintenant par PCR temps réel, augmente la spécificité de la détection. Les performances en sensibilité sont très variables d'une technique à l'autre et selon la cible amplifiée, mais semblent supérieures à celle de la culture. La PCR a l'énorme avantage d'apporter un résultat bien plus rapide que la culture (2 à 24 heures). Elle est le plus souvent couplée à la détection des mutations conférant la résistance à la clarithromycine. Son automatisation à l'aide d'appareils qui réalisent extraction d'ADN et PCR temps réel représente une future étape vers sa diffusion large.

Cet examen n'est pas encore rentré dans la pratique courante. La disponibilité de ces tests est encore très limitée. Les premières trousses sont commercialisées, mais la tarification de ces techniques de PCR ou de PCR temps réel reste en BHN, rendant impossible le remboursement et donc la diffusion de ces techniques. Il s'agit pourtant de techniques d'avenir qui permettent le diagnostic de l'infection avec des conditions de prélèvement ou de transport moins contraignants que pour la culture.

## *Méthodes non invasives*

Ces tests ne nécessitent pas la pratique d'une gastroscopie.

### Test respiratoire à l'urée marquée

Il s'agit d'un test global évaluant la présence de la bactérie quelle que soit sa situation dans la cavité gastrique. Sa sensibilité dépasse 90 %. Ce test est fondé sur l'activité uréasique de la bactérie. Il détecte la production de $CO_2$ marqué au carbone 13 à partir d'urée $_{13}C$ ingérée par le sujet. L'isotope $_{13}C$ du carbone n'est pas radioactif et peut être délivré sans précaution particulière. Le test doit être réalisé avant tout traitement ou 4 semaines après la fin du traitement. Le $_{13}CO_2$ est détecté dans l'air expiré juste avant et 30 minutes après l'ingestion de l'urée. Ce test nécessite que les malades soient à jeun pour ingérer, 5 minutes avant, l'urée marquée d'une solution d'acide citrique afin de retarder la vidange gastrique. Le prélèvement peut être adressé au laboratoire sans condition

particulière de transport. La concentration de $_{13}CO_2$ dans l'air expiré est mesurée au laboratoire par un chromatographe en phase gazeuse et un spectromètre de masse. Cet appareillage coûteux et sophistiqué n'est disponible actuellement que dans quelques centres spécialisés. Cependant, cette mesure peut être désormais effectuée par spectrométrie à infrarouge, plus simple d'emploi et moins coûteuse.

La prise d'inhibiteur de la pompe à protons perturbe fortement les résultats de cette technique.

### Détection des antigènes dans les selles

Ces tests détectent la présence d'antigènes d'*H. pylori* dans les selles par une technique ELISA ou immunochromatographique. Trois tests sont commercialisés : deux utilisent des anticorps monoclonaux (ImmunoCard STAT ! HpSA®, Meridian Bioscience, et FemtoLab HpSTAR®, Dako Cytomation), un des anticorps polyclonaux (Premier Platinum HpSA®, Meridian Bioscience). Les meilleures performances sont obtenues avec les tests utilisant des anticorps monoclonaux. Le plus pratique en utilisation clinique est le test immunochromatographique conditionné en tests unitaires et réalisé en 5 minutes.

La sensibilité et la spécificité de ce test sont presque égales au test respiratoire. Le test peut servir tant au diagnostic primaire qu'au contrôle d'éradication, bien que les informations soient encore insuffisantes quant à la fiabilité de ce test fécal pour le contrôle d'éradication chez les enfants. Le test doit être pratiqué avant tout traitement ou 4 semaines après l'arrêt du traitement. En pratique, rappelons qu'il ne faut utiliser que des échantillons de selles fraîches. Jusqu'à l'analyse, les selles doivent être stockées au maximum pendant 72 heures, dans un récipient étanche, et à une température de 2 à 8 °C, pour le transport au laboratoire. Si ce n'est pas possible, les selles doivent être congelées et envoyées congelées au laboratoire.

## Diagnostic indirect : sérodiagnostic

De nombreux tests sont commercialisés. Leurs performances ont été évaluées par le Groupe d'études français des Helicobacter (GEFH) à la demande de l'Afssaps. Les tests rapides ont des performances trop limitées. Seuls les tests ELISA évaluant le taux sérique des immunoglobulines G anti-*H. pylori* ont des résultats performants. Pour certains, la sensibilité et la spécificité atteignent 98 %. Le taux des anticorps reste élevé pendant la durée de l'infection et diminue progressivement dans les 4 à 6 mois qui suivent la disparition de la bactérie. Du fait de ce délai, le test ne peut être utilisé pour évaluer précocement le résultat de l'éradication. La sérologie peut être considérée comme test diagnostique dans les situations où les autres tests pourraient être faussement négatifs : ulcères hémorragiques, atrophie glandulaire, lymphome du MALT, utilisation récente d'antibiotiques ou d'inhibiteurs de la pompe à protons.

## *Indication des différents tests de recherche d'H. pylori*

Depuis 2009, la fréquence de la résistance primaire à la clarithromycine a dépassé 20 % en France, imposant un changement radical de la stratégie diagnostique des infections à *H. pylori*. Jusqu'alors les conférences de consensus recommandaient une stratégie du *test and treat* utilisant un test non invasif (test respiratoire ou recherche d'antigènes dans les selles) et un traitement empirique de 7 à 14 jours comportant un inhibiteur de la pompe à protons, de l'amoxicilline et soit de la clarithromycine, soit du métronidazole. L'efficacité de cette stratégie est maintenant trop fortement entamée par l'augmentation des résistances aux antibiotiques responsables d'échecs thérapeutiques chez presque 40 % des personnes traitées.

Il est maintenant recommandé d'utiliser, chaque fois que c'est possible, une stratégie thérapeutique fondée sur les résultats de tests de détection de la résistance aux antibiotiques et principalement à la clarithromycine. L'isolement, la culture et l'antibiogramme sont malheureusement pour l'instant rarement accessibles en dehors de quelques centres spécialisés. La diffusion de ces techniques est nécessaire pour répondre au besoin d'un traitement. La PCR et surtout la PCR temps réel sont une alternative intéressante pour leur rapidité et leur relative facilité. Deux conditions sont encore nécessaires pour en faire l'outil diagnostique de choix : l'automatisation à l'aide d'automates et de kits commercialisés, et la cotation en B pour un remboursement les rendant accessibles en ville.

Il est donc maintenant nécessaire, pour le diagnostic et le traitement des infections à *H. pylori*, de réaliser des biopsies gastriques avec étude anatomopathologique et bactériologique détectant la bactérie et sa résistance aux antibiotiques. Les tests non invasifs (test respiratoire, recherches d'antigènes dans les selles et sérologie) restent réservés au diagnostic quand la détection des résistances n'est pas accessible.

Le contrôle d'éradication est indispensable. Il est réalisé à l'aide d'un test non invasif permettant de détecter une infection active. Seuls le test respiratoire et la recherche d'antigènes dans les selles répondent à cette indication. La sérologie n'a pas d'indication dans le contrôle précoce de l'éradication. Les tests doivent être réalisés 4 à 6 semaines après la fin d'un traitement antisécrétoire ou antibiotique.

## *Détermination de la sensibilité aux antibiotiques*

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement d'éradication d'*H. pylori* est telle (clarithromycine 23 %, métronidazole 35 %) que la détermination de la sensibilité aux antibiotiques devient indispensable avant la mise en route d'un traitement adapté et efficace. L'antibiogramme par diffusion (E-test® ou disque) permet une détermination fiable de la résistance à la clarithromycine, à la lévofloxacine, à la tétracycline et à l'amoxicilline, alors que la détermination de la sensibilité

au métronidazole est trop peu reproductible et n'est donc pas conseillée. L'antibiogramme d'*H. pylori* est rendu délicat par la croissance lente de cette bactérie fastidieuse, par la propension de cette bactérie à évoluer rapidement sous sa forme coccoïde non cultivable. Cette difficulté d'obtenir un inoculum fort et cultivable entraîne fréquemment la nécessité de plusieurs subcultures et prolonge donc le délai de réponse. Il faut en moyenne 12 jours après la fibroscopie pour pouvoir rendre l'antibiogramme. Ce délai prolongé et les difficultés de la culture ont motivé la mise au point de techniques de biologie moléculaire (PCR, PCR temps réel, sondes) pour pouvoir apporter une réponse dans les 24 heures qui suivent la fibroscopie en recherchant directement sur la biopsie les mutations responsables de la résistance. Ces techniques ont été particulièrement développées pour la recherche des mutations conférant la résistance à la clarithromycine.

## Méthodes

La **dilution en agar** est considérée comme la méthode de référence. Elle a fait l'objet de standardisations et de recommandations par le Clinical Laboratory Standards Institute américain et par l'European *H. pylori* Study Group. Elle est utilisable lors d'études épidémiologiques mais n'est pas adaptée à une pratique quotidienne.

Les méthodes de **diffusion** (disques et E-test®) sont les plus simples et les plus adaptées à la pratique quotidienne d'un laboratoire de biologie clinique. Elles ont fait l'objet de standardisation et de validation par le GEFH pour la détermination de la sensibilité de la clarithromycine (encadré 35.2.1). Ces recommandations ont été validées par le CA-SFM.

Cette méthode n'a pas pu être validée pour le métronidazole par manque de reproductibilité ; elle n'est donc pas conseillée. Pour l'amoxicilline et la tétracycline, la franche expression de la résistance à ces molécules permet une détermination fiable de leur efficacité à l'aide de disques.

La méthode par diffusion utilisant l'E-test® permet une détermination fiable de la CMI de la clarithromycine (fig. 35.2.3) et de la ciprofloxacine. Là aussi, la détermination de la CMI du métronidazole n'est pas reproductible et n'est pas corrélée avec les autres méthodes. La détermination de la CMI d'autres molécules n'a pas d'intérêt.

Les techniques moléculaires ont surtout été développées pour la détection des mutations conférant la résistance à la clarithromycine et aux fluoroquinolones. Elles permettent une détection en quelques heures de la résistance au lieu de quelques jours pour l'antibiogramme classique. Après une extraction de l'ADN, le fragment du gène où sont localisées les mutations est amplifié par PCR. La détection des mutations était ensuite réalisée par restriction enzymatique (*restriction fragment length polymorphism* [RFLP]) ou à l'aide de sondes spécifiques (DEIA, OLA, LIPA). Une technique de PCR multiplex révélée par hybridation sur bandelette est commercialisée en France (HelicoDR®, Hain, BioCentrics). Elle permet la détection d'*H. pylori*, des mutations conférant la résistance à la clarithromycine

**ENCADRÉ 35.2.1**

### Recommandations du CA-SFM pour l'étude de la sensibilité d'*H. pylori* à la clarithromycine par diffusion

– Inoculum : préparer une suspension en bouillon Mueller-Hinton ou en solution saline (0,9 % NaCl) équivalente au standard McFarland 3 (~ $10^9$ UFC/ml). Vérifier l'absence de formes coccoïdes (< 10 %).
– Milieu : gélose de Mueller-Hinton additionnée de 10 % de sang de cheval.
– Ensemencement : méthode de diffusion – ensemencer la suspension inoculum par écouvillonnage ou par inondation en respectant les mesures de sécurité nécessaires.
– Disque : seules les déterminations de la sensibilité à l'érythromycine et à la ciprofloxacine sont judicieuses et donc recommandées par le CA-SFM. Un disque d'érythromycine chargé à 15 UI et un disque de ciprofloxacine chargé à 5 µg sont déposés sur la gélose ensemencée.
– Lecture : après 72 heures d'incubation à 37 °C en microaérobiose et après 4 jours pour détecter les doubles populations.
– Diamètres critiques et règles de lecture interprétative.

| *Antibiotique* | *Concentrations critiques* | | *Diamètres critiques* | |
|---|---|---|---|---|
| Érythromycine | ≤ 1 | > 4 | ≥ 22 | < 17 |
| Ciprofloxacine | ≤ 1 | > 1 | ≥ 20 | < 20 |

L'interprétation de l'érythromycine est valable pour la clarithromycine.
L'interprétation de la ciprofloxacine est valable pour la lévofloxacine. Si le diamètre est inférieur à 20 mm, mesurer les CMI en E-test®.

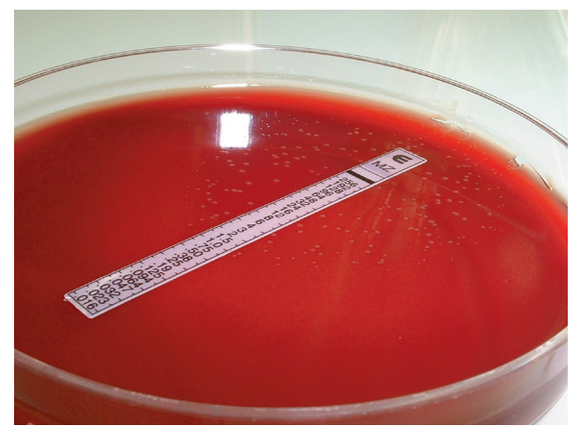


**Fig. 35.2.3.** – *Détermination de la sensibilité à la clarithromycine par les méthodes en diffusion : disque d'érythromycine, E-test® de clarithromycine.*

et des principales mutations conférant la résistance à la lévofloxacine. Différentes techniques de PCR temps réel ont été mises au point raccourcissant encore le délai de réponse et diminuant le risque de contamination par manipulation de produits amplifiés. Utilisées directement sur les biopsies gastroduodénales, elles fournissent un résultat 2 heures après la réception de la biopsie au laboratoire. Leur adaptation prochaine à des automates d'extraction et de PCR temps réel en fera un outil de diagnostic des infections à *H. pylori* et de détection de la résistance, permettant de répondre au large besoin d'une technique accessible.

Rappelons que le traitement d'une infection à *H. pylori* comporte une trithérapie de 7 ou 14 jours comprenant un inhibiteur de la pompe à protons (IPP) double dose associé à deux antibiotiques choisis parmi l'amoxicilline (1 g deux fois par jour), le métronidazole (500 mg deux fois par jour) et la clarithromycine (500 mg deux fois par jour). Il permet l'éradication de la bactérie dans 95 % des cas si la souche est sensible à ces antibiotiques. L'IPP calme les douleurs et neutralise le pH de l'estomac, permettant aux antibiotiques de ne pas être dégradés. La lévofloxacine et la tétracycline peuvent être proposées en cas d'échec ou de résistance documentée aux antibiotiques de première ligne. Le Pyléra® associant sel de bismuth, tétracycline et métronidazole est actuellement en demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) ; il représente, avec le traitement séquentiel (5 jours IPP–amoxicilline, puis 5 jours IPP–clarithromycine–métronidazole), de nouvelles possibilités thérapeutiques à évaluer.

## Conclusion

Le diagnostic de l'infection à *H. pylori* est d'indication de plus en plus large pour une infection encore fréquente. La fréquence de plus en plus élevée des résistances aux antibiotiques utilisés et particulièrement à la clarithromycine rend désormais la détermination de la sensibilité à cet antibiotique indispensable à la réussite d'un traitement d'éradication. Ce changement stratégique va solliciter un afflux de biopsies gastriques aux laboratoires. Il faut que les biologistes puissent répondre à cette demande qui permet une meilleure réussite thérapeutique. L'isolement, la culture et l'antibiogramme d'*Helicobacter pylori* doivent, malgré leurs difficultés de réalisation, être plus largement accessibles à la prise en charge des très nombreux malades infectés. La détermination de la sensibilité à la clarithromycine est maintenant bien validée pour la méthode du disque d'érythromycine ou du E-test®. Les méthodes moléculaires (PCR, PCR temps réel) qui permettent une détection rapide et fiable directement sur les biopsies gastroduodénales représentent une alternative à la culture. Automatisation et cotation à la nomenclature des actes de biologie médicale sont les deux conditions pour en faire un outil diagnostique de première ligne pour assurer un traitement efficace aux malades devant bénéficier d'une éradication.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Burucoa C, Garnier M, Silvain C, Fauchère JL. Quadruplex real-time PCR assay using allele-specific scorpion primers for detection of mutations conferring clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol (2008);46 : 2320–6.

Communiqué du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie sur le site de la www.sfm.asso.fr/.

Fauchère JL, Burucoa C. Ce qu'il faut savoir sur *Helicobacter pylori* pour la pratique médicale. Feuillets de Biologie(2010);51 (297) : 17–27.

Fauchère JL, Charlier-Bret N, Courillon-Mallet A, De Korwin JD, et al. Évaluation comparative de 29 trousses commercialisées pour le diagnostic sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori* : étude multicentrique du Groupe d'étude Français des *Helicobacter* (GEFH). Feuillets de Biologie (2010) ; 51 (298) : 25–32.

Kuster JG, van Vliet AHM, Kuipers E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev (2006);19 : 449–90.

Megraud F. Helicobacter. In : Courvalin P, Leclerc R, Bingen E, L'Antibiogramme. (2e éd. Paris : ESKA; (2006). p. 437–56.

Raymond J, Lamarque D, Kalach N, Chaussade S, Burucoa C. High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. Helicobacter (2010); 15 : 21–27.

www.helicobacter.fr/ (site du Groupe d'étude français des Helicobacter [GEFH]).

CHAPITRE

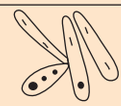
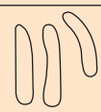
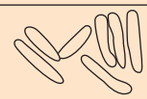
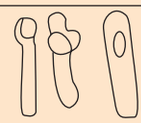
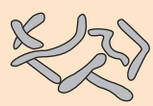
# 36 Bacilles à Gram positif (à l'exception des anaérobies)

Les bacilles à Gram positif qui poussent en aérobiose et qui sont susceptibles d'être pathogènes pour l'homme ou d'être rencontrés dans des prélèvements d'origine humaine sont nombreux. La morphologie de certains d'entre eux est assez évocatrice pour que, d'emblée, on puisse les rattacher à un genre bactérien précis : c'est habituellement le cas des bactéries appartenant aux genres *Corynebacterium, Bacillus, Nocardia* et *Actinomyces*.

Une orientation diagnostique pourra être obtenue en considérant la nature du prélèvement et son origine. Un certain nombre de caractères simples indiqués au tableau 36.1. permettent une orientation diagnostique.

**TABLEAU 36-1**

**Caractères généraux distinctifs d'orientation vers les différents genres au sein des bacilles à Gram positif aérobies.**

| *Bacilles Gram +* | *Morphologie* | *Culture sur gélose sang 5 % en aérobiose* | *Catalase* | *Mobilité à 37 °C* | *Origines* |
|---|---|---|---|---|---|
| *Corynebacterium* |  | + | + | – | Oropharynx, pus, ulcérations cutanées, infections oculaires |
| *Lactobacillus* |  | – | – | – | Commensaux du vagin, de l'intestin, de la bouche<br>En général, non pathogènes<br>Exceptionnellement, endocardites |
| *Listeria* | | + | + | –[a] | Méningites, bactériémies, suppurations diverses, infections néonatales<br>Répandues dans l'environnement |
| *Erysipelothrix* |  | + | – | – | Infections cutanées, endocardites, infections articulaires |
| *Bacillus* |  | + | + | +[b] | Infections cutanées et septicémiques avec *B. anthracis*<br>Toxi-infections alimentaires : *B. cereus*<br>Très répandus dans la nature |
| *Nocardia* et *Actinomyces* |  | +[c] | – | – | Infections bronchopulmonaires, infections cutanées, suppurations diverses<br>Parfois bactériémies<br>Très répandus dans la nature |

[a] *L. monocytogenes* est mobile à 22 °C.
[b] Sauf *Bacillus anthracis* qui possède de plus une capsule.
[c] Sauf *Actinomyces.*

Chapitre 36.1

# *Corynebacterium* et germes apparentés

O. Barraud, F. Denis, M.-C. Ploy

## Généralités

Les corynébactéries sont des bacilles à Gram positif non sporulés, immobiles, non filamenteux. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs et présentent classiquement une morphologie particulière irrégulière avec des renflements à une ou aux deux extrémités ; ils sont souvent disposés en amas. Sous cette définition, sont compris le genre *Corynebacterium* mais aussi de nombreux autres genres bactériens (tableau 36.1.1).

La plupart des espèces sont commensales de l'homme ou des animaux, mais les corynébactéries existent aussi dans l'environnement. Très peu d'espèces sont pathogènes, mais elles ne sauraient être ignorées ; la plus connue, *Corynebacterium diphtheriae*, responsable de la diphtérie, doit rester présente dans la mémoire des microbiologistes étant donné l'émergence de souches de corynébactéries toxinogènes appartenant à d'autres espèces que *C. diphtheriae* et la recrudescence de la maladie dans certains pays (Europe de l'Est, Asie du Sud-Est). Parmi les espèces commensales, *C. jeikeium* et *C. urealyticum* se rencontrent avec une certaine fréquence, favorisées par des terrains fragilisés et les traitements antibiotiques à large spectre.

Les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* ont généralement un type respiratoire aéro-anaérobie facultatif, bien que certaines espèces comme *C. fermentans*, *C. jeikeium* et *C. urealyticum* poussent mal en anaérobiose.

Les bactéries appartenant au genre *Dermabacter, Turicella* et *Rothia* ont aussi un type respiratoire aéro-anaérobie facultatif.

Les bactéries de type anaérobie préférentiel appartiennent aux genres *Arcanobacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*. Les deux derniers genres ne seront pas évoqués dans ce chapitre.

Enfin, d'autres corynébactéries ont un type respiratoire aérobie strict ; les plus courants en clinique sont *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*.

## *Corynebacterium diphtheriae*

*Corynebacterium diphtheriae* est propre à l'espèce humaine. Cette espèce est essentiellement transmise d'homme à homme par les sécrétions nasopharyngées, plus rarement par contact direct à partir d'un portage cutané, voire sur le mode indirect par du matériel souillé.

Le portage de souches non toxinogènes est relativement fréquent, mais des souches toxinogènes importées peuvent aussi circuler chez des porteurs asymptomatiques. La présence très fréquente de corynébacteries commensales au niveau des muqueuses et de la peau complique le diagnostic, notamment direct, et requiert des milieux sélectifs pour isoler *C. diphtheriae.*

Dans la diphtérie, on reconnaît deux types de manifestations :

- locales : liées à la multiplication du germe au niveau de la porte d'entrée ;
- générales : liées à la diffusion de la toxine dans l'organisme.

On distingue :

- les diphtéries communes qui se présentent sous forme d'une angine classiquement à fausses membranes avec

**TABLEAU 36-1-1**

**Caractéristiques générales des corynébactéries et des germes apparentés.**

| | *Catalase* | *Type respiratoire* | *Pigmentation* | *Aspect microscopique* |
|---|---|---|---|---|
| *Corynebacterium* | + | AAF sauf *C. aquaticum* et *Turicella otitidis* (aérobie strict) | – | Bacilles irréguliers Extrémités renflées |
| *Dermabacter* | + | AAF | – | Bacilles irréguliers |
| *Rothia* | + | AAF | – | Bacilles irréguliers Extrémités renflées |
| *Arcanobacterium* | – | Anaérobie préférentiel | – | Bacilles irréguliers courts |
| *Actinomyces* | V | Anaérobie préférentiel | – | Bacilles, branchements |
| *Propionibacterium* | + | Anaérobie préférentiel | – | Bacilles irréguliers |
| *Rhodococcus* | + | Aérobie | Rose-orange | Coccoïdes |
| *Arthrobacter* | + | Aérobie | – | Cycle cocci-bacille |
| *Brevibacterium* | + | Aérobie | – | Cycle cocci-bacille |

AAF : aéro-anaérobie facultatif.

des enduits blanc-grisâtre pouvant recouvrir les amygdales, pouvant envahir les piliers du voile ou la luette ! La localisation est plus rarement laryngée (croup). Des céphalées et un malaise peuvent être présents. L'aspect peut ne pas être aussi évocateur (angine érythémateuse, pultacée, pseudogangréneuse, etc.). L'association à une angine fusospirillaire n'est pas exceptionnelle. Un diagnostic différentiel de mononucléose infectieuse doit systématiquement être écarté. D'autres localisations sont possibles : conjonctivales, vaginales, cutanées notamment. Il est aussi possible d'avoir des infections systémiques (endocardites, septicémies), surtout chez des patients en situation précaire ;

- les diphtéries malignes, avec des fausses membranes confluentes, une muqueuse hémorragique, des signes régionaux (adénopathies volumineuses) et généraux. On retrouve alors des myocardites, des paralysies (du voile du palais, des membres, etc.), des syndromes hémorragiques qui sont dus à la diffusion de la toxine, la mort pouvant survenir en quelques heures.

À titre indicatif, pour les pays développés, une étude canadienne portant sur 89 souches de *C. diphtheriae* recueillies sur 5 ans montre que les isolements pharyngés sont très minoritaires (3 souches), de même que les isolements à partir d'hémocultures (9 souches), la majorité venant de sites non stériles et non pharyngés.

Des souches de *Corynebacterium* non *diphtheriae* peuvent produire la même toxine (*C. ulcerans, C. pseudodiphteriticum*) et être à l'origine de tableaux identiques. Rappelons que si les isolats de *C. ulcerans* et de *C. pseudotuberculosis* possèdent le gène *Tox*, les cas entrent dans la nouvelle définition européenne de diphtérie. Depuis 2001, 30 cas de diphterie ont été déclarés en France métropolitaine. Parmi ces 30 cas, 15 étaient dus à des corynébactéries toxinogènes (4 *C. diphtheriae*, 11 *C. ulcerans*) ; les cas dus à *C. diphtheriae* étaient des cas importés. Sur les 4 souches toxinogènes reçues par le Centre national de référence (CNR) en 2009, 3 souches avaient été isolées à Mayotte et étaient de biotype Mitis. Une revue récente fait état en Grande-Bretagne d'une répartition sur 102 souches toxinogènes de 42 *C. diphtheriae*, de 59 *C. ulcerans* et de 1 cas de *C. pseudotuberculosis*. Comme en France, *C. ulcerans* précède en fréquence *C. diphtheriae* parmi les souches toxinogènes.

Les souches de *C. diphtheriae* non toxinogènes peuvent être responsables d'infections locales (cutanées, angines, etc.) ou profondes telles que des sinusites (avec prédominance du biotype Belfanti) et également d'endocardites.

## Autres corynébactéries ou germes apparentés susceptibles d'être pathogènes pour l'homme

L'incidence d'infections opportunistes dues à des bactéries corynémorphes est croissante. Certaines se rencontrent surtout chez des patients immunodéprimés.

### *Corynébactéries non diphtériques*

Le caractère saprophyte des corynébactéries fait qu'elles peuvent être souvent présentées comme contaminants de différents prélèvements. Leur isolement à partir d'un site normalement stérile ou en culture pure, ou abondants, à partir de sites non stériles, doit être pris en considération comme pathogène possible (tableau 36.1.2).

*C. resistens* est une nouvelle espèce, décrite en 2005, lipophile mais sans activité pyrazinamidasique. Elle a été isolée d'hémocultures, d'abcès et de prélèvements respiratoires. Cette espèce est souvent multirésistante aux antibiotiques.

*C. ulcerans* peut être responsable de pharyngites exsudatives et de tableaux pseudodiphtériques. Cette espèce est impliquée dans des diphtéries pour les souches toxinogènes ; elle peut être transmise par le lait cru ou les animaux de compagnie.

*C. pseudotuberculosis* est une espèce décrite dans des lymphadénites et pharyngites. La contamination se fait généralement à partir de laits non pasteurisés ou transmise par les animaux de ferme.

*C. xerosis* peut être à l'origine d'endocardites et d'infections chez des immunodéprimés.

*C. pseudodiphteriticum*, espèce surtout isolée à partir de la gorge, a été signalé dans des endocardites, notamment survenant sur valves. Elle peut être responsable de pneumonies, bronchites.

**TABLEAU 36-1-2**

**Pathogénicité des corynébactéries les plus fréquemment isolées en clinique.**

| | *Septicémies* | *Endocardites* | *Méningites* | *Infections pulmonaires* | *Infections plaies* | *Infections urinaires* | *Urétrites Prostatites* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *C. ulcerans* | | | | | + | | |
| *C. jeikeium* | + | + | + | + | | | |
| *C. urealyticum* | | + | | | + | ++ | |
| *C. amycolatum* | + | + | | | + | | |
| *C. striatum* | + | + | | + | + | | |
| *C. seminale* | | | | | | | + |

*C. minutissimum* est une espèce pouvant être isolée à partir de la peau dans des cas d'érythrasma.

*C. urealyticum* est surtout responsable d'infections urinaires, notamment chez des porteurs de sonde, des immunodéprimés. Les souches sont souvent résistantes aux antibiotiques communément utilisés dans le traitement des infections urinaires.

*C. amycolatum* est assez fréquemment isolé en clinique car c'est une espèce souvent multirésistante aux antibiotiques. Elle est isolée surtout dans des infections consécutives à des actes invasifs ou en présence de matériel étranger.

*C. seminale* (aussi nommée *glucuronolyticum*) n'est retrouvée que dans des prélèvements urogénitaux et a été incriminée dans les prostatites et uréthrites.

*C. jeikeium* (ex-groupe JK) colonise fréquemment la peau, mais peut aussi être à l'origine de tableaux septicémiques, d'endocardites, d'infections méningées ou autres. Cette espèce est fréquemment multirésistante, certaines souches n'étant sensibles qu'à la vancomycine. Elle est fréquemment responsable d'infections sur matériel étranger.

*C. urealyticum* et *C. jeikeium* sont des espèces nécessitant des lipides pour leur croissance.

*C. striatum*, commensale de la peau et des muqueuses, est responsable de pneumopathies chez des patients sous assistance respiratoire (ventilation). Elle a aussi été isolée à partir d'ulcères, de plaies. C'est une espèce fréquemment multirésistante aux antibiotiques.

*C. macginleyi* est surtout isolée à partir de prélèvements oculaires dans les cas des surinfections bactériennes de conjonctivites virales.

*Turicella otitidis* est responsable d'otites moyennes aiguës.

## Rhodococcus equi

*R. equi* a une morphologie de coccobacille. Cette espèce est bien connue dans le monde vétérinaire. Elle est responsable essentiellement d'infections chez les équidés et se retrouve longtemps dans le sol et le fumier. Chez l'homme, cette espèce est à l'origine d'infections graves chez des patients recevant des traitements anticancéreux ou immunosuppresseurs. L'atteinte pulmonaire est la plus fréquente, mais des abcès cérébraux et des ostéomyélites ont aussi été décrits. La très grande sensibilité à l'érythromycine combinée avec la résistance à la pristinamycine est assez évocatrice. Les colonies sont souvent pigmentées en rose pâle avec une croissance en 3 à 4 jours (fig. 36.1.1).

L'association érythromycine–rifampicine est souvent utilisée pour le traitement.

## Arcanobacterium haemolyticum

Cette espèce est à l'origine de pharyngites le plus souvent érythémateuses (parfois à fausses membranes), pouvant être accompagnées d'un rash cutané. Elle peut aussi être isolée de lésions cutanées ulcéreuses. Cette espèce a la particularité d'être dépourvue de catalase.

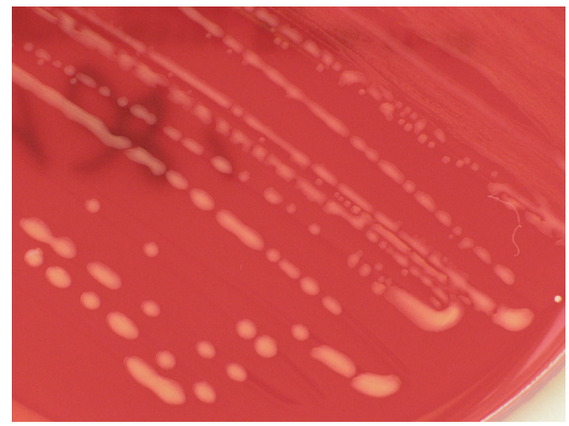


**Fig. 36.1.1.** – *Colonies de* Rhodococcus equi *sur gélose au sang.*

## Dermabacter hominis

Cette bactérie est commensale de la peau mais a été isolée en situation pathogène à partir de pus ou d'hémocultures.

## Rothia dentocariosa

Cette bactérie est commensale de la cavité buccale et a été isolée de prélèvements respiratoires. Des cas d'endocardites ont aussi été décrits.

## Brevibacterium, Arthrobacter

Ce sont surtout des bactéries de l'environnement, mais des souches ont été isolées d'hémocultures ou de pus chez l'homme. Certaines souches sont utilisées dans la fabrication de certains fromages, ce qui peut expliquer leur isolement chez l'homme. Les souches de *Brevibacterium* dégagent une forte odeur de fromage en culture.

## Diagnostic bactériologique

### *Prélèvements*

Un prélèvement de gorge doit être pratiqué devant toute angine à fausse membrane. Il doit être réalisé sous contrôle visuel et si possible avant tout traitement. On peut procéder :

- à un écouvillonnage (plusieurs écouvillons) à la périphérie de la fausse membrane (amygdales, voile, luette), plus rarement à un écouvillonnage nasal ou à un prélèvement de sérosités cutanées ou conjonctivales ;
- à un prélèvement de fausse membrane à la pince.

Le prélèvement doit être acheminé au laboratoire sans délai, avant dessèchement, en précisant clairement s'il existe une suspicion clinique de diphtérie.

À partir d'hémocultures dans un contexte d'endocardite, on peut isoler des souches de *C. diphtheriae* non toxinogènes.

À part les cas de diphtéries, les autres corynébactéries ne nécessitent pas de précautions particulières pour l'acheminement au laboratoire. Différents prélèvements peuvent être effectués (urines, sperme, hémocultures, pus, prélèvements respiratoires, cutanés, etc.).

## Examen de l'échantillon

En cas de suspicion de diphtérie, on procède à un examen des frottis de gorge après coloration :

- de Gram à la recherche de bacilles à Gram positif ayant une morphologie évocatrice. Classiquement, *C. diphtheriae* se présente sous forme de bacilles de 1 à 8 µm/0,3 à 0,8 µm droits ou légèrement incurvés avec des extrémités arrondies ou renflées (aspect en massue ou en haltère) (fig. 36.1.2 et 36.1.3). Ces bacilles sont caractérisés par leur groupement (en petits amas ou disposés en lettre L, M, N, V, etc.) du fait de leur séparation incomplète ;
- de Neisser, d'Ernst-Neisser ou de Loeffler permettant de colorer spécifiquement les granulations métachromatiques aux extrémités.

**Fig. 36.1.2.** – *Aspect en massue d'une corynébactérie en microscopie électronique.*

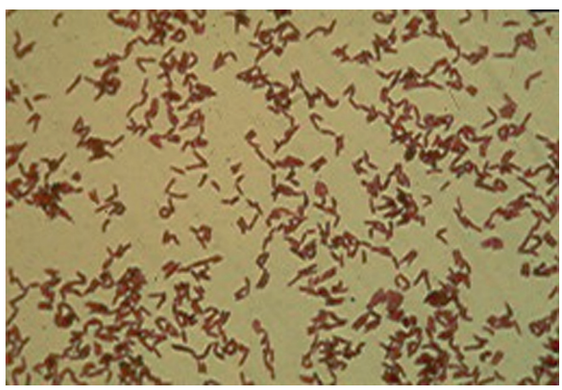


**Fig. 36.1.3.** – *Examen direct de corynébactéries après coloration de Gram.*

Mais il faut savoir que les bactéries les plus toxinogènes, *Gravis*, sont le plus souvent très courtes, sans morphologie évocatrice, sans granulations.

Malgré l'impatience des cliniciens, le biologiste même entraîné ne peut conclure à partir de l'examen direct qu'à l'absence ou à la présence de bacilles diphtérimorphes sans aller plus loin dans ses conclusions.

Dans le cas des infections urinaires à *C. urealyticum*, il est possible de voir des bacilles à Gram positif corynéformes sur un culot de centrifugation des urines.

## Mise en culture

Deux types de milieux peuvent être ensemencés :

- des milieux riches tels que Mueller-Hinton, trypticase-soja, gélose au sang voire, si on en dispose, milieu de Loeffler au sérum coagulé, ou des milieux additionnés de Tween 80® (0,1 à 1 %) afin de faciliter la croissance des espèces lipophiles (*C. jeikeium, C. urealyticum*) ;
- des milieux sélectifs comme des géloses au sang à l'acide nalidixique, ou géloses au sang rendues sélectives par addition d'un disque de fosfomycine (200 µg), les corynébactéries étant hautement résistantes à cet antibiotique (sauf *Rothia*, *Dermabacter* et *Actinomyces*).

Les espèces lipophiles donnent des fines colonies sur gélose au sang et ne poussent pas sur des milieux moins riches.

On peut également ensemencer un bouillon type cœur-cervelle.

Les techniques rapides donnant un diagnostic présomptif en 4 à 5 heures ont un intérêt limité et des sensibilités et spécificités discutables.

Pour *C. diphtheriae*, le recours à des milieux au sang telluré (Clauberg, Hoyle) ou agar-cystine-tellurite (CTA) permet d'observer des colonies gris-noir. Mais les milieux usuels cités antérieurement (riches et sélectifs) permettent d'isoler les souches sans difficulté. Le milieu CTA est souvent préconisé aux États-Unis.

Les cultures seront observées sur 48 heures, mais sur milieux riches, des colonies peuvent apparaître en 16 à 18 heures.

Après incubation à 37 °C en atmosphère enrichie avec 5 % de $CO_2$, il a été décrit une croissance en satellitisme de *Staphylococcus aureus* pour certaines souches lipophiles. Une β-hémolyse a été décrite pour certaines souches de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*.

## Diagnostic d'espèce

Les colonies de *C. diphtheriae* ont un diamètre de 1 à 3 mm, sont lisses, grisâtres et crémeuses, entourées d'un halo de β-hémolyse sur gélose au sang. On distingue, sur gélose au tellurite, trois types de colonies pouvant faire évoquer différents biotypes :

- *Gravis* : grosses colonies « R » crénelées à mamelon central ;
- *Intermedius* : petites colonies lisses ou rugueuses ;
- *Mitis* : grosses colonies « S » bombées et brillantes.

**TABLEAU 36-1-3**

**Caractères différentiels des principales espèces de *Corynebacterium*, d'*Arcanobacterium* et de *Rhodococcus*.**

| | *Catalase* | *Lipophilie* | *Nitrate réductase* | *Uréase* | *β-glucuronidase* | *Fermentation* | | *Pyrazinamidase* | *Phospatase alcaline* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | *Glucose* | *Saccharose* | | |
| *C. resistens* | + | – | – | – | – | + | – | – | + |
| *T. otitidis* | + | – | – | – | – | – | – | ND | ND |
| *C. striatum* | + | – | + | – | – | + | + | + | + |
| *C. diphtheriae* | + | – | + | – | – | + | – | – | – |
| *C. pseudotuberculosis* | + | – | V | + | – | + | V | – | V |
| *C. pseudodiphtheriticum* | + | – | + | + | – | – | – | + | V |
| *C. ulcerans* | + | – | – | + | – | + | V | – | + |
| *C. xerosis* | + | – | V | – | – | + | + | + | + |
| *C. jeikeium* | + | + | – | – | – | + | – | + | + |
| *C. urealyticum* | + | + | – | + | – | – | – | + | V |
| *A. haemolyticum* | – | ND | – | – | – | + | V | V | ND |
| *R. equi* | + | ND | + | + | – | – | – | ND | ND |
| *C. seminale* | + | – | V | + | + | + | + | + | – |
| *C. amycolatum* | + | – | V | V | – | + | V | ND | + |
| *Dermabacter hominis* | + | – | – | – | – | + | + | ND | ND |
| *Brevibacterium casei* | + | – | V | – | – | – | – | ND | ND |

A : *Arcanobacterium* ; ND : non déterminé ; R : *Rhodococcus* ; T : *Turicella*.

Sur les colonies suspectes, on pratique une coloration de Gram. *C. diphtheriae* apparaît Gram positif, mais les bactéries sont très facilement décolorées par l'alcool. On peut observer la morphologie décrite sur l'examen des frottis avec des groupements caractéristiques en palissade, lettres chinoises ou romaines (fig. 36.1.3). Mais, les souches *Gravis* les plus toxinogènes n'ont pas ou peu de granulations métachromatiques ; malgré cela, la coloration d'Ernst-Neisser ou de Del Vecchio doit être pratiquée sur les frottis réalisés à partir des colonies.

Il importe de différencier *C. diphtheriae* des autres bactéries corynémorphes (tableau 36.1.3).

La seule possession d'une catalase, d'une nitrate réductase et d'une β-hémolyse ne suffit pas pour écarter les autres espèces.

Le diagnostic d'espèce est porté après étude de fermentation de sucres et recherche de quelques activités enzymatiques (uréase, α-glucosidase, etc.) voire recherche de la lipophilie en comparant la culture sur gélose trypticase-soja avec ou sans Tween 80® (0,1 à 1 %).

Une fois le diagnostic d'espèce de *C. diphtheriae* établi, on peut tenter une distinction entre les biotypes (tableau 36.1.4).

Les galeries commercialisées API Coryne® (bioMérieux), Rapid ID CB Plus® (Oxoid, Pemel) permettent d'arriver au diagnostic d'espèce.

Un certain nombre d'activités enzymatiques peuvent être recherchées directement par l'utilisation de disques Rosco (Eurobio, France) : β-glucuronidase, α-glucosidase, pyrazinamidase, phosphatase alcaline.

**TABLEAU 36-1-4**

**Biotypes de Corynebacterium diphtheriae.**

| | *Lipophilie* | *Nitrate réductase* | *Fermentation glycogène* |
|---|---|---|---|
| *Gravis* | – | – | + |
| *Intermedius* | + | – | + |
| *Mitis* | – | + | – |
| *Belfanti* | – | – | – |

[a] Biotype jamais toxinogène.

L'identification des corynébactéries a été facilitée avec les techniques de biologie moléculaire. Le séquençage du gène *rpoB* est plus pertinent que le séquençage du gène de l'ARNr 16S.

À noter qu'une PCR ayant comme cible le gène *dtx*R permet d'identifier l'espèce *C. diphtheriae* et qu'une PCR multiplex différencie les espèces *ulcerans* et *pseudotuberculosis*. Ces tests sont pratiqués par le CNR.

## Recherche de toxine diphtérique

Une fois le diagnostic d'espèce *C. diphtheriae* porté, il est nécessaire de rechercher si la souche est ou non toxinogène.

Rappelons que la production de toxines est liée à l'état lysogène des souches qui ont intégré dans leur

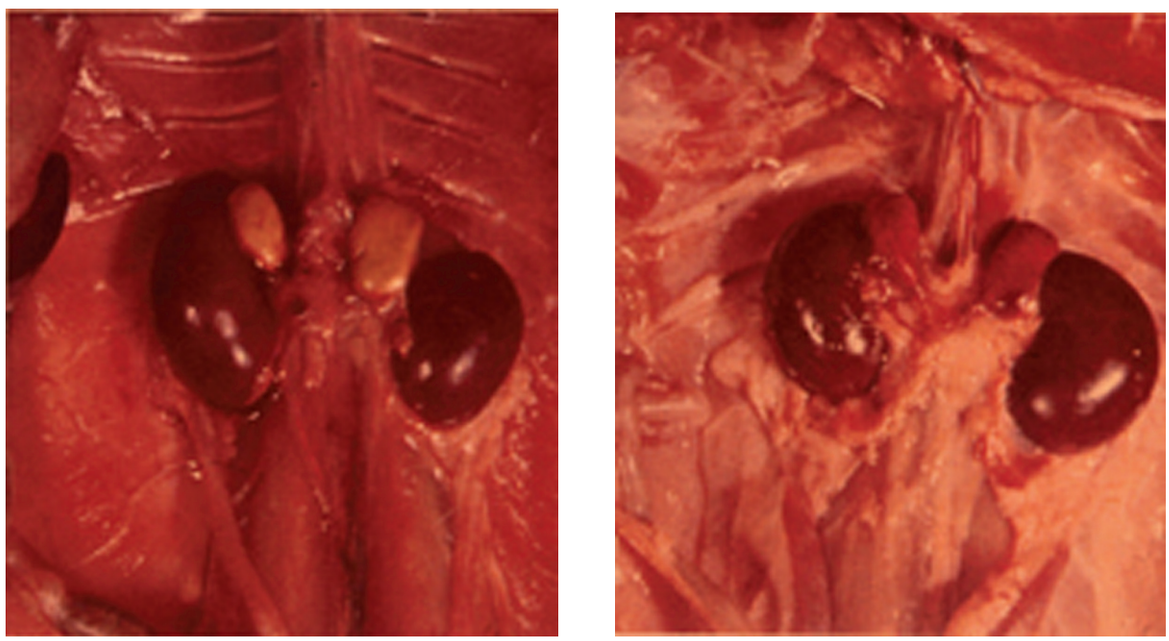


**Fig. 36.1.4.** – *Autopsie de cobaye après inoculation par voie sous-cutanée d'une culture de* C. diphteriae *toxinogène.* À gauche, animal protégé par antisérum (pas d'hémorragie des surrénales). À droite, cobaye non protégé (hémorragie des surrénales).

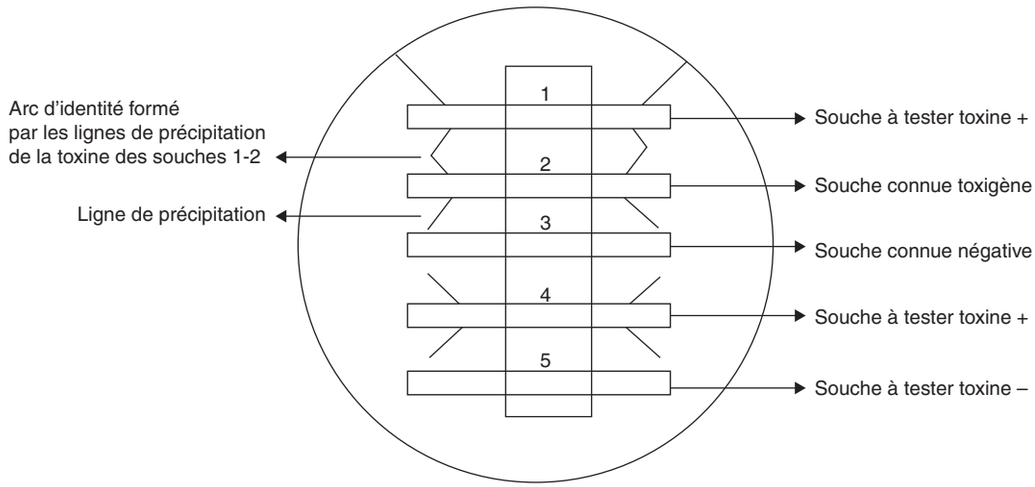



**Fig. 36.1.5.** – *Mise en évidence de la toxinogenèse in vitro par la méthode d'Elek (principe).*

chromosome le phage bêta porteur du gène *Tox*. Seules les souches *Tox* + synthétisent et produisent la toxine.

La recherche de toxine peut être pratiquée selon deux méthodes :

- in vivo, on peut rechercher le pouvoir létal par inoculation par voie sous-cutanée au cobaye d'un bouillon de culture. Les souches *Tox* + tuent l'animal en 1 à 4 jours et l'autopsie révèle des œdèmes viscéraux et des hémorragies des surrénales, alors que l'animal protégé par du sérum antidiphtérique survit (fig. 36.1.4) ;
- in vitro, on réalise le test d'Elek qui consiste en une immunoprécipitation en gel. On ensemence sur milieu gélosé (fig. 36.1.5) deux souches connues *Tox* + et *Tox* – parallèlement à la souche étudiée. Les souches doivent avoir été préalablement isolées sur milieu nutritif simple et pas sur gélose au sang, le fer inhibant la production de toxine. On dépose alors perpendiculairement une bandelette imprégnée de sérum antitoxine diphtérique. Puis on observe les arcs de précipitation (fig. 36.1.6). Il ne s'agit pas d'une technique rapide, les arcs ne pouvant être visibles qu'après 2 à 6 jours. De plus, il existe des arcs non spécifiques. Si la souche à étudier est toxinogène, l'arc principal rejoint celui observé avec la souche connue *Tox* +.

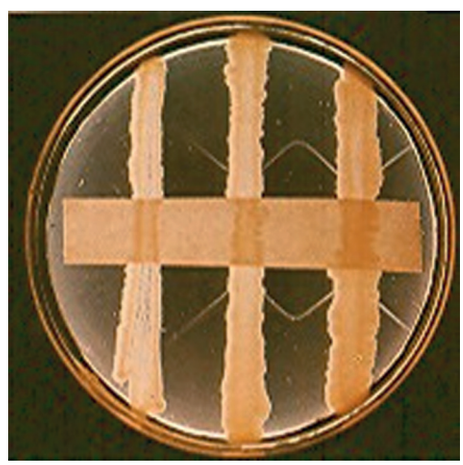


**Fig. 36.1.6.** – *Test d'Elek.*
De gauche à droite : souche de référence toxine –, souche à tester toxine +, souche de référence connue toxine +.

À noter qu'un test rapide (10 à 15 minutes) immunochromatographique (ICS *strip*) détectant la toxine a été développé ; il permet une détection de la toxine sur culture, voire sur prélèvement incubé en bouillon. Ce test a des sensibilités et des spécificités comprises entre 95 et 100 %.

La démarche du diagnostic bactériologique de diphtérie est schématisée sur la figure 36.1.7.

La recherche du gène *Tox* par amplification génique sur souche, voire directement sur produit pathologique est très prometteuse. Elle est bien sûr applicable à d'autres espèces toxinogènes (*C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*) qui hébergent le même bactériophage. Une étude canadienne portant sur 89 souches de *C. diphtheriae* fait état de 6 souches portant le gène *Tox* et synthétisant la toxine et de 8 souches *Tox* + sans production de toxine, les autres étant non toxinogènes.

## Résistance aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité de *C. diphtheriae* aux antibiotiques est réalisable par antibiogramme sur Mueller-Hinton additionné de 5 % de sang de mouton. Les souches sont sensibles aux pénicillines et céphalosporines, mais des souches résistantes aux macrolides et aux tétracyclines ont été décrites. Récemment, un intégron portant une résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole a été mis en évidence sur une souche de *C. diphtheriae.*

Si le traitement classique des infections à corynébactéries repose sur les pénicillines ou les macrolides, des souches multirésistantes aux antibiotiques appartenant

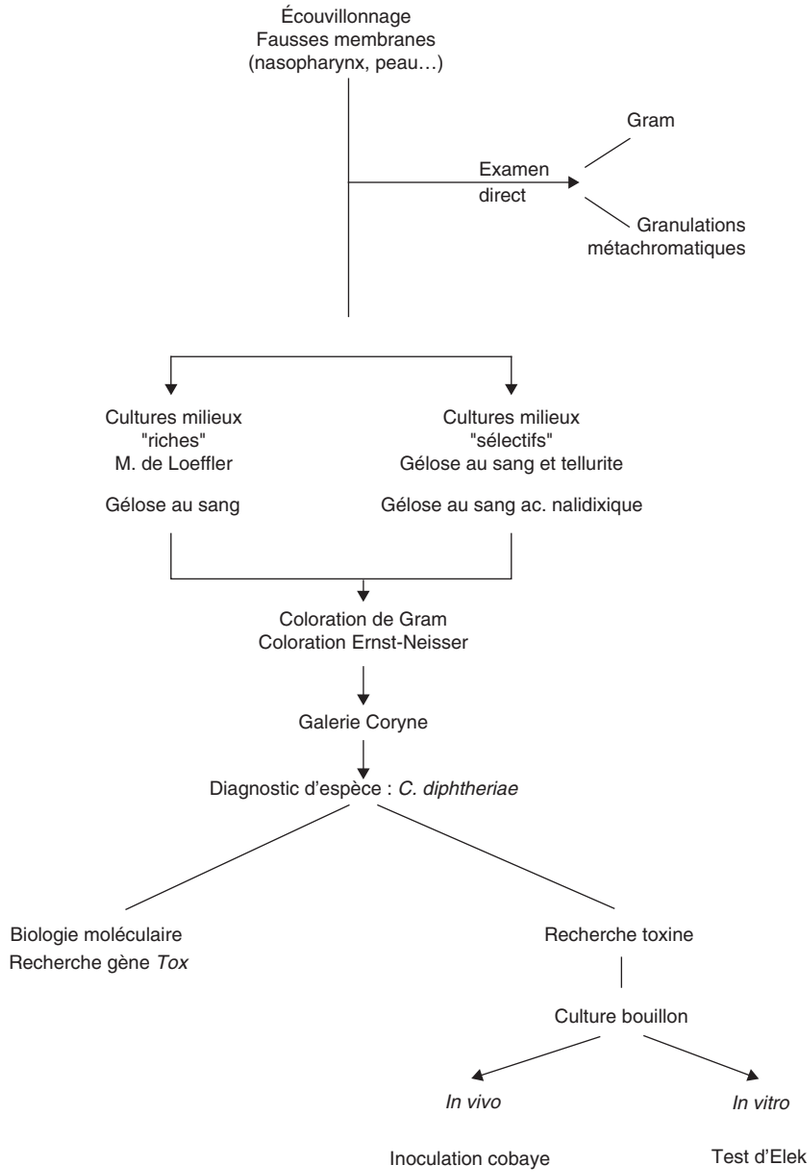



**Fig. 36.1.7.** – *Méthodes d'isolement et d'identification de* Corynebacterium diphtheriae *et de la toxine diphtérique.*

à différentes espèces sont apparues. C'est le cas de *C. striatum, C. amycolatum, C. jeikeium, C. urealyticum, C. resistens*. Des résistances aux β-lactamines, macrolides, tétracyclines, aminosides, rifampicine ont été décrites.

Il n'y a pas de recommandations spécifiques pour les corynébactéries par le CA-SFM. Il est possible d'utiliser les valeurs fixées pour les streptocoques. Il est préférable d'utiliser une gélose Mueller-Hinton additionnée de sang.

Même si les diphtéries sont devenues rares, la responsabilité du bactériologiste est engagée et il ne doit pas manquer le diagnostic de *C. diphtheriae* ou celui de corynebactéries toxinogènes. La responsabilité des autres espèces de corynébactéries ou germes apparentés en pathologie est parfois difficile à démontrer et l'identification précise de certaines espèces relève de spécialistes, avec parfois recours à des méthodes génomiques avec séquençage du gène codant l'ARN 16S ribosomique ou du gène *rpoB*.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Corynebacterium*. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses ; 2000. p. 122–39.

Baron S, Bimet F, Lequellec-Nathan M, et al. Conduite à tenir lors de l'apparition d'un cas de diphtérie. BEH 1998 ; 23 : 97–101.

De Winter L, Bernard KA, Romney M. Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 3447–9.

Engler KH, Efstratiou A, Norn D, et al. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin : description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 80–3.

Freney J, Duperron MT, Courtier C, et al. Evaluation of API coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 38–41.

Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods. In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed Washington DC : ASM ; 2003. p. 472–501.

Khamis A, Raoult D, La Scola B. *Rpob* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 3925–31.

Khamics A, Raoult D, La Scola B. Comparison between *rpob* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 1934–6.

Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheriae toxin genes. J Clin Microb 1997 ; 35 : 1651–5.

Otsuka Y, Kawamura Y, Koyama T, Iihara H, et al. *Corynebacterium resistens* Sp Nov. A new multidrug-resistant coryneform bacterium isolated from human infections. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 3713–7.

Patey O, Bimet F, Riegel P, et al. Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 441–5.

Riegel P. *Corynebacterium* et bactéries apparentées. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2e ed Paris : ESKA ; 2007. p. 1227–50.

Wagner KS, White JM, Crowcroft NS, et al. Diphtheriae in the United Kingdom, 1986–2008 : the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. Epidemiol Infect 2010 ; 138 : 1519–30.


**ADRESSE UTILE**


**Centre national de référence pour *Corynebacterium diphtheriae***
Centre d'identification moléculaire des bactéries
Institut Pasteur
25–28, rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
E-mail : coryne@pasteur.fr


**ANNEXE 36.1.1**

## Coloration des granulations métachromatiques

On utilise plusieurs solutions.

• Solution A :
– bleu de méthylène 1,0 g ;
– éthanol 96 % 20,0 ml ;
– eau distillée 952,0 ml ;
– $CH_3$ COOH pureté > 95 % (acide glacial) 50,0 ml.

• Solution B :
– cristal violet 1,0 g ;
– éthanol 96 % 10,0 ml ;
– eau distillée 300,0 ml.

Mélanger avant usage les deux solutions à raison de 2 volumes de A et 1 volume de B.

• Solution C :
– solution de lugol 100,0 ml ;
– CH3 CHOH COOH (acide lactique) concentré 1,0 ml.

• Contre-coloration
– chrysoïdine 2,0 g ;
– eau distillée 300,0 ml ;

• Dissoudre par chauffage à 100 °C.

Technique de coloration : la lame préalablement fixée est recouverte du mélange A + B et chauffée 20 à 30 secondes.

Après lavage à l'eau froide, la solution C est déposée et laissée 5 secondes.

On procède à une contre-coloration durant 5 minutes.

Les lames sont alors séchées et l'examen se fait sous immersion. Les granulations apparaissent en noir alors que le corps bactérien apparaît en brun.

**ANNEXE 36.1.2**

### Recherche immunologique de toxine diphtérique : test d'Elek

• Souches de référence à utiliser :
– témoin positif (souche toxinogène) : *C. diphtheriae* CIP A102 ;
– témoin négatif (souche non toxinogène) : *C diphtheriae* CIP 780.2.
• Milieu de base 1 :
– protéose peptone n° 3 (Difco) 3 g ;
– maltose 0,6 g ;
– acide lactique 0,14 ml ;
– eau distillée 100 ml.
• Milieu de base 2 :
– agar 3 g ;
– chlorure de sodium 1 g ;
– eau distillée 100 g.
Les deux milieux sont chauffés par dissolution complète des composés, ajustés à pH 7,8, puis mélangés, répartis dans des tubes de 15 ml et stérilisés.

Faire fondre un tube contenant le milieu de base, ramener à la température de 55 °C et couler en boîte de Pétri. Déposer au milieu de la boîte de gélose encore molle une bandelette de papier Whatmann imbibée de sérum antidiphtérique à 1000 UI/ml (Pasteur vaccins). Sécher la surface en incubant 20 minutes à 37 °C. Effectuer trois stries correspondant à la souche à tester et aux deux souches témoins perpendiculairement à la bandelette. Observer après 24 heures d'incubation à 37 °C et le cas échéant à 48 heures voire plus la présence d'arcs de précipitations débutant à partir des cultures en stries, et comparer la position de ces arcs par rapport à ceux de la souche témoin positive.
Il existe une variante de ce test dans laquelle l'antitoxine est déposée dans un puits central de la gélose et les souches à tester sont disposées en rosette autour de puits.

**ANNEXE 36.1.3**

### Recherche de la toxine diphtérique sur cobaye

On réalise une suspension riche à partir d'une culture de 24 heures sur milieu solide (Loeffler ou autre) dans 12 ml de bouillon (ne pas utiliser une suspension en solution saline), ou utiliser une culture de 24 à 48 heures de la souche suspecte en bouillon, avec une densité suffisante (densité 3 de MacFarland).
Prendre deux cobayes :
• l'un des deux reçoit une injection intrapéritonéale de 1000 à 2000 UI de sérum antidiphtérique 2 à 3 heures avant le test ;
• l'autre est non protégé.
Tous deux reçoivent par voie sous-cutanée 2 à 3 ml de la suspension ou du bouillon.
En cas de souche toxigène, le cobaye non immunisé meurt en 1 à 2 jours alors que le cobaye immunisé survit. À l'autopsie, l'animal décédé, du fait de la toxine, présente des hémorragies des surrénales. Il faut savoir qu'avec certaines souches de *C. ulcerans* ou de *C. pseudotuberculosis* l'animal « protégé » peut aussi mourir du fait d'autres toxines.

## Chapitre 36.2

# *Erysipelothrix rhusiopathiae* ou bacille du rouget du porc

J. Tankovic

Le genre *Erysypelothrix* compte deux espèces, *E. rhusiopathiae* et *E. tonsillarum* ; cette dernière n'étant pas pathogène pour l'homme, nous n'en parlerons donc pas.

## Habitat et pouvoir pathogène

*E. rhusiopathiae* est un agent pathogène responsable de zoonoses avec un spectre d'espèces sensibles très large : crustacés, poissons, oiseaux, mammifères. Mais le portage sain existe aussi. *E. rhusiopathiae* est fréquemment présent dans le tube digestif de porcs sains. Ceux-ci constitueraient le principal réservoir. Cette bactérie est également très répandue dans la nature et a été retrouvée dans le sol, les eaux, les aliments. Cela s'explique par une contamination de ces milieux par des animaux infectés ou colonisés et par la capacité de persistance prolongée de cette bactérie dans l'environnement.

*E. rhusiopathiae* peut accidentellement être transmis à l'homme après contact avec des animaux malades ou porteurs. La maladie humaine est donc essentiellement une

maladie professionnelle (vétérinaires, agriculteurs, bouchers, poissonniers, pêcheurs). Les infections humaines sont surtout cutanées et bénignes : il s'agit d'une forme de cellulite touchant le plus souvent les mains : l'érysipéloïde de Rosenbach. Cette bactérie est rarement responsable d'endocardite. Les bactériémies sans endocardite existent mais sont rares. Chez les sujets atteints d'endocardite, un érysipéloïde n'est observé que dans la moitié des cas. Les endocardites dues à ce germe sont fréquemment graves. Le bacille du rouget est naturellement résistant aux glycopeptides mais est remarquablement sensible à la pénicilline.

## Morphologie

Il s'agit de bacilles à Gram positif non sporulés et immobiles, courts, fins, réguliers, droits ou légèrement incurvés, avec une tendance à donner des formes filamenteuses et flexueuses (fig. 36.2.1).

## Mise en culture

La mise en évidence de la bactérie à partir de l'érysipéloïde est difficile. S'il existe des phlyctènes, il faut prélever le liquide. Sinon, il faut injecter et réaspirer 1 ml de sérum physiologique ou pratiquer une biopsie cutanée en périphérie de la lésion. Cette bactérie n'est pas fragile.

Elle ne présente pas de grandes exigences et cultive sur gélose au sang frais ou cuit. Elle est aéro-anaérobie mais la primoculture est favorisée par une incubation en atmosphère enrichie en $CO_2$. Son optimum thermique se situe entre 33 et 37 °C.

La croissance est relativement lente en primoculture et les colonies ne sont bien visibles qu'après 2 à 3 jours d'incubation. Sur gélose au sang, une α-hémolyse plus ou moins intense peut s'observer, mais pas de β-hémolyse.

Deux types de colonies s'observent fréquemment sur les isolements : des colonies *smooth* (S) et *rough* (R). Les colonies S sont petites, convexes, circulaires et transparentes. Les colonies R sont plus grandes, plus plates, plus opaques, et à contour irrégulier.

## Identification

Les réactions de la catalase et de l'oxydase sont négatives.

L'activité métabolique de cette bactérie est faible. Elle acidifie le glucose et le lactose mais pas l'esculine. Elle ne produit pas d'indole, ne possède pas d'uréase et ne réduit pas les nitrates.

Son caractère biochimique capital est la production d'$H_2S$ en 48 heures sur milieu de Kligler-Hajna ou milieu au sous-acétate de plomb. La production d'$H_2S$ ressemble au début à celle que l'on observe avec *Salmonella* Typhi. C'est le seul bacille à Gram positif aéro-anaérobie qui présente cette caractéristique.

L'identification peut se faire grâce à la galerie biochimique API Coryne® (bioMérieux) – caractères positifs : PYRA : pyrrolidonyl arylamidase (50 %) ; BNAG : n-acétyl-β-glucosaminidase (95 %) ; GLU : glucose (75 %), RIB : ribose (37 %), LAC : lactose (99 %).

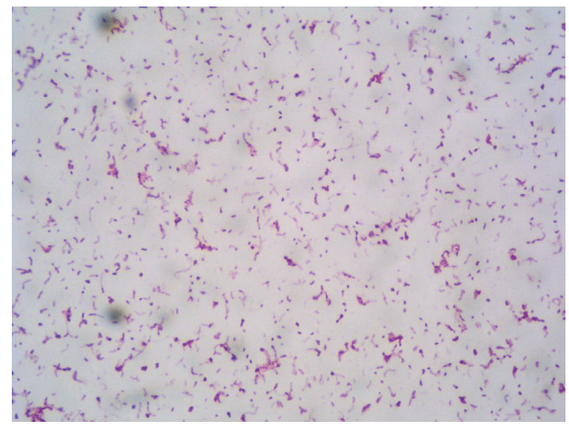


**Fig. 36.2.1.** – *Examen direct après coloration de Gram d'*E. rhusiopathiae.

Un autre caractère biochimique important est la présence quasi constante d'une coagulase libre que l'on recherchera de la même manière que pour l'identification de *Staphylococcus aureus*.

## Sensibilité aux antibiotiques

La pénicilline G est très active sur cette bactérie (CMI ≤ 0,06 mg/L) et est bactéricide. *Erysipelothrix* est également très sensible aux céphalosporines de troisième génération comme le céfotaxime ou la ceftriaxone. Une bonne sensibilité à la ciprofloxacine a également été rapportée ($CMI_{90}$ à 0,06 mg/L). Ce germe est également sensible aux macrolides et lincosamides (mais ceux-ci ne sont que bactériostatiques) ainsi qu'aux tétracyclines.

En revanche il est naturellement résistant aux aminosides, aux glycopeptides, aux sulfamides et au triméthoprime.

Aucune résistance aux bêta-lactamines n'a été décrite. Une résistance acquise aux macrolides, lincosamides et tétracyclines a été rapportée.

Le traitement de l'endocardite à *Erysipelothrix* repose sur la pénicilline G à forte dose (12 MU/j). Le céfotaxime et la ceftriaxone constituent une alternative mais pas les macrolides et lincosamides qui ne sont que bactériostatiques.

### Résumé des caractères importants

- bacille à Gram positif aéro-anaérobie ;
- primoculture favorisée par une atmosphère enrichie en $CO_2$ ;
- immobile, non sporulé ;
- court et fin avec une tendance à donner des filaments flexueux ;
- α-hémolytique ou non sur gélose au sang ;
- dissociation fréquente avec petites colonies S et grandes colonies R ;
- réactions de la catalase et de l'oxydase négatives ;
- $H_2S$ + sur milieu de Kligler-Hajna en 48 heures ;
- identification possible par la galerie API Coryne® ;
- test de la coagulase libre positif.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

BROOKE CJ, RILEY TV. *Erysipelothrix rhusiopathiae* : bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. J Med Microbiol 1999 ; 48 : 789–99.

BROUQUI P, RAOULT D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev 2001 ; 14 : 177–207.

HANSEN W, BILLE J. *Erysipelothrix*. In : Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2000. p. 957–63.

NASSAR IM, DE LA LLANA R, GARRIDO P, MARTINEZ-SANZ R. Mitro-aortic infective endocarditis produced by *Erysipelothrix rhusiopathiae* : case report and review of the literature. J Heart Valve Dis 2005 ; 14 : 320–4.

PHILIPPON A, PAUL G. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In : Bactériologie médicale. 2e éd Paris : Flammarion ; 1989. p. 859–68.

REBOLI AC, FARRAR WE. *Erysipelothrix rhusiopathiae* : an occupational pathogen. Clin Microbiol Rev 1989 ; 2 : 354–9.

## Chapitre 36.3

# *Lactobacillus*

J. Tankovic

## Généralités, taxonomie

Les lactobacilles font partie, comme les *Streptococcaceae*, des bactéries lactiques. Celles-ci se définissent comme des bactéries à Gram positif aéro-anaérobies utilisant les hydrates de carbone comme principale source d'énergie, le produit de ce métabolisme étant uniquement ou majoritairement l'acide lactique.

Le métabolisme énergétique des *Lactobacillus* est exclusivement fermentaire. Ce genre est classiquement divisé en trois sous-genres : *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*. Cette séparation est fondée sur des différences au niveau des voies de fermentation (tableau 36.3.1).

Des travaux plus récents de biologie moléculaire ont individualisé trois groupes A, B et C. Ceux-ci ne correspondent pas complètement aux trois sous-genres susdécrits.

La biologie moléculaire a aussi permis de mieux appréhender la grande diversité de ce genre bactérien. J.-P. Euzéby recense 173 espèces (en 2011) sur son site Internet (www.bacterio.cict.fr).

**TABLEAU 36-3-1**

**Caractéristiques des trois sous-genres de *Lactobacillus*.**

| *Caractéristiques* | *Sous-genre* | | |
|---|---|---|---|
| | *Thermobacterium* | *Streptobacterium* | *Betabacterium* |
| Voie fermentaire | Homofermentaire stricte | Hétérofermentaire facultative | Hétérofermentaire stricte |
| Voie de fermentation du glucose | Homofermentation | Homofermentation | Hétérofermentation |
| Voie de fermentation des pentoses | Non fermentés | Hétérofermentation | Hétérofermentation |
| Production de gaz carbonique | Non | Oui pour les pentoses | Oui |
| Culture à 45 °C | + | – | – |
| Culture à 15 °C | – | + | + |
| Résistance naturelle aux glycopeptides | Non | Oui | Oui |
| Principales espèces | ***L. acidophilus***<br>*L. delbrueckii*<br>*L. gasseri*<br>*L. helveticus*<br>*L. jensenii*<br>*L. salivarius* | ***L. casei***<br>***L. paracasei***<br>***L. plantarum***<br>***L. rhamnosus***<br>*L. curvatus* | *L. brevis*<br>*L. cellobiosus*<br>*L. confusus*<br>*L. fermentum*<br>*L. reuteri* |

**Les plus importantes sont en gras.**

## Habitat et pouvoir pathogène

Les lactobacilles sont largement répandus dans la nature, essentiellement au niveau des végétaux, et on les retrouve donc naturellement dans les aliments. Ils sont de plus largement utilisés dans l'industrie alimentaire en tant que ferments. Mais certaines espèces peuvent au contraire gâter la qualité des aliments ou des boissons. Ils sont également utilisés en tant que probiotiques dans l'alimentation animale et dans l'industrie pharmaceutique.

On les retrouve aussi comme commensaux chez l'animal et l'homme, surtout au niveau de la partie supérieure du tractus digestif (cavité buccale mais aussi de l'iléon et du vagin (flore de Döderlein).

Ces bactéries sont des pathogènes opportunistes rares mais qui causent des infections sérieuses : endocardite le plus fréquemment, bactériémie, abcès souvent polymicrobien. *L. rhamnosus* est l'espèce la plus fréquemment impliquée (environ un tiers des cas). Les autres espèces, que l'on peut identifier de façon non exceptionnelle, sont *L. acidophilus, L. casei*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*.

## Morphologie

Les lactobacilles sont des bacilles à Gram positif, non sporulés et immobiles. Le caractère Gram positif peut manquer, notamment pour les cultures âgées. Ils ont une morphologie régulière et non ramifiée, ce qui les différencie des corynébactéries et des *Actinomyces*. Leur longueur est variable, allant de bacilles longs et fins à des formes coccobacillaires (c'est le cas de *L. rhamnosus*). Ils se groupent souvent en chaînes.

## Mise en culture

La très grande majorité des souches sont anaérobies aérotolérantes. Quelques souches sont anaérobies strictes. Les atmosphères de culture à utiliser pour leur croissance sont donc l'anaérobiose et/ou l'air enrichi de 5 ou 10 % de $CO_2$. L'optimum thermique de la plupart des espèces est de 37 °C. Leur métabolisme exclusivement fermentaire fait que leur culture s'accompagne d'une forte acidification à laquelle ils sont bien adaptés : le pH optimal de croissance de la plupart des espèces est de 5,5.

Leurs besoins nutritionnels sont très complexes. Le milieu le plus adapté à leur culture est le milieu de Man, Rogosa et Sharpe (MRS ; encadré 36.3.1). Sur ce milieu, les colonies se développent en 24 à 48 heures, sont incolores ou blanchâtres et crémeuses ou granuleuses. Mais les lactobacilles cultivent également, bien que plus difficilement, sur gélose enrichie en sang frais ou cuit (fig. 36.3.1).

## Identification

Les lactobacilles sont dépourvus de cytochrome et donc d'activité catalasique. Cependant, certaines souches de *L. casei* et *L. plantarum* peuvent synthétiser une catalase sur milieu au sang ou présenter une activité catalasique d'origine non cytochromique. Le test à la benzidine demeure bien sûr négatif. La réaction de l'oxydase est également négative.

Le diagnostic d'espèce peut être difficile à faire par les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Il repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API 50CH® (bioMérieux) avec utilisation du milieu pour lactobacilles est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable. Le diagnostic d'espèce moléculaire est certainement plus précis : séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S ou profil de restriction de l'espace intergénique 16S-23S.

**ENCADRÉ 36.3.1**

### Milieu MRS

Constitution du milieu MRS pour 1 litre
- Glucose : 20 g
- Peptone trypsique de caséine : 15 g
- Extrait de viande : 5 g
- Acétate de sodium : 5 g
- Phosphate bipotassique : 2,4 g
- Citrate d'ammonium (diammonique) : 2 g
- Tween 80® : 1 ml
- Sulfate de magnésium : 0,2 g
- Sulfate de manganèse : 0,05 g

Ce milieu peut être gélosé (15 g pour 1 l).
Le pH final est de 6,4.
Autoclaver 20 minutes à 120 °C.

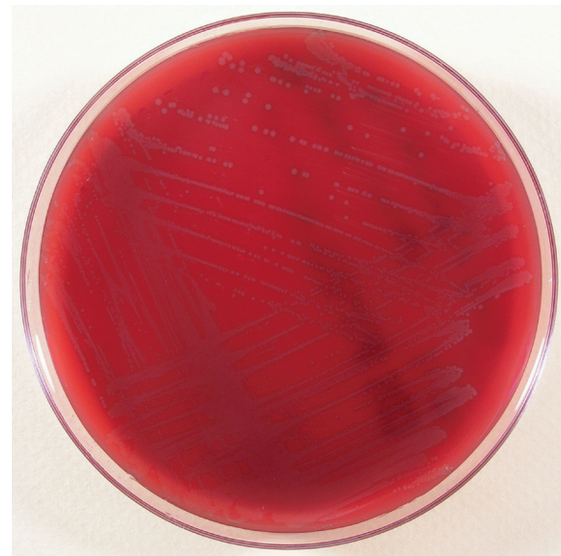


**Fig. 36.3.1.** – *Aspect des colonies de* Lactobacillus *sur gélose au sang.*

**Résumé des caractères importants pour l'identification**

- bacilles à Gram positif réguliers, non ramifiés ;
- groupés en chaînes ;
- non sporulés ;
- immobiles ;
- anaérobies aérotolérants ou plus rarement anaérobies stricts ;
- réactions de la catalase et de l'oxydase négatives ;
- culture abondante sur milieu MRS ;
- absence de β-hémolyse sur gélose au sang ;
- culture à pH 6 ;
- identification d'espèce : galerie API 50CH® ou séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S.

## Sensibilité aux antibiotiques

Le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) a récemment publié des recommandations concernant les bactéries peu fréquemment isolées ou difficiles à cultiver, incluant les lactobacilles, *Pediococcus et Leuconostoc* (tableau 36.3.2)

Le CLSI ne recommande pas la méthode des disques en milieu gélosé. En revanche les valeurs obtenues par la méthode du E-test apparaissent proches de celles de la microdilution. L'inoculum à utiliser est une suspension à 1 Mc Farland en sérum physiologique.

Les espèces hétérofermentaires sont naturellement résistantes à haut niveau aux glycopeptides. En revanche, les espèces homofermentaires sont sensibles. Les lactobacilles sont par ailleurs naturellement résistants à la fosfomycine, à l'acide fusidique, à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et au métronidazole.

Ils sont modérément sensibles à la pénicilline G, à l'amoxicilline et à l'imipénème avec absence d'effet bactéricide, et peu sensibles aux céphalosporines. La gentamicine et la nétilmicine ont une activité modérée qui est cependant nettement meilleure que celle sur les streptocoques-entérocoques. Une synergie bactéricide bêta-lactamines-aminoside a été démontrée par différentes méthodes : in vitro par la méthode de l'échiquier et par l'étude des cinétiques de bactéricidie mais aussi dans un modèle expérimental d'endocardite du lapin.

Les macrolides et la clindamycine sont très actifs mais une résistance acquise est possible, bien que rare. Les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine ou la lévofloxacine ont une activité modérée, la moxifloxacine est plus efficace.

En ce qui concerne les nouvelles molécules anti-Gram plus, la daptomycine présente une bonne activité, mais des souches ayant une sensibilité diminuée à la daptomycine ont été décrites. L'activité du linézolide était bonne dans une étude ($CMI_{50}$ à 1 mg/L) mais dans un autre travail les CMI étaient plus élevées ($CMI_{50}$ à 4–8 mg/L).

Le traitement recommandé est l'association pénicilline G ou amoxicilline à forte dose (> 25 MU/j pour la pénicilline G, 200–250 mg/kg/j pour l'amoxicilline) + aminoside (habituellement la gentamicine). Dans les endocardites, un traitement inadéquat conduit à une rechute dans presque un cas sur deux.

**TABLEAU 36-3-2**

**Tests de sensibilité aux antibiotiques par microdilution pour *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Conditions techniques et critères d'interprétation (adapté du document CLSI M45-1).**

| *Antibiotique* | *Concentrations critiques CMI (mg/L)* | | |
|---|---|---|---|
| | S | I | R |
| Pénicilline G | ≤ 8 | - | - |
| Ampicilline | ≤ 8 | - | - |
| Imipénème | ≤ 0,5 | - | - |
| Gentamicine | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 |
| Vancomycine | ≤ 4 | 8–16 | ≥ 32 |
| Erythromycine | ≤ 0,5 | 1–4 | ≥ 8 |
| Clindamycine | ≤ 0,5 | 1–2 | ≥ 4 |

**Milieu : Bouillon Mueller-Hinton supplémenté avec 5 % de sang lysé de cheval Inoculum : Suspension de turbidité équivalente au standard McFarland 0,5 Incubation : 35 °C; air ambiant; 20–24 h.**

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Bernier M, Njomnang Soh P, Lochet A, et al. *Lactobacillus delbrueckii :* probable cause d'infections urinaires chez la femme très âgée. Pathol Biol 2011 (sous presse).

Cannon J, Lee T, Bolanos J, Danziger L. Pathogenic relevance of *Lactobacillus* : a retrospective review of over 200 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005 ; 24 : 31–40.

De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol 1960 ; 23 : 130–8.

Gasser F. *Lactobacillus*. In: Bactériologie médicale. 2e éd. Paris : Flammarion ; 1989. p. 835–43.

Goldstein EJC, Citron DM, Merriam V, et al. Comparative in vitro activities of XRP 2868, pristinamycin, quinupristin-dalfopristin, vancomycin, daptomycin, linezolid, clarithromycin, telithromycin, clindamycin, and ampicillin against anaerobic gram-positive species, actinomycetes, and lactobacilli. Antimicrob Agents Chemother 2005 ; 49 : 408–13.

Huys G, Vancanneyt M, D'haene K, et al. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. Res Microbiol 2006 ;157 : 803–10.

Klein G, Bonaparte C. *Lactobacillus*. In: Précis de bactériologie clinique. Eska ; 2000. p. 983–92.

Moreira J, Mota R, Horta M, et al. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. BMC Microbiol 2005 ; 23 : 5–15.

Tankovic J. Bactéries lactiques et *Erysipelothrix*. In : Antibiogramme. 2e éd. Paris : Eska ; 2006. p. 387–94.

Salminen M, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. *Lactobacillus* bacteremia : clinical significance, and patient outcome, with spezial focus on probiotic L. rhamnosus GG. Clin Infect Dis 2004 ; 38 : 62–9.

Tannock G. A special fondness for lactobacilli. Appl Environ Microbiol 2004 ; 70 : 3189–94.

## Chapitre 36.4

# *Listeria*

F. Denis, F. Garnier, M.-C. Ploy

Les *Listeria* sont des petits bacilles à Gram positif non sporulés, mobiles.

*Listeria monocytogenes* est responsable de la listériose qui est une saprozoonose.

## Classification

La taxonomie moderne montre que le genre *Listeria* est sans relation avec celui des *Corynebacterium*, mais qu'il appartient à la branche des *Clostridium* à côté des *Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus.*

Le genre *Listeria* comprend actuellement six espèces : *L. monocytogenes* (la seule pathogène à la fois pour l'homme et l'animal), et des espèces génotypiquement apparentées, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri, L. welshimeri.* Pour *L. grayi* ainsi que *L. murrayi*, avec laquelle elle a été récemment regroupée, un genre distinct, *Murraya,* a été proposé.

## Habitat et pouvoir pathogène

### *Habitat*

*L. monocytogenes* est une bactérie saprophyte et ubiquitaire. Elle est très répandue au niveau du sol, des eaux, des végétaux et se retrouve dans les matières fécales de mammifères sains (homme et nombreuses espèces animales). Cette espèce est retrouvée dans des aliments d'origine animale (lait, viande, charcuterie, poissons, fromages, etc.) ou d'origine végétale (crudités, choux, etc.). C'est une bactérie très résistante dans le milieu extérieur pouvant survivre 1 à 2 ans. De plus, elle peut se multiplier à +4 °C et survivre plusieurs années au froid.

Les concentrations de *L. monocytogenes* peuvent atteindre 100 à 1000 UFC/g de viande et même 10 000 000 UFC/g pour les fromages. La contamination de l'aliment peut survenir à n'importe quelle étape de sa production (matière première, transformation, distribution), mais aussi chez le consommateur dans le réfrigérateur.

### *Épidémiologie* (tableau 36.4.1)

La contamination de l'homme est rarement directe au contact d'animaux infectés ou interhumaine ; elle est pratiquement toujours indirecte, liée à l'ingestion d'aliments contaminés.

L'incidence des infections va, en France, selon les années, de 3,8 à 7,9 par million d'habitants.

Le terrain (grossesse, immunodépression, âge) joue un rôle important dans le développement d'une maladie ; dans la vie quotidienne, les expositions sont très fréquentes, sans conséquence pour les sujets sains (on estime à 1 à 20 % les porteurs sains).

Les cas de listériose humaine surviennent soit de façon sporadique, soit sous forme d'épidémies, parfois à grande échelle. Ainsi, en 1992, une épidémie en France à partir

**TABLEAU 36-4-1**

**Principaux syndromes cliniques associés à *Listeria monocytogenes* (selon Schlech).**

| | |
|---|---|
| Méningites néonatales | Hépatites |
| Méningoencéphalites de l'adulte | Abcès hépatiques |
| Rhombencéphalites | Infections cutanées (contact avec animaux) |
| Bactériémies enfants et adultes | Endophtalmies |
| Endocardites primitives ou sur prothèse | Gastroentérites fébriles |
| Péritonite spontanée | Péritonites sur dialyse péritonéale |
| Pneumonies | Arthrites septiques |
| Ostéomyélites | |

de la consommation de langue de porc en gelée a rassemblé 279 cas.

Des cas d'infections nosocomiales ont aussi été rapportés, notamment dans les maternités, et sont le plus souvent la conséquence de non-respect des règles d'hygiène.

En France, la listériose est une maladie à déclaration obligatoire. Les souches isolées doivent être transmises au Centre national de référence (CNR) localisé à l'Institut Pasteur à Paris.

### *Pouvoir pathogène et physiologie*

La listériose se manifeste sous différentes formes :

- la forme **maternofœtale** regroupe selon les années entre 20 et 50 % des cas. La femme enceinte peut présenter, en cours de grossesse, une maladie initialement discrète pseudogrippale avec parfois des hémocultures positives ; cet épisode peut être spontanément résolutif ou guéri par une antibiothérapie non spécifique. Chez la femme enceinte, l'infection a toujours lieu au cours des deux premiers trimestres de la grossesse. La plupart des listérioses sont décrites après le 5e mois de grossesse. Avant le 5e mois de grossesse, l'infection peut entraîner un avortement ; plus tardivement, elle peut être à l'origine d'un accouchement prématuré. Le fœtus s'infecte soit in utero par voie sanguine (90 % des cas), soit lors du passage de la filière génitale (< 10 % des cas). La listériose néonatale peut se manifester sous forme d'une infection précoce consécutive à une infection in utero avec souvent rupture prématurée des membranes. Des manifestations peuvent survenir dans les cinq premiers jours de vie, mais peuvent aussi débuter dès les premières heures de vie. L'enfant peut présenter une forme septicémique voire méningée, plus rarement localisée (pulmonaire, conjonctivale). Les formes généralisées constituent le gravissime tableau polyviscéral dit *granulomatosis infanti septica* dans lequel la phase septicémique peut être associée à une éruption maculopapuleuse. En l'absence de traitement, cette forme septicémique grave est rapidement mortelle. Dans certains cas, les manifestations sont différées 18 à 60 jours après l'accouchement, à type notamment de méningite, l'enfant étant en contact avec les *Listeria* lors de son passage dans la filière génitale maternelle. Des séquelles à type d'hydrocéphalie sont possibles ;
- la forme de **l'adulte** concerne souvent, mais pas toujours, des sujets débilités (hémopathies, cancers, traitements immunosuppresseurs, diabétiques, dialysés). Il s'agit le plus souvent de septicémies, de méningites ou méningo-encéphalites.

Des formes localisées, beaucoup plus rares, ont été observées : atteintes oculaires, cutanées, urinaires, etc., mais aussi des endocardites et ostéomyélites pour lesquelles le diagnostic n'est évoqué que devant l'isolement de *L. monocytogenes*.

*L. monocytogenes* est une bactérie intracellulaire facultative. Après ingestion de l'aliment contaminé, les bactéries à partir de l'intestin vont gagner les ganglions lymphatiques puis la circulation sanguine. Les bactéries se multiplient dans la rate et le foie, mais l'immunocompétent fait généralement une infection asymptomatique.

Si l'inoculum est lourd ou chez des patients fragilisés (femme enceinte, immunodéprimés, cirrhoses, etc.), ou génétiquement prédisposés, le système immunitaire ne contrôle pas l'infection ; les bactéries vont être libérées dans le sang et vont se multiplier préférentiellement dans le placenta ou le système nerveux central.

Quelle que soit la forme clinique, la mortalité et de 20 à 30 %.

## Diagnostic bactériologique

### *Diagnostic direct*

#### Prélèvements

Des hémocultures doivent être systématiquement pratiquées en cours de grossesse devant toute suspicion d'infection.

Chez le nouveau-né, liquide gastrique et méconium sont prélevés dans le cadre d'un dépistage. En cas de suspicion clinique d'infection, une ponction lombaire et des hémocultures, prélèvements pharyngés, conjonctivaux et cutanés sont pratiqués.

Chez la mère, les prélèvements concernent lochies, liquide amniotique, placenta. Le prélèvement vaginal ne montre une culture positive à *Listeria* que dans les quelques jours entourant l'accouchement.

L'examen du placenta peut parfois montrer macroscopiquement des nodules listériens. Dans les méningites, on observe généralement une cytologie modérée : 100 à 500 éléments/mm$^3$ avec une formule panachée polynucléaires-lymphocytes qui doit faire suspecter *L. monocytogenes* même en l'absence d'examen direct évocateur. Il est possible d'avoir des méningites à liquide clair (20 à 30 éléments/mm$^3$), mais aussi des méningites purulentes à prédominance de polynucléaires neutrophiles.

Différents prélèvements de lésions cutanées, urines, voire LCR, hémocultures permettent l'isolement non attendu de *L. monocytogenes*.

## Transport

Il n'y a pas d'exigence particulière, la bactérie étant résistante. Le prélèvement, s'il n'est pas à traiter en urgence, peut être stocké à +4 °C avant ensemencement.

## Examen direct

*L. monocytogenes* est un petit bacille à Gram positif (0,5 à 1,2 µm) ; il peut être isolé ou en courtes chaînettes (fig. 36.4.1). Des formes plus longues et des amas voire des aspects en palissade peuvent se voir dans les cultures, pouvant les confondre avec des corynébacteries.

Les LCR sont généralement paucibacillaires et les bactéries peuvent être intra- ou extracellulaires.

## Culture

*L. monocytogenes* cultive bien sur milieux usuels, la croissance étant favorisée par sérum (1 %) ou sang (5 %).

La croissance est obtenue en aérobiose, voire en atmosphère microaérophile. Les milieux sont généralement placés à 37 °C, mais des enrichissements en bouillon laissés à 4 °C ont été proposés sans que le gain soit flagrant.

Pour la culture, on tentera l'ensemencement direct de :

- **milieux nutritifs** où la croissance est généralement observée après 18 heures à 37 °C. On utilise une gélose trypticase-soja sur laquelle on observe des petites colonies, translucides qui présentent une iridescence bleu-vert en lumière oblique ou une gélose au sang (mouton, cheval, etc.) permettant en outre d'observer une étroite zone d'hémolyse rendue visible en déplaçant la colonie ou potentialisée par le CAMP-test. Le CAMP-test est réalisé en utilisant une gélose trypticase, soja contenant 5 % d'hématies de mouton, en pratiquant à la surface des stries perpendiculaires de la souche de *Listeria* et d'une souche de *Staphylococcus aureus* (CIP 5710) ou de *Rhodococcus equi* (CIP 5869). L'hémolyse est accentuée autour de la souche de *S. aureus* et *L. monocytogenes* et autour de la souche de *R. equi* pour *L. ivanovii* ;

Fig. 36.4.1. – *Image de* Listeria *en microscopie à balayage.*

- **milieux sélectifs :** on peut utiliser des géloses au sang rendues sélectives par l'addition de colistine ou d'acide nalidixique, de chlorure de lithium et/ou de cycloheximide. À noter que la culture est possible sur milieux hostiles (hypersalés, biliés) ou sur gélose de MacConkey. Depuis peu, des milieux utilisant des substrats chromogènes (CHE-glucoside) avec du gluconate ferreux permettent de détecter les colonies de *L. monocytogenes* produisant un pigment noir, ou bien on utilise la détection de β-glucosidase ou de phospholipase C. Différents milieux chromogènes sont commercialisés (ALOA®, BMC *L. monocytogenes*®, CHROM Agar®, etc.) et ont été évalués par l'International Organization for Standardization (Genève).

## Identification

La coloration de Gram permet l'observation des bacilles à Gram positif plus longs qu'à l'examen direct, parfois en courtes chaînettes ou en amas. L'examen entre lame et lamelle de cultures en bouillon conduites parallèlement à 22 et à 37 °C permet d'observer une mobilité à 22 °C et une quasi-absence à 37 °C.

Une orientation diagnostique (outre la mobilité à 22 °C) est obtenue par le caractère catalase positive et l'hydrolyse rapide de l'esculine (en 2 à 3 heures).

Le diagnostic de genre et d'espèce est obtenu en recourant à des galeries miniaturisées (API *Listeria*®, bioMérieux) ou à des systèmes automatisés (Vitek®), éventuellement complétés par des tests complémentaires telle la recherche d'une activité phospholipasique. Les caractères différentiels au sein du genre sont regroupés dans le tableau 36.4.2. Seule l'espèce *L. monocytogenes* est pathogène pour l'homme ; quelques rares isolements de *L. ivanovii* ont été rapportés chez l'homme. L'identification du genre *Listeria* et de l'espèce est possible par Maldi-Tof (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight*).

Après avoir porté le diagnostic d'espèce, la souche sera caractérisée par détermination de marqueurs relevant, pour certains, du laboratoire de routine, pour d'autres de laboratoires spécialisés :

- Sérovars : il existe 15 Ag somatiques O (I à XV) et 5 Ag flagellaires, H (A à E) permettant de définir 16 sérovars (Paterson, Seeliger et Donker-Voet). Les caractérisations reposent en routine sur la mise en évidence par agglutination sur lame d'Ag O (sérum anti 1/2 et anti 4 Difco). Les sérovars 1/2a, 1/2b et surtout 4b regroupent près de 70 % des souches isolées en France chez l'homme. Le sérotypage peut également être réalisé par PCR multiplex à partir de la séquence du gène *prs* et de 4 séquences d'autres gènes permettant « le sérogroupe PCR ». Sur les 322 cas de listérioses recensées en France par le CNR en 2009, les groupes se répartissaient ainsi : PCR IVb (sérovars 4b, 4d ou 4e) = 50 %, PCR IIa (sérovars 1/2a ou 3a) = 28 %, PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b ou 7) = 14 % et PCR IIc (sérovars 1/2c ou 3c) = 8 %. Les formes materno-fœtales appartenant à 69 % au sérogroupe PCR IVb. Les

**TABLEAU 36-4-2**

**Caractères différentiels des espèces du genre *Listeria* et de *L. grayi* et *L. murrayi* (d'après J. Rocourt, H. Seeliger).**

| | *L. monocytogenes* | *L. ivanovii** | *L. innocua* | *L. welshimeri* | *L. seeligeri* | *L. grayi** | *L. murrayi*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hémolyse | + | ++ | – | – | + (faible) | – | – |
| *CAMP-test* | | | | | | | |
| *S. aureus* | + | – | – | – | + | – | – |
| *R. equi* | – | + | – | – | – | – | – |
| *Acidification* | | | | | | | |
| D-xylose | – | + | – | + | + | – | – |
| L-rhamnose | + | – | v | v | – | – | v |
| Mannitol | – | – | – | – | – | + | + |
| α-méthyl D-mannoside | + | – | + | + | – | + | |
| Nitrate réductase | – | – | – | – | – | – | + |
| Pathogène pour souris | + | + | – | – | – | – | – |
| Pouvoir pathogène naturel | Animaux Homme | Ovins | – | – | – | – | – |
| Sérovars | 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, 7 | 5 | 6a, 6b, 4ab, s.n.d. | 6a, 6b | 1/2b, 4c, 4d, 6b s.n.d. | | |

* L'espèce *L. ivanovii* comporte deux subsp. *ivanovii* et *londoniensis* qui sont respectivement ribose + et –.
** *Murraya.*
CAMP : Christie, Atkins, Munch-Petersen ; s.n.d. : sérovar non désigné.

sérovars « classiques » 1/2a, 1/2b et surtout 4b regroupent près de 70 % des souches isolées en France chez l'homme.

- lysotype relevant de laboratoires spécialisés à l'aide de lots de phages permettant de typer plus de la moitié des souches ;
- méthodes moléculaires : dans le cas d'épidémies où la comparaison fine des souches bactériennes est nécessaire, c'est l'électrophorèse en champ pulsé qui est la méthode la plus discriminante.

## Virulence

La difficulté consiste à distinguer les souches virulentes ou non virulentes. Le caractère hémolytique et/ou la recherche du gène de l'hémolysine-β sont en faveur d'une virulence. Mais la technique la plus couramment pratiquée pour identifier les souches virulentes repose sur le test d'Anton (fig. 36.4.2). Il consiste en l'instillation au niveau du sac conjonctival d'un œil de lapin d'une suspension bactérienne (3 gouttes d'une culture de 18 heures en bouillon diluées dans 5 ml d'eau distillée) ; celle-ci est suivie, si la souche est virulente, de l'apparition d'une conjonctivite purulente (avec présence à l'écouvillonnage de grandes cellules recouvertes ou contenant des bacilles caractéristiques). Cette recherche doit être pratiquée dans une animalerie protégée.

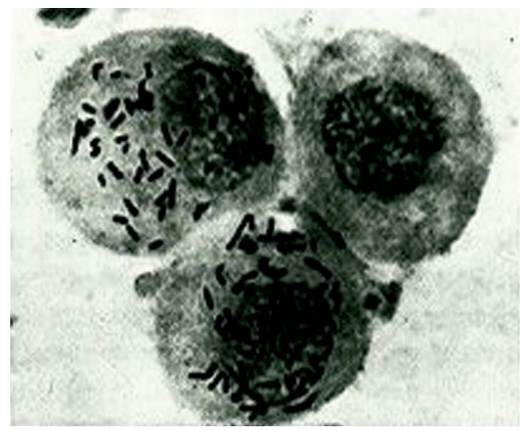


**Fig. 36.4.2.** – *Test d'Anton.*

À noter que *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont pathogènes pour les souris inoculées par voie intrapéritonéale.

### Diagnostic rapide

Des recherches antigéniques ont été conduites, visant à visualiser les bactéries à l'aide d'anticorps poly- ou monoclonaux fluorescents, ou à caractériser des antigènes notamment par technique immuno-enzymatique (ELISA) avec une sensibilité insuffisante.

Des techniques de PCR (qualitatives ou quantitatives) pratiquées directement sur produit pathologique, notamment LCR, et fondées sur la détection de gènes de virulence sont prometteuses. Certaines sont commercialisées et adaptées sur automates (Light Cycler, Taqman, etc.), d'autres sont des techniques maison détectant notamment le genre *hly*.

### Diagnostic indirect

Les techniques sérologiques d'agglutination utilisant des suspensions antigéniques O et H sont décevantes par manque de sensibilité et de spécificité (communautés antigéniques avec *Staphylococcus* et *Enterococcus*) et sont sans intérêt en routine.

Plus encourageants sont les résultats obtenus par dosage d'anticorps antilistériolysine O (ALLO) par technique ELISA ou *immuno-blot* recherchant les anticorps dirigés contre un polypeptide aminoterminal de la listériolysine (fragment de la protéine, LLO-411). Mais ces deux derniers sérodiagnostics ne sont pas commercialisés.

### Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est déterminée par diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton.

*L. monocytogenes* est sensible à l'ampicilline, mais les céphalosporines, notamment de 3e génération, sont inactives. Les fluoroquinolones ont une activité réduite. En revanche, les aminosides sont actifs, surtout la gentamicine et la tobramycine. La fosfomycine est inactive sur *Listeria*. *L. monocytogenes* est naturellement résistante à l'acide nalidixique.

Le traitement de choix reste ampicilline + aminosides. Des résistances ont été signalées vis-à-vis de la rifampicine ou du triméthoprime–sulfaméthoxazole, de l'érythromycine, de la tétracycline.

L'antibiogramme comprendra la pénicilline, l'ampicilline, la gentamicine, la tétracycline, l'érythromycine, le chloramphénicol et l'association triméthoprime–sulfaméthoxazole.

Si l'épidémiologie des listérioses est bien suivie et contrôlée en France, nous ne sommes pas à l'abri de poussées épidémiques de grande ampleur. Les cas doivent être déclarés par le biologiste, les souches adressées au CNR, et les fiches d'enquête cas/témoin doivent être remplies pour chaque cas.

## Prévention

La prévention est surtout une éducation concernant le contrôle des aliments (chaîne du froid, phase de préparation, hygiène, etc.) et les consommateurs (hygiène alimentaire), notamment les femmes enceintes.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Listeria*. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 2000. p. 140–50.

Beumer RR, Hazeleger WC. *Listeria monocytogenes* : Diagnostic problems. Fems 2003; 35 : 191–227.

Bille JB, Catimel E, Bannerman E, et al. Api *Listeria*, A new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. Appl Environ Microbiol 1992; 58 : 1857–60.

Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43 : 2103–8.

Cottin J, Freland C, Carbonnelle B. Les bacilles a Gram positif (à l'exception des anaérobies). In : Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris : Simep; 1987. p. 175–86.

Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multipex PCR. J Clin Microbiol 2004; 42 : 3819–22.

Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* : A review. Fems 2004; 29 : 851–75.

Gholizade HY, Poyard C, Juvin M, et al. Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncatured forms of listeriolysine. J Clin Microbiol 1996; 34 : 1391–2145.

Jacquet C, Rocourt J, Martin P. In : *Listeria* et listériose. Paris : ESKA; 2007. p. 1206–18.

Schlech WE. Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. In : Gram-positive pathogenes. 2e ed Washington DC : ASM Press; 2006. p. 601–8.


**ADRESSE UTILE**

**Centre national de référence des Listeria**
Institut Pasteur
5, Rue du Docteur Roux,
75724 Paris cedex 15
Centre collaborateur OMS pour les listérioses d'origine alimentaire

## Chapitre 36.5

# *Nocardia*

C. Martin

## Généralités

Les *Nocardia* sont des bactéries appartenant à l'ordre des Actinomycétales aux côtés des espèces des genres *Streptomyces, Actinomyces* et *Mycobacterium.*

Les *Nocardia* sont des bacilles à Gram positif aérobies stricts qui peuvent former des branchements et des filaments constituant un mycélium vrai, septé, comme les champignons. Certaines espèces possèdent un certain degré d'acido-alcoolo-résistance.

Les données obtenues par les techniques de biologie moléculaire ont permis de démanteler le complexe *N. asteroides* et de mettre en évidence une diversité plus importante à l'intérieur de ce genre en individualisant plus de 80 espèces.

## Habitat et pouvoir pathogène

Les *Nocardia* sont des bactéries du sol que l'on trouve aussi au niveau des plantes et de l'eau. Elles colonisent également l'oropharynx, le tube digestif et la peau de l'homme et des animaux.

Les nocardioses animales concernent principalement le bétail (mammites), les chiens, les chats. Les manifestations cliniques des nocardioses sont diverses (pulmonaires, cutanées, cérébrales et généralisées ; tableau 36.5.1).

La nocardiose pulmonaire se présente après inhalation de poussières, de spores ou de mycélium sous forme d'une pneumonie chronique. Une dissémination de l'infection peut alors survenir avec des métastases secondaires (péricardite, pleurésie, médiastinite, abcès cérébral et cutané). Ces infections surviennent surtout chez des sujets immunodéprimés.

Les formes cérébrales peuvent être primitives et se présentent sous forme d'abcès cérébral (localisation unique ou multiple) évoluant vers une méningo-encéphalite le plus souvent sans atteinte méningée.

Les nocardioses présentent un polymorphisme clinique en relation avec le statut immunitaire du patient. Chez les sujets immunocompétents, les abcès, les lymphangites et les mycétomes surviennent après un traumatisme (épines, piqûres d'insecte, morsures) au niveau des parties du corps découvertes et ne disséminent pas ou rarement pour donner une forme lymphocytaire sporotrichoïde.

Les mycétomes sont des infections chroniques localisées, siégeant le plus souvent aux membres inférieurs, observés en région tropicale ou subtropicale. Elles sont causées soit par des *Actinomyces* anaérobies, soit par des champignons.

## Diagnostic bactériologique

Les prélèvements reçus au laboratoire sont très divers et fonction de la forme clinique observée : liquides de ponction (LCR, pleural), prélèvements de tissus (cutané, osseux, ganglionnaire, péritonéal et cérébral) et pulmonaires (expectoration, aspiration bronchique, brossage bronchique, liquide bronchoalvéolaire [LBA]).

**TABLEAU 36-5-1**

**Agents étiologiques des différentes formes cliniques de nocardioses.**

| *Type d'infection* | *Espèce* | *Forme clinique* |
|---|---|---|
| Cutanée primitive | *N. abscessus, N. brasiliensis, N. otitidiscaviarum*<br>*N. beijinsensis* | Abcès, cellulite, mycétome |
| Pulmonaire | *N. abscessus, N. asteroides, N. brasiliensis*<br>*N. cyriacigeorgica, N. farcinica, N. nova,*<br>*N. otitidiscaviarum, N. transvalensis, N. paucivorans* | |
| Disséminée | *N. abscessus, N. asteroides, N. cyriacigeorgica,*<br>*N. farcinica, N. transvalensis, N. pseudobrasiliensis,*<br>*N. veterana* | Patients immunodéprimés, leucémie, transplantés (rénaux, cardiaques) |
| Oculaire | *N. arthritidis, N. asiatica, N. asteroides IV, N. brasiliensis,*<br>*N. cyriacigeorgica, N. farcinica, N. neocaledoniensis,*<br>*N. otitidiscaviarum, N. pseudobrasiliensis,*<br>*N. transvalensis,* | |
| Système nerveux central | *N. farcinica, N. otitidiscaviarum* | |
| Péritonite | *N. asteroides* | |

La recherche de *Nocardia* devra être spécifiée dès la prescription de l'examen afin que les moyens techniques et qu'une prolongation des temps d'incubation soient mis en œuvre.

Il n'existe pas de méthode sérologique pour le diagnostic de nocardiose.

### Examen macroscopique

Les liquides de ponction seront examinés macroscopiquement à la recherche de granulations et de grains évocateurs. Ces granulations sont observées dans les infections à *N. brasiliensis*, mais aussi avec les autres espèces de *Nocardia* et avec les *Actinomyces*.

### Examen microscopique

Si des granulations sont observées, un examen entre lame et lamelle du pus dilué est pratiqué de telle sorte que les granulations soient écrasées pour rechercher la présence de ramifications et de filaments (fig. 36.5.1A). Après coloration de Gram, l'aspect des *Nocardia* est variable (filaments, bacilles, coccobacilles), tant au niveau de la forme que de l'homogénéité de la coloration.

Une acido-alcoolo-résistance partielle avec la technique de Kynioun modifiée est retrouvée de manière inconstante. Cette propriété qu'ils partagent avec *Rhodococcus* spp. les distingue des actinomycètes anaérobies (*Actinomyces*) et des *Streptomyces*.

### Culture

La culture de ces bactéries est aisée si l'on utilise des milieux en tube évitant la dessiccation lors de l'incubation prolongée de ces cultures (3 semaines).

La mise en culture des prélèvements pulmonaires devra être réalisée sans traitement de fluidification-décontamination utilisé pour les échantillons destinés à la recherche de mycobactéries, parce que ce traitement affecte leur croissance. Les milieux utilisés sont des géloses Colombia au sang de mouton (5 %), des géloses au sang cuit, le milieu de Löwenstein-Jensen, le milieu Sabouraud et le milieu BCYE (*buffered-charcoal yeast extract*) sans supplément antibiotique, utilisé pour la culture des légionelles.

Les colonies apparaissent généralement en 2 à 15 jours. Elles sont d'aspects variables avec présence en périphérie d'hyphes. Elles sont légèrement surélevées, cérébriformes. La couleur varie du blanc au beige ou du jaune orangé au rouge. Cette pigmentation est masquée par la présence d'un mycélium de couleur blanche (fig. 36.5.1B). À noter que les colonies ont tendance à s'incruster dans la gélose.

### Identification

L'identification phénotypique des *Nocardia* est une identification présomptive qui devra être le plus souvent confirmée par une technique de biologie moléculaire.

Outre les caractères d'orientation déjà évoqués (aspect des cultures, pigmentation, caractère aérobie strict), la détermination de la résistance au lysozyme, à la mitomycine C, au 5-fluoro-uracile à l'aide de disques, la présence d'une catalase, d'une nitrate réductase et d'une β-galactosidase permet une orientation vers le genre *Nocardia* (tableau 36.5.2). L'identification phénotypique doit être abandonnée au profit des méthodes moléculaires. Des résultats controversés ont été rapportés après utilisation des galeries APIZYM® (bioMérieux) ou HNID® (Dade Behring), qui permet la détection

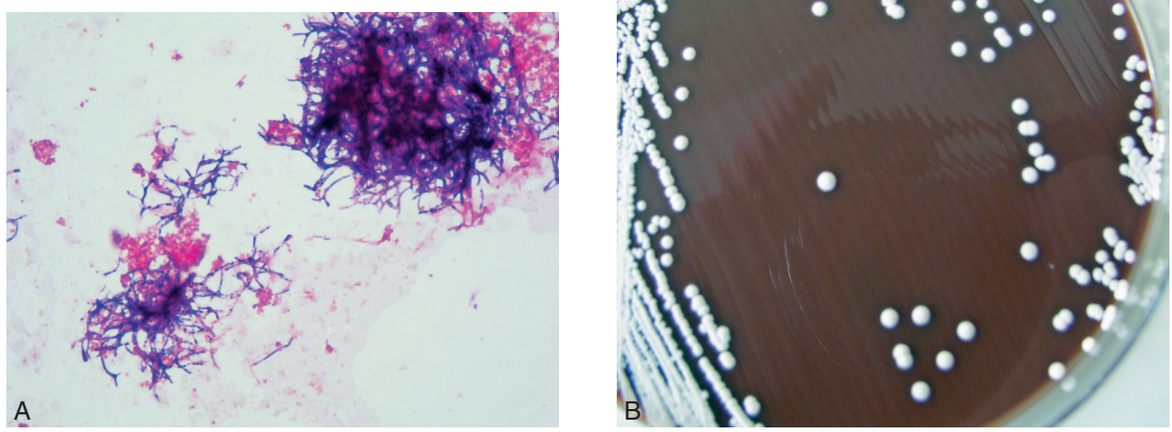



**Fig 36.5.1.** – *Examen direct après coloration de Gram d'une aspiration bronchique (formes filamenteuses et branchées) (A). Culture de* Nocardia *sur gélose au sang cuit (B).*

**TABLEAU 36-5.2**

**Caractères d'orientation des actinomycètes aérobies.**

| Caractères / Espèces | Mycélium aérien | Type respiratoire | Nitrate réductase | ONPG | Lysozyme | Mitomycine C | 5-fluorouracile |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Nocardia* | + | Aérobie | + | + | R | R | R |
| *Mycobacterium* | – | Aérobie | V | V | S | ND | ND |
| *Corynebacterium* | – | Aérobie-anaérobie | + | V | S | ND | ND |
| *Rhodococcus* | V | Aérobie | V | – | S | S | S |
| *Gordona* | V | Aérobie | + | – | S | S | S |
| *Tsukamurella* | V | Aérobie | – | + | R | R | R |

+ : positif ; – : négatif ; V : variable ; ND : non déterminé ; R : résistant ; S : sensible.

d'une vingtaine d'activités enzymatiques, ou de la galerie API 20C® (bioMérieux), qui permet la détermination de l'utilisation de substrats carbonés (auxanogramme). L'utilisation de disques Rosco® (EUROBIO) détectant des activités enzymatiques – pyrrolydonyl aminopeptidases, γ-glutamyl aminopeptidase, α-glucosidase et α-mannosidase – permet également d'orienter l'identification vers les principales espèces rencontrées en pathologie humaine. L'observation des résistances à certains antibiotiques permet de conforter un diagnostic d'espèce. Les principaux caractères d'identification sont présentés dans le tableau 36.5.3.

Les techniques d'identification moléculaire font appel au séquençage du gène codant l'ARN 16S ou d'un fragment de 441 paires de bases du gène *hsp65* codant la protéine de choc thermique de 65 KDa (annexes 36.5.1 et 36.5.2).

### Détection directe à partir de produits pathologiques

La détection génomique peut être réalisée directement à partir de produits pathologiques en utilisant des méthodes citées pour l'identification.

### Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques doit être effectuée sur toutes les souches isolées. Chaque espèce présente un profil de résistance particulier qui correspond le plus souvent aux résultats de l'identification moléculaire. Les antibiotiques les plus actifs sont l'amikacine, le linézolide, les cyclines et les associations triméthoprime–sulfaméthoxazole et amoxicilline–acide clavulanique.

**ANNEXE 36.5.1**

## Méthode de détermination de l'acidorésistance des actinomycètes et des *Nocardia* : méthode de Kinyoun modifiée

**Réactifs**

- Solution alcoolique saturée de fuchsine
  - Fuchsine basique : 4 g
  - Méthanol : 20 ml
- Solution aqueuse de phénol
  - Phénol : 48 g
  - Eau distillée : 600 ml
- Solution de travail
  - Mélanger les 2 solutions (fuchsine et phénol)
- Solution de décoloration
  - Acide sulfurique : 20 ml
  - Éthanol à 95° : 980 ml
- Solution de contre-coloration
  - Bleu de méthylène hydrosoluble (ou chlorure) : 0,3 g
  - Eau distillée stérile q.s.p. : 100 ml

**Technique**

- Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée 10 minutes sans chauffer
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis du mélange acide–alcool pendant 3 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène 2 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air

**TABLEAU 36-5-3**

**Caractères phénotypiques des principales espèces de *Nocardia*.**

| Caractères / Espèces | Croissance à 45° | Hydrolyse | | | | | | Activité enzymatique[a] | | | | Antibiotique[b] | | | | | | | Profil de résistance aux antibiotiques[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Caséine | Tyrosine | Hypoxanthine | Xantine | Esculine | Urée | PYR | γ-GLU | α-GLU | α-MAN | LNZ | AMC | CRO | IMI | AMK | CLA | CIP | |
| *N. asteroides* | – | – | – | – | – | – | + | – | – | + | – | S | R | S | S | S | R | R | VI |
| *N. abcessus* | – | + | – | – | – | – | + | – | + | + | – | S | S | S | V | S | R | R | I |
| *N. farcinica* | + | – | – | – | – | + | + | – | + | + | – | S | V | R | S | S | R | S | V |
| *N. nova* | – | – | – | – | – | – | V | – | + | – | – | S | R | S | S | S | S | R | III |
| *N. brasiliensis* | – | + | + | + | – | + | + | – | + | + | + | S | S | R | R | | R | R | ND |
| *N. otitidiscaviarum* | V | _ | – | + | + | + | + | – | – | – | – | S | R | R | R | S | | S | ND |
| *N. transvalensis* | – | – | – | + | – | + | + | + | + | + | + | S | ND | S | S | R | R | S | IV |
| *N. pseudobrasiliensis* | | + | + | + | – | + | – | – | + | + | + | ND | R | R | S | | S | S | ND |
| *N. cyriacigeorgica* | + | – | – | – | – | – | – | – | – | + | – | S | R | S | S | | R | R | VI |
| *N. paucivorans* | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | ND | S | S | V | | R | S | II |

+ : positif; – : négatif; V : variable; ND : non déterminé; R : résistant; S : sensible.

[a] PYR : pyrrolidonyl aminopeptidase; γGLU : γ-glutamyl aminopeptidase; αGLU : α-glucosidase et αMAN : α-mannosidase.

[b] AMC : amoxicilline + acide clavulanique; CRO : ceftriaxone; IMI : imipénem; AMK : amikacine; CLA : claritromycine; CIP : ciprofloxacine ; LNZ : Linezolide.

[c] D'après Wallace RJ Jr.

**ANNEXE 36.5.2**

**Méthode détection ou d'identification des gènes *ARN 16S* et *hsp*65 par amplification génique**

| Méthode Détection/ identification | Gène *hsp65* (441 pb) | Gène *ARN 16S* (606 pb) |
|---|---|---|
| Amorces | TB11 : 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'<br>TB 12 : 5'CTTGTCGAACCGCATACCCT-3' | Noc1 : 5'-GCTTAACACATGCAAGTCG-3'<br>Noc2 : 5'-GAATTCCAGTCTCCCCTG-3' |
| Mélange réactionnel | 2,5 U de *Taq* polymérase, 10 mM Tris-HCl [pH 9], 50 mM KCl, 1,5 µM $MgCl_2$, 200 µM, chaque désoxynucléoside triphosphate avec 10 µl d'extrait d'ADN (volume 25 µl) | |
| Amplification | 94 °C 1 min ; 55 °C 1 min ; 72 °C 1 min<br>Dénaturation initiale : 5 min94 °C,<br>extension finale : 10 min 72 °C | 94 °C 1 min ; 58 °C 1 min ; 72 °C 1 min<br>Dénaturation initiale : 5 min 94 °C,<br>extension finale : 5 min 72 °C |

**Séquençage :** utilisation des mêmes amorces

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Brow-elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev 2006 ; 19 : 259–82.

Devulder G, Perriere G, Baty F, Flandrois JP. BIBI, a Bioinformatics Bacterial Identification Tool. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 1785–7. http : //pbil.univ-lyon1.fr/bibi/.

Laurent F, Freney J, Boiron P. *Nocardia* et actinomycètes aérobies apparentés. In : Freney J, Hansen W, Bollet C, Leclerc R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2003 Section VI, chap 1.

Minero MV, Marin M, Cercenado E, Rabadan PM, Bouza E, Munoz P. Nocardiosis at the turn of the century. Medicine 2009 ; 88 : 250–61.

Rodriguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois JP, Boiron P, Laurent F. Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species. J Clin Microbiol 2006 ; 44 : 536–46.

Rodriguez-Nava V, Devulder G, Laurent F. Taxonomie et identification des *Nocardia* : évolution et perspectives. Bull Soc Fr Microbiol 2003 ; 18 : 177–84.

Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vanechoutte M, Delmée M. Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 2624–8.


**ADRESSE UTILE**


**Observatoire français des nocardioses**
Laboratoire de mycologie fondamentale et appliquée aux biotechnologies industrielles
Faculté de pharmacie, Université Claude-Bernard Lyon I
8, avenue Rockefeller
69 373 Lyon cedex 08


## Chapitre 36.6

# *Tropheryma whipplei*

C. Martin

## Généralités

La maladie de Whipple est une infection chronique et systémique due à la bactérie *Tropheryma whipplei*. Cette bactérie, visualisée dès 1961 par microscopie électronique, n'a été isolée qu'en l'an 2000, et cultivée sur culture cellulaire.

Cette bactérie avait auparavant été identifiée comme l'agent étiologique de la maladie de Whipple par séquençage d'un fragment du gène de l'ADNr 16S après

extraction d'une biopsie duodénale d'un patient atteint de cette maladie. *T. whipplei* est un bacille à Gram positif à GC % élevé, de 0,2 µm de diamètre sur 1,5 à 2,5 µm de longueur. Cette bactérie appartient au groupe des actinomycètes qui comprend notamment des espèces présentes dans le sol.

## Pouvoir pathogène et habitat

La maladie de Whipple ou lipodystrophie intestinale a longtemps été considérée comme une maladie métabolique responsable de troubles digestifs, notamment de diarrhées chroniques. En réalité, les manifestations cliniques sont variées :

- digestives (diarrhées, douleurs abdominales) ;
- articulaires (arthralgies) ;
- neurologiques (démences) ;
- cardiovasculaires (péricardites et endocardites à hémoculture négative) ;
- ophtalmologiques (uvéites).

La transmission de cette maladie est probablement orale. Le génome de la bactérie a été détecté dans l'environnement et chez certaines personnes asymptomatiques (salive et selles), suggérant que cette bactérie peut être commensale. La maladie survient majoritairement chez les sujets blancs, européens et nord-américains. La notion de terrain a été également évoquée avec un pic de fréquence chez les hommes d'environ 50 ans et chez des personnes présentant des anomalies immunologiques, notamment une baisse de production de l'interféron γ et du TNFα par les monocytes périphériques.

## Diagnostic biologique

Le diagnostic de la maladie de Whipple repose sur des examens non spécifiques (hémogramme, marqueurs de l'inflammation et étude histopathologique) et la mise en évidence d'une fraction du génome de la bactérie.

L'hémogramme peut montrer une hyperleucocytose qui est parfois inconstante et une anémie microcytaire hypochrome. Une élévation de la VS (vitesse de sédimentation) et de la CRP (protéine C-réactive) peut être également observée associée à une hypoalbuminémie et une hypocholestérolémie qui sont le signe d'une malabsorption digestive. L'étude anatomopathologique montre une entérite avec histiocytose de surcharge. La coloration au PAS (*periodic acid-Schiff*) des biopsies duodénales montre la présence de macrophages contenant du matériel PAS positif (fig. 36.6.1A). Des bacilles sont mis en évidence après coloration de Gram (fig. 36.6.1B) ou après imprégnation argentique de Warthin-Starry. La microscopie électronique permet la mise en évidence de la structure de la bactérie (fig. 36.6.2).

### *Diagnostic bactériologique*

Le diagnostic bactériologique est un diagnostic direct essentiellement génomique car la culture sur système cellulaire (HEL) à partir de biopsies est réservée aux laboratoires de référence.

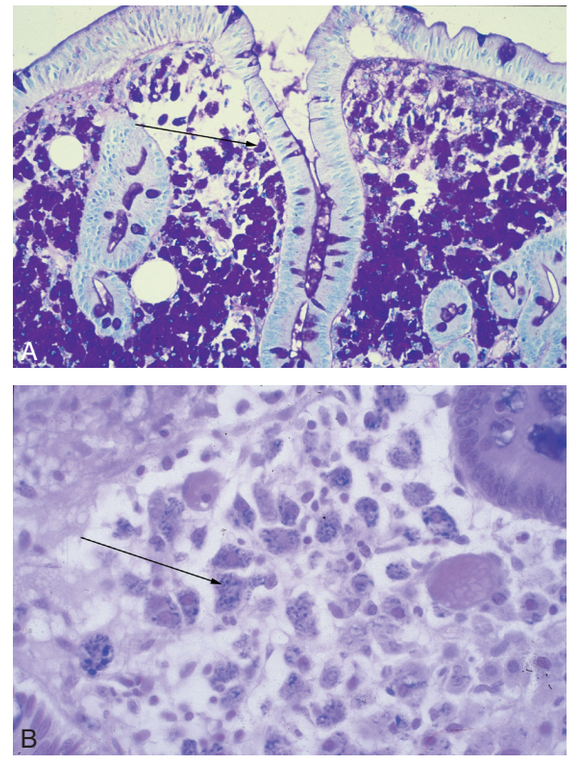



**Fig. 36.6.1.** – *Coloration au PAS (× 200) (A), et de Gram × 400 (B), d'une biopsie jéjunale.*
La coloration au PAS montre des macrophages spumeux contenant du matériel coloré. La coloration de Gram montre des bacilles à Gram positif regroupés en amas.
*Clichés de M. Delage-Corre (Limoges).*

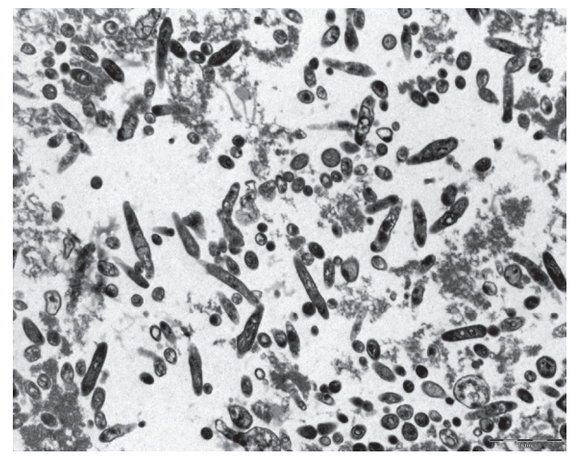


**Fig. 36.6.2.** – *Aspect de* Tropheryma whipplei *en microscopie électronique.*
*Cliché du Pr Drancourt.*

## Prélèvements

Le diagnostic bactériologique de routine est réalisé par amplification génique par PCR. Les prélèvements reçus au laboratoire sont très divers : biopsies duodénales, valves cardiaques, biopsies cérébrales, biopsies ganglionnaires, salive, avec aussi des liquides de ponction (articulaire, LCR, humeur aqueuse) et dans le sang total. Les prélèvements sont stockés à –80 °C jusqu'à l'analyse.

## Techniques

Les techniques d'amplification génique utilisées ont pour cibles l'ADN ribosomique 16S, le gène codant la protéine de choc thermique de 65 kDa et des séquences répétées.

La technologie en temps réel permet de raccourcir le temps de détection. Des exemples de protocoles sont présentés dans le tableau 36.6.1.

## Interprétation des résultats

Comme pour toute méthode de détection par amplification génique, on doit respecter strictement les protocoles afin d'éviter les contaminations de laboratoire. La détection du génome de la bactérie dans l'environnement et chez des sujets sains (selles, salive) nécessite une confrontation des résultats avec les données cliniques et histologiques avant d'attribuer un rôle étiologique dans la pathologie observée. Le diagnostic sérologique n'en est qu'au stade expérimental.

**TABLEAU 36-6-1**

**Exemples de techniques d'amplification génique utilisées dans la détection du génome de *Tropheryma whipplei*.**

| *Technique* | *Cible (taille en pb)* | Amorces | *Remarques* | *Références* |
|---|---|---|---|---|
| PCR + hybridation | ARN 165 (284 pb) | *WHIP1* : 5'-AGAGATACGCCCCCCGCAA-3'<br>*WHIP2* : 5'-ATTCGCTCCACCTTGCFGA-3'<br>*WHIP3* : 5'-TGGTACAGAGGGTTGCAATA-3'<br>(sonde) 3 min à 95 °C, 40 cycles (45 s à 95 °C, 1 min à 62 °C, 1 min à 72 °C), 2 min à 72 °C | Marquage de la sonde PCR ELISA DIG labeling® (Roche). Hybridation en milieu liquide *avec* le coffret PCR ELISA DIG® detection (Roche). | von Herbay A. *et al.* |
| PCR temps reel | *Hsp*65 (213 pb) | *TW704* : 5'-AAAGAGGTTGAGACTG-3'<br>*TW899* : 5'-ATCGGTTACAAAATAA GC-3'<br>*TW795* :<br>5'-AGAAGGTTGGCAAGGAAGGC-3'<br>(sonde d'ancrage : fluorescente en 3')<br>*TW817* :<br>5'-TGTCACTGTCGAGGAGTCAAATACT-3'<br>(sonde émettrice marquée en 5') | Technique FRET (voir le chapitre « Diagnostic moléculaire ») | Sloan LM *et al.* |
| PCR temps réel | Séquences répétées (164 pb) | *53.3F* : 5'-AGAGAGATGGGGTGCAGGAC-3'<br>*53.3R* : 5'-AGCCTTTGCCAGACAGACAC-3' | Technique Sybergreen (voir le chapitre « Diagnostic moléculaire ») | Fenollar F *et al.* |
| PCR temps réel | Séquences répétées (155 pb)<br>Séquences répétées (155 pb) | *TW27F* : 5'-TGTTTTGTACTGCTTGTAACAG GATCT-3'<br>*TW82R* :<br>5'-TCCTGCTCTATCCCTCCTATCATC-3'<br>Sonde Taqman *27F-82R* :<br>5'-6-FAM-AGAGATACATTTGTGTTAGTTGTTACA-TAMRA-3'<br>*TW13F* :<br>5'-TGAGTGATGGTAGTCTGAGAGA-TATGT-3'<br>*TW163R* :<br>5'-TGAGTGATGGTAGTCTGAGAGAT-ATGT-3'<br>Sonde Taqman *13F-163R* :<br>5'-6-FAM-AGAAGAAGATGTTACGGGTTG-TAMRA -3' | Technique Taqman® (cf chapitre diagnostic moléculaire)<br>Technique en 2 temps : le second système d'amplification est utilisé pour confirmé les échantillons détectés positifs avec la première PCR. | Raoult D *et al.* |

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Aiouaz H, Celard M, Puget M, et al. Whipple's disease endocarditis : report of 5 cases and review of the literature. Rev Med Interne 2005 ; 26 : 784–90.

Desnues B, Ihrig M, Raoult D, Mege JL. Whipple's disease : a macrophage disease. Clin Vaccine Immunol 2006 ; 13 : 170–8.

Fenollar F, Fournier PE, Robert C, Raoult D. Use of genome selected repeated sequences increases the sensitivity of PCR detection of *Tropheryma whipplei*. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 401–3.

Mahnel R, Marth T. Progress, problems, and perspectives in diagnosis and treatment of Whipple's disease. Clin Exp Med 2004 ; 4 : 39–43.

Sloan LM, Rosenblatt JE, Cockerill FR. Detection of *Tropheryma whipplei* DNA in clinical specimens by Light Cycler real-time PCR. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 3516–8.

von Herbay A, Ditton HJ, Schuhmacher F, Maiwald M. Whipple's disease : staging and monitoring by cytology and polymerase chain reaction analysis of cerebrospinal fluid. Gastroenterology 1997 ; 113 : 434–41.

Liang Z, La Scola B, Raoult D. Monoclonal antibodies to immunodominant epitope of *Tropheryma whipplei*. Clin Diagn Lab Immunol 2002 ; 9 : 156–9.

## Chapitre 36.7

# *Bacillus*

F. Denis, M.-C. Ploy

Le genre *Bacillus* comporte des bactéries à Gram positif en bâtonnets sporogènes et généralement mobiles. Ces bacilles sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs.

Le genre *Bacillus* fait partie de la famille des *Bacillaceae* qui comprend aussi le genre *Clostridium*.

## Classification

Le séquençage de l'ARNr 16S a conduit à la création de nouveaux genres auxquels ont été rattachées des bactéries préalablement classées parmi les *Bacillus* ; ainsi, les *Paenibacillus* regroupent des espèces antérieurement dénommées *B. polymyxa*, *B. macerans*, les *Brevibacillus* comprennent les ex-*B. brevis* et les *Geobacillus* les ex-*B. stearothermophilus*.

Le genre *Bacillus* est le mieux connu ; il comporte pas moins de 74 espèces différentes, très diverses aussi bien sur le plan génotypique que phénotypique. Les membres du « groupe *B. cereus* » sensu lato correspondent à une espèce unique, bien que réunissant différents pathovars : *B. cereus, B. anthracis* et *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstepharensis*, *B. pseudomycoides*. D'autres espèces peuvent intervenir en pathologie humaine.

## Habitat et pouvoir pathogène

La plupart des espèces sont saprophytes et très répandues dans la nature ; la spore leur confère une très grande résistance dans le milieu extérieur. Ce sont des germes telluriques que l'on rencontre également dans l'eau et l'air, ainsi que dans des produits alimentaires (laits en poudre, produits farineux, épices).

*B. anthracis*, agent du charbon, est largement distribué dans le monde. C'est un pathogène obligatoire de l'homme et des animaux. Les animaux malades disséminent le germe ; le sol constitue le réservoir (champs, prés, etc.) ; les cadavres et les produits d'origine animale (peaux, os, etc.) participent à la contamination des terrains et à la transmission directe à l'homme.

*B. cereus* est largement répandu dans la nature, le sol et l'air, et peut, de ce fait, notamment par ses spores, souiller les aliments.

Les autres *Bacillus* présents dans l'environnement (sol, air, etc.) peuvent être présents au niveau de la peau ou des muqueuses. Ils peuvent souiller les cultures, mais aussi être en situation pathogène pour des sujets débilités ou après introduction dans l'organisme lors d'interventions chirurgicales.

## Bacillus anthracis

*B. anthracis* est responsable du charbon, maladie de l'homme (rare en France) et des animaux, notamment des herbivores. L'homme se contamine directement ou indirectement à partir d'animaux infectés. La transmission d'homme à homme est extrêmement rare.

Chez l'homme, on distingue :

- une forme cutanée avec, au point d'inoculation (mains, bras, face), une « pustule maligne » qui, après un stade de papule érythémateuse, évolue vers une vésicule puis une escarre noirâtre. L'évolution est souvent favorable, mais cette lésion peut précéder un œdème malin et une septicémie. La forme cutanée est une maladie professionnelle. Cette forme représente 95 à 99 % des formes cliniques du charbon humain ;
- des formes viscérales plus rares qui peuvent être :
  - pulmonaires, consécutives à l'inhalation de spores ;
  - gastro-intestinales, après ingestion de viande ;
  - méningées.

  Le pronostic de ces formes est sombre.

La vaccination associée à l'amélioration des règles d'hygiène a permis une régression nette de la maladie.

*B. anthracis* est aussi un agent infectieux qui a été utilisé dans le bioterrorisme.

## Bacillus cereus *sensu stricto*

La majorité des cas se présente sous forme de toxi-infections alimentaires. Après ingestion d'aliments contaminés, on observe des symptômes à types de vomissements rapidement après l'ingestion (0,5 à 5 heures) s'il s'agit d'absorption de toxine préformée, ou plus tardifs (8 à 6 heures) avec douleurs abdominales, diarrhées profuses, nausées, quand la production d'entérotoxines thermolabiles se produit in vivo après prolifération des germes ingérés en grande quantité ($10^7$ à $10^9$ bactéries/gramme d'aliments).

Divers aliments peuvent être incriminés allant des viandes, au riz, aux purées de pomme de terre déshydratées, aux sauces tomates instantanées, etc.

La régression des symptômes est généralement rapide. Ces toxi-infections à *B. cereus* sont sûrement sous-estimées (5 % des étiologies aux États-Unis). On observe aussi des infections opportunistes à *B. cereus* survenant essentiellement chez des patients fragilisés (immunodépression, alcoolisme, etc.) et pouvant survenir avec différentes localisations (septicémies, abcès cérébraux, endocardites, pneumonies, ostéomyélites, salpingites, etc.).

*B. cereus* a aussi été décrit dans des cas d'endophtalmies post-traumatiques ou dans des cas d'infections à la suite de blessures (brûlures, traumatismes) chez des sujets non immunodéprimés. Des infections chez le nouveau-né ont été décrites notamment au niveau du cordon ombilical.

### *Autres espèces*

Depuis plusieurs années, d'autres espèces de *Bacillus* – *B. licheniformis, B. subtilis, B. circulans, B. brevis* – ont été isolées dans des infections souvent nosocomiales avec parfois des pseudoépidémies hospitalières, tout particulièrement chez les immunodéprimés. Les *Bacillus* pouvant être des contaminants ; il faut interpréter avec prudence leur isolement en fonction du contexte clinique et de la densité microbienne.

## Diagnostic bactériologique

Il s'agit de diagnostic direct.

Les *Bacillus* sont des bacilles à Gram positif dont le Gram peut se négativer. Ce sont de grands bacilles (3 à 5 µm sur 1,25 µm/l) avec souvent des extrémités carrées pouvant se présenter dans les produits pathologiques en courtes chaînettes. En culture, on peut observer des formes longues parfois en « canne de bambou » pour *B. anthracis*. Les *Bacillus* sont le plus souvent mobiles par ciliature péritriche, sauf *B. anthracis* toujours immobile.

La spore n'est généralement visible qu'après culture sur milieu sans peptone. Elle est ovale ou ronde ; elle peut être déformante ou non déformante, avec une localisation centrale, paracentrale, subterminale ou terminale (fig. 36.7.1).

**Fig. 36.7.1.** – *Spores centrales non déformantes de* Bacillus.

Les spores sont très résistantes (il faut 40 minutes à 120 °C pour les détruire), celles de *B. subtilis* sont parmi les plus résistantes. Ces spores sont utilisées comme témoin de stérilisation.

### Prélèvements

Si les collectes et le traitement d'échantillons pratiqués en vue de l'isolement des différentes espèces courantes ne requièrent pas de précautions particulières, le prélèvement, le transport et la culture des prélèvements pour lesquels on suspecte une infection à *B. anthracis* nécessitent des précautions particulières pour la manipulation, avec recours à des blouses, gants, masques, lunettes et à un traitement de l'échantillon sous hottes à flux laminaire voire dans des unités à haute sécurité. Des précautions renforcées doivent être prises en cas d'analyse de poudres suspectes dans un contexte de bioterrorisme.

#### *Nature des prélèvements*

Pour *B. anthracis*, il s'agit surtout de prélèvements de lésions cutanées, de pustules voire d'hémocultures, de LCR ou de prélèvements respiratoires.

Pour tout patient arrivant aux urgences dans un contexte de bioterrorisme et suspecté de charbon, il faut réaliser un prélèvement, dès son arrivée, au niveau des narines à l'aide d'un écouvillon. Cet écouvillon sera plongé dans un bouillon ou dans du sérum physiologique stérile avant

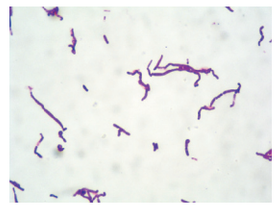


Fig. 36.7.2. – *Examen direct après coloration de Gram de* Bacillus cereus.

d'être ensemencé sur gélose ; un autre écouvillon pourra servir pour la biologie moléculaire (PCR).

Pour *B. cereus*, dans un contexte de toxi-infection alimentaire, on doit disposer de selles et tenter de trouver l'aliment suspect afin de numérer les germes dans celui-ci.

Dans les infections opportunistes à *B. cereus* et dues aux autres espèces de *Bacillus*, il s'agit le plus souvent de découvertes de hasard, à partir d'hémocultures, de prélèvements de pus ou de liquides biologiques de diverses natures.

### *Transport des échantillons*

Il n'y a pas de précaution particulière, sauf en cas de suspicion de *B. anthracis.*

### *Examen direct*

L'examen direct permet de préciser la présence ou l'absence de gros bacilles, le plus souvent à Gram positif plus ou moins longs, à bouts carrés, parfois en chaînettes ou en cannes de bambou (fig. 36.7.2). Les bacilles peuvent apparaître Gram négatif ou avec une coloration Gram positif plus intense aux extrémités.

## Culture

La croissance à partir d'échantillons biologiques normalement stériles est facile, en 36 à 48 heures à 37 °C :

- en bouillon (hémocultures ou autres), automate d'hémoculture ; le délai de positivité peut alors être très court (5 heures) ;
- sur gélose au sang, gélose « chocolat » enrichie (type Polyvitex®) ou gélose nutritive. Les colonies de *Bacillus* du groupe *cereus* sont habituellement de grande taille (1 à 7 mm), circulaires ou irrégulières, souvent mates et granuleuses (fig. 36.7.3).

Les colonies de *B. anthracis* sont blanches ou grises, non ou faiblement hémolytiques ; elles sont plus petites et moins crémeuses que les colonies de *B. cereus* ; elles creusent généralement la gélose et sont difficiles à prélever.

Les colonies de *B. licheniformis* ont un aspect de lichen. Mais la morphologie des colonies peut varier pour une espèce donnée et seule la galerie et les tests complémentaires permettent souvent de trancher.

À partir des prélèvements polymicrobiens en cas d'infection à *B. anthracis* et de suspicion d'intoxications alimentaires :

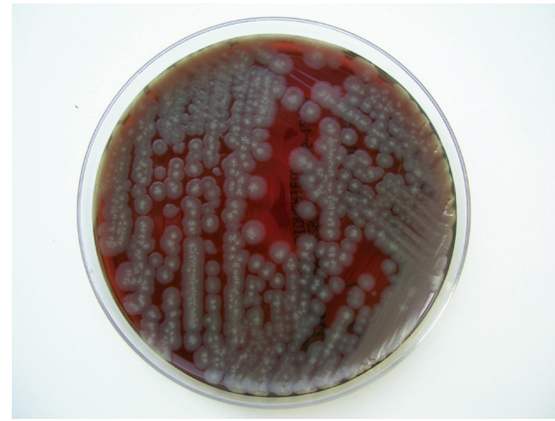


Fig. 36.7.3. – *Aspect des colonies de* Bacillus cereus *sur gélose au sang.*

- on peut procéder à un chauffage à 62,5 °C durant 15 minutes qui détruit tous les contaminants non sporulés et produit un choc thermique qui activera la germination. On pourra alors ensemencer les milieux riches non sélectifs (bouillon, gélose au sang, gélose nutritive) ;
- on peut avoir recours à des milieux sélectifs souvent ensemencés directement avec des échantillons fraîchement récoltés ;
- pour *B. anthracis*, on recourt à la gélose de Knisely contenant polymyxine, lysozyme, EDTA, acétate de thallium (PLET) ;
- pour *B. cereus* dans une perspective d'isolement, d'identification et de numération (produits alimentaires, selles) ; on peut utiliser des milieux contenant jaune d'œuf, mannitol et un indicateur permettant de révéler l'hydrolyse de la lécithine ainsi que l'acidification du mannitol et souvent un inhibiteur des Gram négatif (polymyxine) ; les plus utilisés sont les milieux MEYP, PEMBA et BCM. Il est préférable de ne pas utiliser des milieux sélectifs comme la gélose au sang + acide nalidixique, certaines souches pouvant être inhibées.

## Identification

### *Caractères morphologiques*

À partir des bouillons ou des colonies des milieux solides, on pratiquera des colorations :

- la coloration de Gram permet de préciser la morphologie des bacilles, la présence ou l'absence de spores, leur aspect rond ou ovalaire, déformant ou non déformant et leur topographie dans le corps bactérien ;
- une coloration de spore peut être pratiquée si l'aspect réfringent à l'état frais n'est pas suffisant. Cependant, la recherche de spores peut être facilitée par un examen au microscope à contraste de phase. La coloration au vert malachite est assez simple à réaliser. Une lame fixée comme pour une coloration de Gram est recouverte d'une solution aqueuse à 10 % de vert malachite ;

on laisse agir pendant 40 à 45 minutes, puis après rinçage à l'eau du robinet, on contre-colore avec une préparation de safranine à 30 % durant 30 secondes. Après séchage, on observe les spores en vert et les débris cellulaires en rose-rouge ;

- la mobilité sera systématiquement recherchée, les espèces *B. anthracis* et *B. mycoides* étant immobiles.
  La recherche de capsule sur les souches virulentes de *B. anthracis* peut être recherchée :
- soit en révélant le caractère mucoïde des colonies apparues après ensemencement sur gélose nutritive contenant 0,5 % de bicarbonate de sodium, avec incubation 18 heures en atmosphère de $CO_2$ (5 à 7 %) ;
- soit en ensemençant une petite quantité d'une colonie suspecte dans 2,5 ml de sérum de veau fœtal et en recherchant la capsule par la technique à l'encre de Chine après 6 à 18 heures d'incubation à 37 °C.

### Caractères culturaux

Les *Bacillus* sont aérobies, mais certaines espèces sont aérobies strictes ou anaérobies facultatives ; de ce fait, la recherche d'une croissance en anaérobiose peut être intéressante. Les *Bacillus* sont catalase positive, oxydase variable.

Le comportement des souches sur gélose au sang de mouton à la recherche d'une hémolyse ou sur milieu à l'œuf pour révéler une activité lécithinasique peut être utile pour l'identification.

L'étude de l'acidification des sucres est souvent délicate et longtemps on a eu recours au milieu de Smith-Gordon-Clark.

Compte tenu des difficultés rencontrées pour réaliser un diagnostic d'espèce, on préfère, plutôt que de rechercher les caractères phénotypiques avec des techniques « maison », recourir à des tests miniaturisés tels les systèmes API 20E® et API 50 CHB® ou à la carte *Bacillus* du système d'identification automatisé Vitek® (bioMérieux).

L'ensemencement des galeries API 20E® doit être réalisé avec un inoculum plus dense que pour les entérobactéries. La confirmation peut être obtenue par l'ensemencement d'une galerie API 50 CHB®.

Les autres caractères énumérés précédemment (morphologie, caractères culturaux, etc.) doivent être pris en

**TABLEAU 36-7-1**

**Caractères différentiels des espèces de *Bacillus* les plus souvent rencontrées en pathologie humaine.**

| *Caractères* | *Groupe B. cereus* | | | | *Groupe B. subtilis* | | | *B. circulans* | *B. coagulans* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *B. cereus* | *B. anthracis* | *B. thuringiensis* | *B. mycoides* | *B. subtilis* | *B. licheniformis* | *B. pumilus* | | |
| Chaînettes | + | + | + | + | – | V | – | – | V |
| Mobilité | + | – | + | – | + | + | + | + | + |
| Culture anaérobiose | + | + | + | + | – | + | – | + | + |
| Culture 50 °C | – | – | – | – | V | + | V | – | + |
| Lécithinase* | + | + | + | + | – | – | – | – | – |
| Gélatinase | + | + | + | + | + | + | + | – | – |
| Hémolyse sang mouton | + | – | + | – | | | | | |
| Acidification | | | | | | | | | |
| – Glycérol | +/V | – | + | + | + | + | + | V | + |
| – Mannitol | – | – | – | – | + | + | + | + | V |
| – Saliciline | + | – | + | + | + | + | + | + | + |
| Croisance 10 µg de péniciline | + | – | | | | | | | |
| Réduction des nitrates | V | + | + | + | + | + | – | V | V |
| Arginine dihydrolase | V | – | + | V | – | + | – | V | V |
| Production d'indole | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Gélatinase | + | V | + | V | + | + | + | – | – |

* Réaction au jaune d'œuf.
V : variable.

compte dans l'identification. Les principaux caractères différentiels entre les différentes espèces susceptibles d'être isolées en pathologie humaine sont regroupés dans le tableau 36.7.1.

Pour l'identification des souches de *B. anthracis*, des tests d'immunochromatographie ont été développés, mais ils ne sont pas commercialisés. Des techniques d'amplification génique (PCR et PCR en temps réel) ont été utilisées soit dans le cadre d'analyse de poudres dans un contexte bioterroriste, soit pour confirmer le caractère virulent des souches dans une perspective de diagnostic.

Par PCR, on peut rechercher les facteurs de virulence portés par deux plasmides, pOX1 et pOX2, et celui porté par une séquence spécifique chromosomique de 277 bp (Ba823).

La recherche de toxine du charbon, avec ses trois composants protéiques, peut être réalisée par réaction immuno-enzymatique.

L'étude du pouvoir pathogène des souches de *B. anthracis* est rarement pratiquée actuellement, mais si la recherche est effectuée, elle doit l'être dans une animalerie protégée. On a recours à un cobaye par inoculation de 0,5 ml d'une culture de 24 heures par voie sous-cutanée. La mort survient en 36 à 48 heures. À l'autopsie, on observe un œdème gélatineux, mou au point d'injection. Les viscères sont congestionnés et noirs, et le sang contient de nombreux bacilles de morphologie évocatrice, de même que les empreintes de foie, de rate et de liquide d'œdème. Cette recherche du pouvoir pathogène doit impérativement être réservée à des laboratoires possédant une animalerie bien contrôlée. Le complexe entérotoxinogène produit par certaines souches de *B. cereus* peut être recherché directement sur aliments ou selles, sur culture cellulaire ou à l'aide de trousses commercialisées tel le test Oxoid BCET-RPLA® (Oxoid Ltd).

## Interprétation des résultats

En dehors de l'isolement de *B. anthracis*, qui, s'il est confirmé, affirme son rôle en pathologie, la découverte des autres espèces de *Bacillus* doit être interprétée avec prudence, sauf s'il s'agit d'isolements répétés ou si les souches sont en culture pure et dans un certain contexte, par exemple d'endophtalmie.

Dans les intoxications alimentaires, on suspecte *B. cereus* quand le nombre de germes est $>10^5$/g dans l'aliment incriminé, si la même souche est présente dans les selles et/ou les vomissements du patient, et si elle produit une toxine émétique et/ou une entérotoxine.

L'étude de la sensibilité des *Bacillus* aux antibiotiques peut être utile au diagnostic. *B. anthracis* est classiquement sensible à la pénicilline G, contrairement à *B. cereus.*

Mais elle peut aussi être utile pour les choix thérapeutiques.

Pour *B. anthracis*, des résistances acquises à la pénicilline par production de β-lactamase ont été signalées en France. Cette espèce est, en outre, sensible à la gentamicine, aux glycopeptides et souvent à la ciprofloxacine.

*B. cereus* résiste à l'ampicilline et aux céphalosporines, mais est habituellement sensible aux aminosides, à la ciprofloxacine, à la clindamycine et à la vancomycine. Pour ce dernier antibiotique, certaines souches de *Bacillus* et de *Paenibacillus* ont été décrites comme étant résistantes.

Devant cette diversité de comportement, un antibiogramme est conseillé pour toutes les souches susceptibles d'être pathogènes.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Bacillus*. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 2000. p. 155–69.

Cottin J, Freland C, Carbonnelle B. Les bacilles à Gram positif (à l'exception des anaérobies). In : Carbonnelle B, Denis F, Marmonier A, Pinon G, Vargues R, editors. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris : Simep; 1987. p. 175–86.

Guinebretiere MH, Sonchis V. *Bacillus cereus* sensu lato. Bulletin Soc Franç Microbiol 2003; 18 : 95–103.

Logan NA, Turnbull PCB. Bactéries aérobies sporulées. Paris : ESKA; 2004.

Philippon A. *Bacillus anthracis*, agent possible du bioterrorisme. Assoc Anciens Élèves Institut Pasteur 2002; 170 : 4–9.

Tessou R, Hance P, Buisson Y. Les infections humaines à *Bacillus*. Bull Soc Fr Microbiol 1998; 13 : 137–51.


**ADRESSE UTILE**


**Centre national de référence des Bacillus**
Institut Pasteur
28, rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 1

CHAPITRE

37

# Bactéries spiralées

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

## Chapitre 37.1

# Généralités sur les spirochètes

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

Les spirochètes sont des bacilles mobiles, de forme hélicoïdale, mesurant de 5 à 35 µm de long sur 0,1 à 0,3 µm de large. Cette petite taille leur permet de passer aisément des filtres de 0,45 µm de porosité, voire pour certains spirochètes ceux de 0,22 µm. Leur structure comprend une membrane externe en trois feuillets recouvrant une mince couche de peptidoglycane, qui est intimement liée à la membrane cytoplasmique sous-jacente. Entre la membrane externe et le peptidoglycane se trouvent des endoflagelles insérés aux deux extrémités de la bactérie et enroulés autour du corps bactérien qui constitue l'organe moteur et donne sa forme à la bactérie.

Les spirochètes ne sont pas visualisés en microscopie optique classique car leur diamètre est inférieur au pouvoir de résolution d'un microscope optique, mais sont observables par microscopie à fond noir, au grossissement × 100 ou plus. Ils apparaissent alors comme des spirales ondulées et mobiles. La disposition particulière de leurs flagelles leur donne une mobilité tout à fait spécifique, combinant mouvements de torsion, de rotation et de compression.

La méthode de Gram n'est pas utilisable pour visualiser les spirochètes car ils ne prennent pas cette coloration ; ils sont aussi colorables faiblement par le Giemsa. Ils sont classiquement visualisés par des colorations

**ENCADRÉ 37.1.1**

### Coloration de Warthin-Starry

Solution tampon à pH 3,6
- Eau distillée 1 litre avec acide citrique 1 %.
- Ajuster le pH de la solution avec environ 1 à 5 ml de la solution d'acide citrique.

Nitrate d'argent 1 % (imprégnation)
- Maintenir durant 45 minutes 100 ml de la solution tampon pH 3,6 à 56 °C au bain-marie.
- Ajouter 1 g de nitrate d'argent, homogénéiser puis faire immédiatement l'imprégnation.

**Solution n° 2 (réduction) :** toujours travailler avec la solution tampon à 56 °C (45 minutes) ; mettre :
- 2,5 g de gélatine dans 50 ml de tampon pH 3,6
- 1 g de nitrate d'argent dans 50 ml de tampon pH 3,6
- 0,12 g de pyrocatéchol dans 50 ml de tampon pH 3,6 à préparer juste avant de faire le mélange

Mélanger :
- 3 ml de nitrate d'argent 2 % dans le tampon pH 3,6
- 7,5 ml de gélatine à 5 % dans le tampon pH 3,6
- 4 ml de pyrocatéchol à 0,25 % dans le tampon pH 3,6

Toutes les manipulations doivent se dérouler entre 56 et 60 °C.

Imprégnation
- Amener la solution tampon pH 3,6 à 56 °C (bain-marie durant 45 minutes).
- Ajouter 1 % de nitrate d'argent (1 g pour 100 ml) et plonger les lames dans la solution après homogénéisation, puis mettre immédiatement à l'abri de la lumière dans une étuve à 56 à 60 °C durant 1 heure à 1 heure 10.

Réduction
- Les lames sont placées sur un portoir au-dessus d'un bain-marie à 56 °C en évitant les courants d'air.
- Recouvrir les lames avec la solution 2 qui a été préparée au dernier moment à 56 °C (le pyrocatéchol doit être ajouté à la solution 2 juste avant la révélation).
- Le matériel sur lame prend progressivement (quelques secondes à une minute) une teinte brun doré. Lorsque cette couleur est atteinte, arrêter la réaction en plongeant les lames dans de l'eau distillée à 56 °C durant 30 secondes en agitant.
- Laver ensuite durant 5 minutes dans 1 à 2 bains d'eau distillée.

Fixation
- Les lames sont ensuite passées dans l'alcool puis le toluène et montées.

argentiques (Fontana-Tribondeau, Warthin-Starry [encadré 37.1.1]). Celles-ci sont de réalisation délicate et peuvent déformer la morphologie des spirochètes. À l'inverse, certaines structures tissulaires peuvent être confondues avec des spirochètes, comme la fibrine, entraînant des faux positifs à la lecture de lames tissulaires. Les spirochètes peuvent aussi être visualisés par l'acridine orange ou le DAPI (fig. 37.1.2).

Les principaux genres de spirochètes d'intérêt médical comprennent :

- le genre *Borrelia*, responsable des fièvres récurrentes et de la borréliose de Lyme, qui touchent l'homme et l'animal ;
- le genre *Leptospira*, responsable des leptospiroses, qui touchent l'homme et l'animal ;
- le genre *Treponema*, responsable de la syphilis et des tréponématoses non vénériennes, touchant exclusivement l'homme.

Les autres genres de *Spirochaetaceae* (*Brevinema*, *Critispira*, *Spirochaeta*, *Spironema*), non pathogènes pour l'homme, ne seront pas évoqués ici.

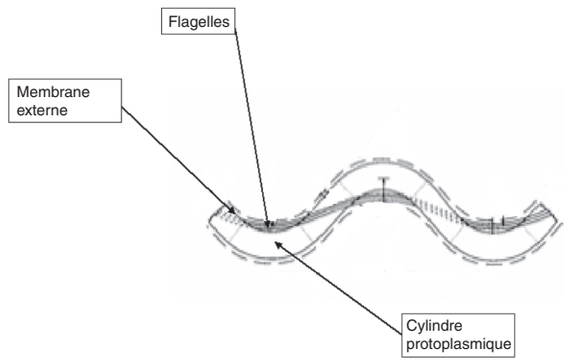



**Fig. 37.1.1.** – *Structure schématique de* Borrelia burgdorferi *sensu lato.*

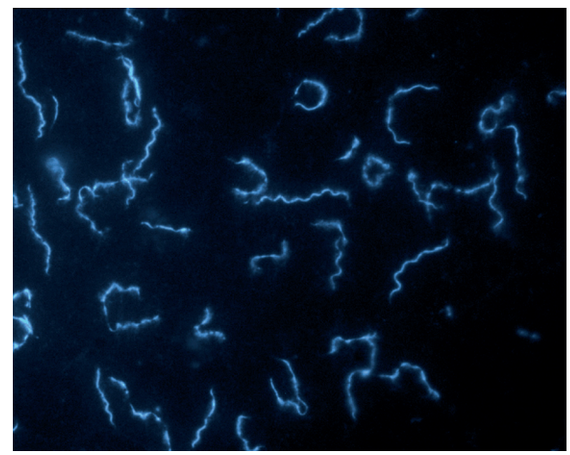


**Fig. 37.1.2.** – *Borrelia burgdorferi* sensu lato, × 400, coloration au DAPI (4',6-Diamino-2-phénylindole).

## Chapitre 37.2

# Genre *Borrelia*

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

## Généralités

Les agents des borrélioses humaines sont transmis par des arthropodes vecteurs hématophages. Ce sont des bactéries spiralées qui appartiennent à l'ordre des *Spirochaetales*, à la famille des *Spirochaetaceae* et au genre *Borrelia*. Ce dernier comprend plus d'une trentaine d'espèces dont certaines sont responsables d'infections humaines. Au sein de ces dernières, on distingue sur un plan clinique la borréliose de Lyme et les fièvres récurrentes (tableau 37.2.1).

La borréliose de Lyme est répandue dans tout l'hémisphère nord. Elle est principalement causée en Europe par trois espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* et *B. afzelii*), tandis qu'aux États-Unis seule l'espèce *B. burgdorferi* sensu stricto est pathogène pour l'homme. Elle est transmise à l'homme par des tiques dures du genre *Ixodes.*

Les fièvres récurrentes sont transmises soit par Pediculus humanus, poux de corps, vecteur de Borrelia recurrentis, agent de la fièvre récurrente épidémique cosmopolite, soit par les tiques molles des genres Ornithodoros et Argas, vecteurs de diverses espèces Borrelia, agents des fièvres récurrentes endémiques, sévissant dans différentes régions du monde (péninsule Ibérique, Moyen-Orient, Causase, Afrique, Amérique, Asie).

TABLEAU 37-2-1

**_Borrelia_ pathogènes pour l'homme, leur vecteur et leur répartition géographique.**

| *Agents de la borréliose de Lyme* | *Vecteur* | *Répartition géographique* |
|---|---|---|
| *Borrelia burgdorferi* sensu stricto | *Ixodes daminii*<br>*Ixodes ricinus* | États-Unis,<br>Europe |
| *Borrelia garinii*<br>*Borrelia afzelii* | *Ixodes ricinus*<br>*Ixodes persulcatus* | Europe,<br>Asie |
| *Borrelia valaisiana*<br>*Borrelia bissettii*<br>*Borrelia spielmanii*<br>*Borrelia bavariensis* | *Ixodes ricinus* | Europe de l'Ouest |
| *Agents des fièvres récurrentes* | *Vecteur* | *Répartition géographique* |
| *Borrelia recurrentis* | *Pediculus humanus* | Cosmopolite |
| *Borrelia duttonii* | *Ornithodoros moubata* | Afrique orientale et centrale,<br>Madagascar, Comores |
| *Borrelia hispanica* | *O. erraticus erraticus* | Péninsule Ibérique, Maghreb, Grèce,<br>Chypre, Syrie |
| *Borrelia crocidurae* | *O. erraticus sonrai* | Nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte)<br>Sud de l'Afrique (du Sénégal au Kenya)<br>Proche-Orient |
| *Borrelia tillae* | *O. zumpti* | Afrique du Sud |
| *Borrelia persica* | *O. tholozani* | Sud Russie, Iran, Irak, Syrie, Liban, Israël,<br>Palestine, Chypre |
| *Borrelia latyschewii* | *O. tartakowskyi* | Asie centrale, Iran, Russie |
| *Borrelia caucasica* | *O. verrucosus* | Caucase, Arménie, Azerbaïdjan, Géorgie |
| *Borrelia hermsii* | *O. hermsi* | Ouest des États-Unis, Canada |
| *Borrelia turicatae* | *O. turicata* | Canada, États-Unis, Mexique |
| *Borrelia parkeri* | *O. parkeri* | Ouest des États-Unis |
| *Borrelia venezuelensis* | *O. venezuelensis* | Amérique centrale |

## Épidémiologie

Les espèces pathogènes de *Borrelia* nécessitent pour leur transmission la présence dans l'environnement humain du réservoir habituel de ces *Borrelia* et de l'arthropode vecteur compétent. L'homme est un hôte accidentel de *Borrelia*, sauf pour la fièvre récurrente épidémique à *B. recurrentis,* transmise par les poux, et la fièvre récurrente endémique à *B. duttonii,* transmise par les *Ornithodoros*, pour lesquelles l'homme semble être le seul réservoir.

### Borréliose de Lyme

La borréliose de Lyme est l'anthropozoonose bactérienne transmise par piqûre de tique la plus fréquente dans l'hémisphère nord. Son nom provient de la petite ville de Lyme (Connecticut, États-Unis) où la maladie a été authentifiée pour la première fois en 1977, bien que plusieurs de ces manifestations cliniques aient déjà été observées en Europe au début du XX$^{e}$ siècle. La répartition géographique de cette infection est superposable à celle du vecteur, qui sévit dans les zones tempérées, régions humides et boisées en dessous de 1000 mètres d'altitude.

Dans le vecteur, *B. burdorferi* sensu lato survit et se multiplie dans l'intestin des tiques du genre *Ixodes*. Ce sont des arthropodes exophiles forestiers. On en distingue plusieurs espèces dont seules certaines piquent l'homme : *Ixodes ricinus* en Europe occidentale, *Ixodes persulcatus* en Asie, *Ixodes scapularis* sur la côte Est des États-Unis, et *Ixodes pacificus* sur la côte Ouest des États-Unis. Entre le début du printemps et la fin de l'automne, ces tiques effectuent un repas sanguin nécessaire à leur développement. Lors de ce repas sanguin, à tous les stades de leur développement (larve, nymphe ou adulte), les tiques peuvent transmettre ou ingérer *B. burgdorferi* sensu lato. Elles parasitent ainsi les animaux sauvages vivant en zones boisées, humides et tempérés de l'hémisphère nord. En Europe, ce sont les petits rongeurs qui constituent le réservoir majoritaire, mais les mammifères de taille moyenne, les oiseaux ainsi que les grands mammifères comme les cervidés jouent également un rôle essentiel dans la bioécologie du vecteur. L'homme, qui s'insère dans ce cycle, est en fait un hôte accidentel terminal des tiques. Le taux d'infestation des vecteurs et donc le risque de

transmission du pathogène augmentent au fur et à mesure du stade de développement des tiques. Cependant, chez l'homme, ce sont les nymphes qui offrent le plus de risque de transmission de *B. burgdorferi* sensu lato à l'homme, car leur taux d'infestation, pouvant atteindre en France 8 à 20 % selon la région, est presque aussi élevé que celui des tiques adultes, et ne mesurant que quelques millimètres, elles échappent volontiers à la vigilance des sujets exposés. De plus, leur densité est 2 à 6 fois supérieure à celle des tiques adultes selon les zones.

L'incidence de la borréliose de Lyme est variable d'une région à l'autre. En Europe, elle augmente selon un gradient Sud-Nord et Ouest-Est. Elle atteint une incidence record dans l'est de l'Europe avec, en Slovénie et en Autriche, plus de 130 cas pour 100 000 habitants. En France, l'incidence moyenne est estimée à près de 9,5 cas/100 000 habitants. Elle est presque absente du pourtour méditerranéen car le climat trop sec ne permet pas le développement du vecteur. Elle est très fréquente dans le nord-est de la France, où son incidence peut être plus de 10 fois supérieure à l'incidence nationale. La multiplication des contacts entre la population et la nature favorise l'apparition des cas dans les zones à risque. La maladie est plus fréquente chez les jeunes enfants et chez les adultes après 45 à 50 ans. Durant l'année, le pic de fréquence de la borréliose de Lyme correspond à la période d'activité maximale des tiques, soit du début du printemps à la fin de l'automne.

Dans le complexe *B. burgdorferi* sensu lato, 18 espèces ont été décrites à ce jour. Trois espèces, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* et *B. afzelii*, ont été plus fréquemment décrites comme pathogènes pour l'homme. Seule l'espèce *B. burgdorferi* sensu stricto sévit en Amérique du Nord, alors que les trois espèces sont majoritairement présentes en Europe, avec une plus grande prévalence de *B. garinii* et *B. afzelii*.

Quelle que soit l'espèce en cause, sa dissémination cutanée initiale peut se traduire autour du point de piqûre par l'apparition d'un érythème migrant, réaction inflammatoire générée par la réaction inflammatoire cutanée en regard de la multiplication et la migration dans la peau des spirochètes. Les manifestations secondaires, après dissémination systémique des spirochètes, sont moins spécifiques et variables. Les observations épidémiologiques ont associé préférentiellement certaines manifestations à certaines espèces. Ainsi, les cas d'acrodermatite chronique atrophiante sont préférentiellement associés à l'infection par *B. afzelii*, les cas de neuroborréliose préférentiellement associés à *B. garinii*, et les cas d'arthrite seraient préférentiellement associés à *B. burgdorferi* sensu stricto. Ces associations ne sont pas absolues, voire controversées pour la dernière.

### Fièvre récurrente épidémique à poux

Cette fièvre est due à *B. recurrentis* et est transmise d'homme à homme par les poux de corps, *Pediculus humanus corporis*. L'homme semble constituer le seul réservoir naturel de ces spirochètes, ce qui pose la question de la localisation des spirochètes entre les épidémies.

La contamination de l'homme se produit en général lors de l'écrasement du pou, entraînant la pénétration de l'hémolymphe du vecteur au niveau de la lésion de piqûre. Le grattage favorise la contamination. La fièvre récurrente épidémique à poux est cosmopolite. Elle est favorisée par la pauvreté, les mauvaises conditions d'hygiène, la promiscuité, les états de catastrophes (camps de réfugiés). Les derniers cas ont été recensés en Afrique de l'Ouest. C'est également une pathologie potentielle des sans domicile fixe des villes des pays industrialisés.

### Fièvres récurrentes endémiques à tiques

Ce sont des fièvres non contagieuses, dues à des *Borrelia* transmises à l'homme par des *Argasidae* et des *Ornitodoros*. Ces tiques vivent dans les terriers des rongeurs qui constituent leur réservoir, sauf pour *B. duttonii* dont le seul réservoir connu est l'homme. Certaines de ces tiques sont domestiques comme *Ornitodoros moubata*, vecteur de *B. duttonii*. La contamination de l'hôte par le vecteur est réalisée par l'injection de salive ou de liquide coxal relargué à proximité de l'orifice buccal, au site lésionnel de la piqûre.

Les différentes espèces de *Borrelia* responsables des fièvres récurrentes à tiques sont associées à différentes espèces de tiques de répartition géographique bien spécifique, notamment en Afrique, le long du Bassin Méditerranéen, au Moyen-Orient, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud.

## Clinique

### Borréliose de Lyme (tableau 37.2.2)

L'infection initiale locale consiste en la multiplication initiale cutanée de *B. burgdorferi* sensu lato. Elle se manifeste par un érythème migrant centrifuge, centré par le point de piqûre de la tique. C'est la manifestation clinique pathognomonique de la borréliose de Lyme. Elle pose le diagnostic à elle seule. Cet érythème est cependant inconstant et sa fréquence après piqûre de tique est variable. Il s'agit d'une macule érythémateuse extensive qui apparaît dans un délai de 2 à 45 jours après la piqûre. Cette lésion est à différencier des réactions inflammatoires précoces dues à la piqûre elle-même. L'érythème migrant évolue de manière centrifuge pendant plusieurs semaines à plusieurs mois en l'absence de traitement, et prend typiquement un aspect en cocarde, à centre clair et à bord érythémateux net. Il peut atteindre plusieurs dizaines de centimètres de diamètre. Il est habituellement indolore et non prurigineux. Sa bordure correspond au front de multiplication des spirochètes. L'érythème peut s'amender même en l'absence de traitement en quelques semaines à quelques mois, mais les spirochètes peuvent

**TABLEAU 37–2–2**

**Critères de définition de cas des différentes manifestations cliniques de la borréliose de Lyme en Europe (EUCALB, 2010-2011).**

| *Terme* | *Définition des cas cliniques* | *Critères biologiques essentiels* | *Critères biologiques/cliniques complémentaires* |
|---|---|---|---|
| Érythème migrant (EM) | Macule extensive centrifuge rouge ou violette (≥ 5 cm de diamètre)*, s'éclaircissant ou pas au centre, à bord typiquement plus marqué et peu surélevé | Aucun | Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur biopsie cutanée |
| Lymphocytome borrélien (rare) | Nodule ou plaque violacé(e) indolore, typiquement situé sur le lobe ou le pavillon de l'oreille, sur le mamelon ou sur le scrotum. Plus fréquent chez les enfants (surtout à l'oreille) que chez les adultes | Séroconversion ou sérologie positive<br>Histologie en cas de doute | – Histologie<br>– Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur biopsie cutanée<br>– EM récent ou concomitant |
| Acrodermatite chronique atrophiante | Lésions persistantes rouges ou violacées, situées typiquement sur les surfaces d'extension aux extrémités. Les lésions peuvent être initialement inflammatoires, puis devenir atrophiques. la peau peut s'indurer ou présenter des nodules fibroïdes en regard de proéminences osseuses | Taux élevé d'anticorps IgG spécifiques | – Histologie<br>– Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur biopsie cutanée |
| Neuroborréliose | Chez l'adulte principalement, méningoradiculite, avec ou sans paralysie faciale ; rarement encéphalite, myélite ; très rarement vascularite cérébrale<br>Chez les enfants, principalement méningite et paralysie faciale | Pléiocytose et mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'Ac spécifiques** | – Détection de *B. bugdorferi* sensu lato dans le LCR par culture et/ou par PCR<br>– Synthèse intrathécale d'IgM et/ou d'IgG et/ou d'IgA totales dans le LCR<br>– Présence d'anticorps spécifiques dans le sérum<br>– EM récent ou concomitant |
| Arthrite de Lyme | Poussées récurrentes ou persistantes d'arthrite avec épanchement d'une ou de plusieurs grosses articulations. Les autres tableaux articulaires doivent être exclus | Présence d'IgG sériques spécifiques, habituellement à taux élevé*** | Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur tissu et/ou liquide synovial |

(*Suite*)

TABLEAU 37-2-2

**Suite.**

| *Terme* | *Définition des cas cliniques* | *Critères biologiques essentiels* | *Critères biologiques/cliniques complémentaires* |
|---|---|---|---|
| Cardite de Lyme (rare) | Apparition aiguë de troubles de la conduction atrioventriculaire (bloc atrioventriculaire 2e ou 3e degré), troubles du rythme, occasionnellement myocardite ou pancardite. Les autres tableaux cardiaques doivent être exclus | Présence d'anticorps spécifiques sériques** | – Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture ou par PCR sur biopsie endomyocardique<br>– EM et/ou désordres neurologiques récents ou concomitants |
| Manifestations oculaires (rare) | Conjonctivite, uvéite, papillite, episclérite, kératite | Présence d'anticorps spécifiques sériques** | – Manifestations de borréliose de Lyme récentes ou concomitantes<br>– Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur humeur aqueuse |

[1] EUCALB : http : //meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php.
* Si le diamètre est inférieur à 5 cm, un antécédent de piqûre de tique, un délai d'apparition (après la piqûre de tique) d'au moins 2 jours et un érythème extensif à partir de la lésion de piqûre sont requis.
** La synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques peut manquer dans les formes très précoces.
*** Les taux d'anticorps spécifiques peuvent augmenter au cours de l'évolution de l'infection, ou décroître après élimination du processus infectieux. Des prélèvements réalisés à 3 mois d'intervalle peuvent être utiles pour objectiver un changement de ces taux d'anticorps spécifiques. Les prélèvements initiaux et de suivi doivent être analysés en parallèle pour éviter des variations interessais.

persister dans le derme. À ce stade, les traitements réduisant la durée de l'évolution de l'érythème migrant sont très efficaces pour la prévention des complications et bloquent le développement de la réponse humorale. En l'absence de traitement, environ 10 % des érythèmes migrants évoluent, en Europe, vers une infection disséminée.

L'infection disséminée survient après une bactériémie très transitoire et peu marquée cliniquement (signes généraux à type de syndrome pseudogrippal modéré). Elle s'exprime par des tableaux cliniques variés (neurologiques, articulaires, cutanés, cardiaques, oculaires ou musculaires principalement) qui peuvent apparaître en quelques semaines à quelques mois.

Les tableaux neurologiques, ou neuroborrélioses aiguës, sont, en Europe, les manifestations les plus fréquentes du stade secondaire de la borréliose de Lyme. Celles-ci peuvent se traduire par des atteintes radiculaires sensitives, dysesthésies systématisées dans le territoire de la piqûre de tique. Ces douleurs sont volontiers nocturnes, peu sensibles aux antalgiques et aux anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les méningites lymphocytaires sont aussi des manifestations très fréquentes des neuroborrélioses. Elles sont souvent modérées, paucisymptomatiques, à types de céphalées sans raideur méningée, et peuvent régresser spontanément. Chez l'enfant, la paralysie faciale est la plus fréquente des atteintes des nerfs crâniens. La méningoradiculonévrite constitue la forme complète typique de cette atteinte neurologique. Des atteintes purement périphériques, polyneuropathiques ont été observées.

Les atteintes rhumatologiques sont caractérisées le plus souvent par des monoarthrites ou oligoarthrites asymétriques des grosses articulations (genou, coude). Elles sont inflammatoires, peu douloureuses. Elles apparaissent 1 à 6 mois et évoluent par poussées récurrentes brèves de quelques semaines, entrecoupées de phases de rémission de plus en plus longues au fil du temps. Des arthralgies diffuses peuvent survenir à n'importe quel stade de la maladie ; elles sont associées à d'autres manifestations évocatrices et ne permettent pas, si elles sont isolées, de poser le diagnostic.

Des tableaux cliniques moins fréquents existent et sont représentés par des manifestations cutanées secondaires, telles que l'érythème migrant multiple et le lymphocytome borrélien (lésion nodulaire brun-jaune à violacée au niveau du lobe de l'oreille, du mamelon, ou du scrotum). Plus rarement, des atteintes oculaires (conjonctivites, kératites notamment), des troubles de la conduction cardiaque, à type de bloc atrioventriculaire plus ou moins sévère, peuvent apparaître quelques semaines après l'inoculation. Les péricardites ou myocardites sont également très rares, ainsi que les myosites.

Les protocoles thérapeutiques sont les mêmes qu'à la phase d'infection localisée, sauf en cas de neuroborréliose ou de bloc atrioventriculaire où les céphalosporines de

**TABLEAU 37-2-3**

**Traitement de la borréliose de Lyme en Europe (d'après EUCALB).**

| *Tableaux cliniques et antibiotiques* | *Voie d'administration* | *Dose* | | *Durée* |
|---|---|---|---|---|
| | | *Adultes* | *Enfants* | |
| **Erythème migrant*et lymphocytome borrélien†** | | | | |
| Doxycycline‡ | Orale | 2 100 mg | Restrictions d'utilisation‡ | 14 jours (10–21 jours) |
| Amoxicilline | Orale | 3 500–1000 mg | 25–50 mg/kg | 14 jours (10–21 jours) |
| Céfuroxime axétil | Orale | 2 500 mg | 30–40 mg/kg | 14 jours (10–21 jours) |
| Pénicilline V | Orale | 3 1,0–1,5 MU | 0,1–0,15 MU/kg | 14 jours (10–21 jours) |
| Azithromycine† | Orale | 2 500 mg 1 500 mg | 20 mg/kg 10 mg/kg | premier jour 14 jours suivants |
| **Neuroborrélioses** | | | | |
| Ceftriaxone§ | iv | 2 g | 50–100 mg/kg | 14 jours (10–30 jours) |
| Pénicilline G | iv | 20 Mio | 0,25–0,5 MU/kg | 14 jours (10–30 jours) |
| Doxycycline‡ | Orale | 2 100 mg ou 200 mg | Restrictions d'utilisation‡ | 21 jours (14–30 jours) |
| **Arthrites (intermittentes ou chroniques) et cardioborrélioses§** | | | | |
| Doxycycline‡ | Orale | 2 100 mg | Restrictions d'utilisation‡ | 21 jours (14–30jours) |
| Amoxicilline | Orale | 3 500–1000 mg | 25–50 mg/kg | 21 jours (14–30 jours) |
| Ceftriaxone§ | IV | 2 g | 50–100 mg/kg | 21 jours (14–30 jours) |
| Acrodermatite chronique atrophiante | | | | |
| Ceftriaxone§ | IV | 2 g | 50–100 mg/kg | 21 jours (14–30 jours) |
| Doxycycline‡ | Orale | 2 100 mg | Restrictions d'utilisation‡ | 21 jours (14–30 jours) |
| Amoxicilline | Orale | 3 500–1000 mg | 25–50 mg/kg | 21 jours (14–30 jours) |

IV = intraveineuse ; MU = million d'unités ; pénicilline V = phénoxyméthylpénicilline.
* Traitement en cas d'érythèmes migrants multiples (secondaires, EM récidivant) comme pour la neuroborréliose aiguë.
† L'azithromycine est principalement considérée comme un traitement alternatif pour les enfants, les femmes enceintes et les femmes allaitantes qui sont allergiques à la pénicilline.
‡ La doxycycline ne doit pas être utilisée chez les enfants de moins de 8 ans (12 ans dans certains pays), ni chez les femmes enceintes et les femmes allaitantes.
§ D'autres céphalosporines de troisième génération comme le céfotaxime sont aussi actives.

troisième génération en administration parentérale sont les plus fréquemment utilisées (tableau 37.2.3).

L'infection peut, en l'absence de traitement, se chroniciser et succéder aux manifestations disséminées. Il peut s'agir d'arthrite chronique évoluant depuis plus de 1 an, sans rémission. Les manifestations neurologiques chroniques peuvent se traduire par des neuropathies axonales (paresthésies des extrémités, radiculopathies asymétriques). Des manifestations neurologiques centrales pures (troubles de l'attention, troubles mnésiques, signes d'irritation pyramidale) sont possibles et de diagnostic difficile. Enfin, l'acrodermatite chronique atrophiante (ou maladie de Pick-Herxheimer) peut survenir plusieurs années après l'inoculation. Elle évolue lentement en deux phases : une phase initiale infiltrative (érythème violacé, œdémateux, mou, sans augmentation de chaleur locale) à la face d'extension des membres (dos des mains, coudes, chevilles ou genoux) ; puis, en l'absence de traitement, une phase chronique atrophique (épiderme aminci sans œdème) qui laisse apparaître le réseau vasculaire. Au stade d'acrodermatite chronique atrophiante, comme en cas d'autres manifestations chroniques, la sérologie est toujours très fortement positive. Le traitement de ces phases d'infections chroniques repose essentiellement sur l'utilisation des céphalosporines de troisième génération pendant plusieurs semaines (tableau 37.2.3).

## Fièvre récurrente épidémique à poux

Cette infection est généralement sévère. Son caractère épidémique est le reflet de la transmission interhumaine des ectoparasites infectés par *B. recurrentis*. Elle associe le plus souvent fièvre brutale, douleurs diffuses (myalgies), toux, signes méningés, hyperhémie conjonctivale,

adénopathies, hépatosplénomégalie et ictère. Les accès fébriles durent en moyenne 6 jours et sont entrecoupés de rémission de 7 jours. On peut compter une à cinq récurrences fébriles. La gravité de cette infection réside dans l'apparition de complications surtout neurologiques, avec convulsions, déficits moteurs et coma, mais aussi parfois de complications cardiaques et hémorragiques. En l'absence de traitement, la létalité de la fièvre récurrente épidémique à poux est élevée (10 à 40 %). Lors du traitement, la survenue d'une réaction de Jarrish-Herxheimer, liée à la lyse des spirochètes, complique souvent l'évolution.

### Fièvres récurrentes endémiques à tiques

L'incubation de ces fièvres varie de 2 à 18 jours après la piqûre de tique. Elle s'exprime brutalement par une fièvre élevée à 40 à 41 °C, avec frissons, douleurs diffuses, signes digestifs et neurologiques. La raideur méningée et l'hépatosplénomégalie sont des signes cliniques majeurs. Après 3 à 5 jours, la fièvre chute soudainement, laissant place aux sueurs et à l'abattement. La rate diminue de volume. Les rémissions durent 7 à 9 jours, puis les accès fébriles récidivent suivis de phases d'apyrexie. Ces récurrences sont très évocatrices du diagnostic. Selon les espèces de *Borrelia*, on compte 9 à 15 récurrences. Au fil du temps, les récurrences sont moins intenses. Chaque épisode fébrile reflète une bactériémie importante, jusqu'à $10^7$ bactéries/ml. Les récurrences sont liées à la variation antigénique des protéines de membrane externe de ces *Borrelia*. Chaque résolution est la conséquence du développement d'anticorps spécifiques contre un sérotype donné, et chaque récidive est la conséquence de l'émergence d'un nouveau sérotype. Entre les épisodes, les spirochètes sont présents dans certains organes et notamment dans les structures du système nerveux central, siège de complications dans moins de 5 % des cas. La sévérité est fonction de l'espèce en cause, de l'inoculum, du terrain. Lorsque l'infection survient pendant la grossesse, le risque d'avortement est élevé (50 %). Les complications sont liées à la présence de micro-embolies viscérales, par formation de rosettes érythrocytaires autour des spirochètes. Sans traitement, la létalité de ces infections est aux environs de 2 à 5 %.

Le traitement des fièvres récurrentes repose sur l'administration de tétracyclines en deux prises par jour ou de pénicilline G, pendant 10 jours. Dans les formes compliquées d'atteintes neurologiques, la ceftriaxone est utilisée.

## Caractères bactériologiques

Les dimensions des *Borrelia* sont de l'ordre de 4 à 30 µm de long et 0,2 à 0,5 µm de large. Ce sont des bactéries chimio-organotrophes qui utilisent comme seule source de carbone des hydrates de carbone et des acides aminés. Elles sont classiquement considérées comme microaérophiles.

Leur membrane externe a une structure trilamellaire. La membrane externe des *Borrelia* comprend des polypeptides et lipoprotéines en abondance, mais ne contient pas de LPS. La faible densité de protéines transmembranaires confère une fragilité particulière aux *Borrelia*. Ainsi, contrairement aux bactéries à Gram négatif, ces spirochètes ne résistent que faiblement aux contraintes physiques (centrifugation, mise en suspension) et chimiques (détergents). Contrastant avec la faible densité de protéines transmembranaires, la présence de nombreuses protéines de surface contribue à fournir une capacité d'adaptation de ces bactéries au vecteur et à l'hôte.

Cette membrane externe circonscrit l'espace périplasmique qui contient de 7 à 20 flagelles. Ces derniers sont enroulés autour du cylindre protoplasmique, compartiment le plus interne, et sont fixés en position subterminale. Ces flagelles permettent aux spirochètes de se déplacer, notamment dans un environnement visqueux.

Le cylindre protoplasmique des *Borrelia* renferme un chromosome linéaire et de nombreux plasmides circulaires et linéaires. Ce matériel génétique est inhabituel, car la plupart des bactéries ont un chromosome circulaire. La taille du génome de *B. burgdorferi* sensu lato est de 1,5 mégabase, dont 0,9 mégabase pour le chromosome. Le GC % moyen est de 28,6 %. Ce taux faible de guanine-cytosine différencie le genre *Borrelia* des genres *Leptospira* et *Treponema* où il varie de 35 à 53 %.

### Diagnostic bactériologique

#### *Aspects préanalytiques*

La recherche directe de *B. burgdorferi* sensu lato est réalisée sur biopsies et liquides. La biopsie de peau doit être prélevée au site lésionnel de l'érythème migrant à la phase primaire, du lymphocytome borrélien à la phase secondaire, ou de l'acrodermatite chronique atrophiante à la phase tardive. C'est le prélèvement qui permet le plus souvent la mise en évidence des spirochètes (par culture et/ou par amplification génique in vitro). En cas d'érythème, la biopsie est prélevée en bordure de la lésion. En pratique, le prélèvement doit être réalisé en respectant strictement les règles d'asepsie, qui diminuent le risque de contamination de la culture par les bactéries de la flore cutanée. Une *punch-biopsy* de 2 à 4 mm est suffisante. Pour la culture, le tissu doit être ensemencé immédiatement en milieu liquide spécifique BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) au lit du patient. Pour les analyses par biologie moléculaire, le transport au laboratoire peut s'effectuer soit dans le milieu BSK à température ambiante, soit dans quelques gouttes de sérum physiologique à +4 °C en moins de 24 heures, ou à −80 °C si le délai est plus long.

En cas de neuroborréliose aiguë ou chronique, la recherche directe par culture ou amplification génique de *B. burgdorferi* sensu lato dans le LCR n'est pas d'une grande sensibilité (inférieure à 30 % en moyenne). Le conditionnement du LCR en vue de la culture est alors similaire à celui de la peau. Pour la recherche par

amplification génique in vitro, le LCR est acheminé tel quel au laboratoire, à +4 °C, en moins de 24 heures, ou transporté congelé puis conservé à −80 °C si le délai est plus long. Le LCR est surtout utilisé pour mettre en évidence une pléiocytose et la présence d'anticorps anti-*Borrelia* spécifiques.

En cas d'arthrite de Lyme, le liquide synovial et/ou la biopsie synoviale de l'articulation atteinte sont à prélever en respectant les règles d'asepsie. Le conditionnement de ces prélèvements en vue de la culture ou de l'amplification génique in vitro est à réaliser comme décrit précédemment pour la peau. Dans le liquide synovial, il est possible de détecter la présence d'anticorps anti-*Borrelia* spécifiques, mais cet examen apporte peu d'information supplémentaire par rapport à la sérologie sanguine.

La culture de *B. burgdorferi* sensu lato à partir du sang est possible, mais de faible rendement en Europe (sensibilité : 40 % aux États-Unis, < 10 % en Europe car la dissémination sanguine de *B. afzelii*, espèce majoritaire en Europe, est peu fréquente). En phase de dissémination systémique, on estime qu'il y a environ 0,1 *B. burgdorferi* sensu lato/ml dans le sang total. La mise en évidence de *B. burgdorferi* sensu lato dans le sang, le plasma ou le sérum nécessite ainsi un volume important de sang analysé (> 20 ml).

Le diagnostic des fièvres récurrentes à poux ou à tiques repose sur l'examen direct du sang prélevé lors des accès fébriles. Pour cela, le sang doit être prélevé sur anticoagulant (EDTA ou tube citraté) et acheminé très rapidement au laboratoire.

## Diagnostic direct

### Examen direct

La mise en évidence directe de *B. burgdorferi* sensu lato, à l'état frais, ou après fixation et coloration, est possible en théorie, mais n'est pas réalisée en pratique courante. En effet, les techniques d'examen direct souffrent d'un manque total de sensibilité car la charge bactérienne tissulaire et dans les liquides de ponction est extrêmement faible. L'immunofluorescence directe manque de sensibilité et n'est pas utilisée en pratique.

À l'inverse, l'examen microscopique représente la méthode diagnostique la plus courante pour les fièvres récurrentes. La recherche des spirochètes est généralement réalisée dans le sang, sur frottis fin coloré au Giemsa, ou frottis épais observé au fond noir. Cette dernière technique est 20 fois plus sensible que le frottis fin coloré. Outre le Giemsa, d'autres colorations telles que l'acridine orange peuvent être employées.

### Culture

En dépit de sa faible valeur prédictive négative, la culture de *B. burgdorferi* sensu lato à partir de prélèvements de patients est toujours considérée comme la technique de référence pour le diagnostic biologique des formes cutanées de la borréliose de Lyme. Si sa sensibilité peut avoisiner les 80 % dans les biopsies d'érythème migrant de patients américains, elle est bien moindre dans le LCR (17 %) et les autres liquides biologiques (liquide synovial, sang).

La culture in vitro de *B. burgdorferi* sensu lato nécessite un milieu spécifique riche, le milieu liquide BSK modifié plusieurs fois afin d'améliorer le rendement de la culture. Un milieu BSK standardisé est disponible dans le commerce (Sigma), sous le nom de BSK-H®. À 32 à 34 °C, le temps de génération de *B. burgdorferi* sensu lato est en moyenne de 7 à 20 heures. Pour cette raison, le délai de positivité d'une culture à partir d'un prélèvement humain est souvent de l'ordre de 10 à 20 jours ; les cultures doivent être observées une fois par semaine et conservées 8 semaines avant de conclure à la négativité de la culture. Soixante-dix pour cent des biopsies cutanées positives et 85 % des plasmas positifs de patients présentant un érythème migrant sont détectés par culture en 2 semaines. Ce taux s'élève à 95 % en 4 semaines.

En pratique, la mise en évidence directe par culture de *B. burgdorferi* sensu lato à partir de biopsies ou de liquides prélevés avant tout traitement doit être réalisée par ensemencement immédiat sur milieu BSK additionné d'antibiotique(s) (rifampicine, polymyxine, vancomycine, néomycine), pour limiter le risque de contamination par la flore commensale du patient, notamment par la flore cutanée. La culture doit être maintenue entre 32 et 34 °C et observée systématiquement une fois par semaine en microscopie optique à fond noir ou par immunofluorescence directe car une culture positive ne trouble pas le milieu de culture. Les cultures sont repiquées à J + 15 en cas de négativité de la culture primaire.

Plus les prélèvements tissulaires ou liquidiens sont réalisés précocement dans l'évolution clinique (érythème migrant ou neuroborréliose aiguë), plus ils sont riches en spirochètes, meilleures sont les chances de croissance de *B. burgdorferi* sensu lato en culture. Néanmoins, l'isolement de *B. burgdorferi* sensu lato est possible des années après l'apparition de lésions d'acrodermatite chronique atrophiante. Jusqu'à ces dernières années, la culture était obligatoire pour procéder à l'identification de l'espèce de *Borrelia* en cause par typage moléculaire qui peut actuellement être réalisé directement par PCR sur l'échantillon.

Les cultures et l'identification des *Borrelia* sont l'apanage de laboratoires spécialisés. En France, on peut s'adresser au Centre national de référence (CNR) des *Borrelia*.

En résumé, la culture est la méthode de référence pour la détection directe de *B. burgdorferi* sensu lato. Elle est relativement performante à partir de biopsies cutanées mais manque nettement de sensibilité quand elle est appliquée au LCR, au sang ou au liquide synovial. Ses indications principales, outre l'intérêt épidémiologique, sont les lésions érythémateuses atypiques de la phase précoce de l'infection. La culture a peu d'intérêt dans les autres manifestations de la borréliose de Lyme.

La culture des *Borrelia* responsables des fièvres récurrentes est difficile et n'est pas réalisée en pratique courante pour le diagnostic de ces infections. Pour l'isolement des *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes, l'inoculation à la souris a été utilisée pendant longtemps. Actuellement, certaines espèces peuvent être cultivées sur milieu axénique comme celui utilisé pour cultiver *B. burgdorferi* sensu lato. Mais cette pratique reste l'apanage des laboratoires spécialisés.

Quelle que soit la souche de *Borrelia,* la culture peut permettre son isolement mais en aucun cas son identification, ni sur des caractères phénotypiques, ni sur des caractères culturaux (métabolisme réduit de *Borrelia*). Ce sont les méthodes génomiques (électrophorèse en champ pulsé, électrophorèse de fragments PCR, séquençage, MLST) qui permettent actuellement en pratique d'identifier et de typer les différentes espèces de *Borrelia* responsables des fièvres récurrentes.

### Techniques moléculaires de détection *de Borrelia*

Ces techniques reposent sur l'amplification génique in vitro par réaction de PCR. Elles permettent la détection mais également le typage des différentes espèces, notamment du complexe *B. burgdorferi* sensu lato.

Pour le diagnostic direct de la borréliose de Lyme, l'amplification génique se pratique sur les différents prélèvements (peau, sang, plasma, LCR, liquides internes et tissus). Les cibles sont chromosomiques (*rRNA*, *FlaB*, *recA*, *p66*), ou plasmidiques (*ospA, ospB*). La mise en œuvre de ces techniques nécessite une mise au point délicate et demeure actuellement réservée aux laboratoires spécialisés. Quelques coffrets commerciaux sont disponibles, mais cet acte n'est actuellement pas inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale.

En général, la sensibilité des méthodes d'amplification génique in vitro est similaire à celle de la culture pour les biopsies cutanées d'érythème migrant, mais la PCR a l'avantage de fournir rapidement un résultat, de s'affranchir des problèmes de contamination par la flore cutanée et de simplifier le mode de transport des échantillons. La sensibilité de la PCR est faible dans les liquides comme le sang ou le LCR, bien que pour les neuroborrélioses aiguës récentes cette sensibilité puisse atteindre 50 %. C'est dans les manifestations cutanées secondaires (lymphocytome borrélien) et tardives (arthrite, acrodermatite chronique atrophiante [ACA]) que la PCR est la plus intéressante. Ainsi, en cas d'ACA, la sensibilité de la PCR est supérieure à 60 % alors que la sensibilité de la culture est inférieure à 10 % dans certaines séries. En cas d'arthrite de Lyme, la sensibilité de la PCR est de même nettement supérieure à celle de la culture pour les prélèvements de tissu synovial. Des faux négatifs sont néanmoins possibles par suite à un trop faible nombre de spirochètes présents dans l'échantillon, ou par inhibition de la réaction d'amplification. La recherche d'inhibiteur par contrôle interne est donc indispensable ainsi que l'utilisation de témoins positifs et négatifs.

Pour la détection à visée diagnostique des *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes, les essais développés sont rares. Cela tient en partie au caractère anecdotique et très localisé de ces infections.

À côté des techniques moléculaires de détection, les méthodes moléculaires de typage ont permis, notamment pour les *Borrelia* du complexe *burgdorferi* sensu lato, d'établir de solides bases taxonomiques. Sur ces bases ont été développées des techniques de PCR permettant l'identification de l'espèce infectante sans culture préalable, par l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques d'espèce. Ces techniques, intéressantes d'un point de vue épidémiologique, ne sont pas utilisées en pratique courante pour le diagnostic de la borréliose de Lyme.

### Diagnostic indirect

Pour les raisons précédemment évoquées, les techniques sérologiques sont au premier plan du diagnostic des infections par *Borrelia burgdorferi* sensu lato, notamment dans les formes disséminées et tardives. Au contraire, le diagnostic des fièvres récurrentes à *Borrelia* ne fait pas appel à ces techniques, de moindre intérêt compte tenu du caractère relativement aigu de ces infections. Par ailleurs, la difficulté de culture des *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes n'a pas facilité la production et la caractérisation d'antigènes bactériens nécessaires au développement de ces techniques.

En pratique courante, la confirmation d'une suspicion clinique de la borréliose de Lyme au stade secondaire ou tardif repose principalement sur la sérologie pour sa confirmation. Les signes cliniques des formes secondaires ne sont pas très spécifiques et la mise en évidence directe des *Borrelia* est peu sensible à ce stade. En revanche, l'infection à *Borrelia* induit une réponse immunitaire humorale spécifique de l'hôte qui s'intensifie au cours du temps.

Les tests sérologiques permettent la détection d'anticorps spécifiques de l'hôte, dirigés contre les antigènes de *B. burgdorferi* sensu lato. Parmi ces antigènes, certains sont bien caractérisés :

- la flagelline (41 kDa), antigène immunodominant, qui engendre une réponse anticorps importante et précoce, quelques semaines après le début de l'infection. Mais la spécificité de cette réponse antiflagelline est faible à cause d'une antigénicité commune avec d'autres microorganismes flagellés ou avec des structures de l'hôte (tissu nerveux, synovial, myocardique) ;
- la protéine de surface OspC (21 à 25 kDa), antigène immunodominant précoce. OspC est un facteur de virulence important qui entre en jeu dans l'infectivité et la capacité d'invasion de souches de *B. burgdorferi* sensu lato. Cette protéine est exprimée à la surface des spirochètes pendant la phase précoce de l'infection et la réponse IgM qu'elle engendre est un bon marqueur d'infection débutante ;
- les protéines immunogènes de surface OspA (31 kDa), OspB (34 kDa), qui sont exprimées par les spirochètes aux stades tardifs de l'infection. Elles génèrent des

anticorps bactéricides. OspA a été à la base de la mise au point d'un vaccin humain actuellement retiré du marché. Ce marché, qui fut un temps commercialisé aux États-Unis car actif vis-à-vis de l'espèce *B. burgdorferi* sensu stricto uniquement, était soupçonné d'être potentiellement générateur d'effets secondaires dysimmunitaires ;

- la protéine VlsE (34 à 35 kDa) dont la séquence est codée par le plasmide linéaire lp28-1, qui possède une région invariable hautement immunogène conservée entre les espèces. Cet antigène est un bon candidat pour les tests sérologiques.

Les techniques sérologiques actuellement utilisées pour le diagnostic sérologique de la borréliose de Lyme se déclinent en deux groupes :

- d'une part les techniques dites de dépistage telles les techniques immuno-enzymatiques dont l'ELISA au premier plan, et l'immunochromatographie (IC) ;
- et d'autre part les techniques dites de confirmation, par immuno-empreinte, ou *immuno-blot* ou *Western-blot* (WB).

La démarche sérologique recommandée en France (Conférence de consensus, 2006) pour le diagnostic de la borréliose de Lyme comporte deux étapes : une première étape de dépistage, par ELISA en général, puis si le résultat est positif ou douteux, une deuxième étape de confirmation, par immuno-empreinte sur le même sérum. Pour une bonne interprétation sérologique, il est nécessaire, à la phase aiguë, d'analyser en parallèle deux prélèvements réalisés à 3 à 4 semaines d'intervalle, afin d'objectiver l'élévation du taux d'anticorps spécifiques.

Les normes minimales recommandées par l'European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB) sont : une spécificité de 90 % pour les tests de dépistage en ELISA et une spécificité de 95 % pour les tests de confirmation par immuno-empreinte (spécificité établie par analyse de la population où le test est utilisé pour le diagnostic des infections à *Borrelia burgdorferi* sensu lato).

La sensibilité des tests ELISA dans le sérum est en général inférieure à 50 % en cas d'érythème migrant. Sa négativité ne doit donc pas à tort faire rejeter ou retarder le diagnostic qui reste clinique, même avec la dernière génération de tests ELISA. La sensibilité de cette sérologie augmente en quelques semaines après le début de l'infection.

Au stade de manifestation disséminée, la sérologie est généralement positive. La sensibilité est plus élevée dans les formes secondaires de la maladie (neuroborrélioses, atteintes cardiaques). Au stade de neuroborréliose aiguë, la sérologie peut être négative dans le sérum dans 5 à 20 % des cas et doit donc être couplée à une sérologie dans le LCR. La séropositivité avoisine les 100 % dans les formes tardives comme l'arthrite de Lyme ou l'ACA. À ce stade, les IgG sont souvent très élevées, mais cela ne constitue pas un signe de gravité, de même que la persistance d'IgM. À l'inverse, une sérologie négative à ce stade de la maladie devra faire remettre en cause le diagnostic posé.

En cas de neuroborréliose aiguë ou chronique, les anticorps sont presque toujours détectés dans le LCR. Devant ce résultat, il conviendra d'éliminer un passage passif d'anticorps sériques anti-*Borrelia*. On affirmera le diagnostic de neuroborréliose en complétant l'examen par la recherche d'une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques. Cette recherche s'effectue en analysant en parallèle des échantillons de sérum et de LCR prélevés le même jour. La positivité de cette synthèse spécifique signe une neuroborréliose.

Le risque de faux positif est lié à des réactions croisées (certaines pathologies infectieuses comme les autres spirochétoses, la mononucléose infectieuse, les infections à HSV, le paludisme ; les pathologies dysimmunitaires telles que le lupus, la présence d'anticorps anti-ADN natif, la présence de facteurs rhumatoïdes).

Après un traitement cliniquement efficace, la persistance pendant des mois voire des années d'anticorps spécifiques IgG et/ou IgM est fréquente mais est à considérer comme une cicatrice sérologique. Pour cette raison, un suivi sérologique n'est pas recommandé après traitement. La présence d'IgG cicatricielles d'une infection antérieure guérie ne protège pas contre une réinfection à *B. burgdorferi* sensu lato. Les examens sérologiques spécifiques actuels ne permettent pas la distinction entre une infection active et une cicatrice sérologique.

L'immuno-empreinte, encore appelée *immuno-blot* ou *Western-blot*, est la technique utilisée pour la confirmation de la positivité de la sérologie de la borréliose de Lyme. Le principe de cette technique repose sur la séparation des antigènes de *B. burgdorferi* sensu lato en fonction de leur poids moléculaire, ce qui permet d'objectiver la spécificité des anticorps développés par les patients. À la phase précoce de l'infection par *B. burgdorferi* sensu lato, la présence d'IgM dirigées contre OspC (21 kDa) et Fla (41 kDa) confirme la suspicion d'infection débutante. À la phase d'état de l'infection, l'apparition des IgG survient quelques semaines après l'apparition des IgM, d'où l'intérêt de l'analyse de deux sérums prélevés à plus de 3 semaines d'intervalle. Ces anticorps sont dirigés contre la flagelline et OspC. Les IgG peuvent également réagir contre les protéines de 83/100, 66, 45, 39, 35, 30 et 18 kDa. Des anticorps de type IgG dirigés contre un grand nombre d'antigènes sont typiquement observés dans les cas de neuroborréliose et de borréliose de Lyme tardive.

De nombreuses équipes ont proposé des critères de positivité pour leur test d'immuno-empreinte (tableau 37.2.4). Pour cela, la majorité de ces auteurs prennent en compte à la fois le type et le nombre d'antigènes immunoréactifs. La disparité de ces critères est en partie le reflet du manque de standardisation de ces tests. Outre les différentes contingences techniques, la variabilité géographique des souches infectantes en est également responsable. Pour pallier ce problème de standardisation, certaines équipes ont développé des panels d'anticorps monoclonaux dirigés contre plusieurs antigènes de diverses souches. Le but est d'utiliser la détection de ces antigènes comme standards internes afin de réajuster le poids moléculaire apparent des protéines antigéniques

TABLEAU 37–2–4

**Critères de positivité pour l'interprétation des immuno-empreintes, d'après la littérature.**

| *Référence* | *Technique d'analyse* | *Critères de positivité* |
|---|---|---|
| Grodzicki, 1988 | IE[1] | 2 ou plusieurs bandes en IgM et/ou 2 ou plusieurs bandes en IgG, ou au moins une bande en IgG *et* au moins une bande en IgM parmi les antigènes suivants : P14, P18, P19, P21, P23, P25, P28, P31, P34, P39, P41, P55, P58, P66, P75 et P88 |
| Dressler, 1993 | IE, Mabs[2] | 2 bandes en IgM parmi les antigènes suivants : P18, P21, P28, P37, P41, P45, P58 et P93 ; 5 en IgG parmi les antigènes suivants : P18, P21, P28, P30, P39, P41, P45, P58, P66 et P93 |
| Engström, 1995 | IE, MAbs | 2 bandes en IgM, parmi les antigènes suivants : P24, P39 et P41 ; 2 bandes en IgG, parmi les antigènes suivants : P20, P24-22 forte, P35, P39 et P88 |
| Norman, 1996 | IE, MAbs | 4 bandes parmi les 11 antigènes suivants : P18, P21, P23, P27, P31, P34, P39, P41, P66, P75 et P93 (protéines reconnues pour les trois espèces) |
| Hauser, 1998 | IE, MAbs | Pour PKa2 (*B. burgdorferi* sensu stricto) : 1 bande au moins en IgG parmi les antigènes suivants : P17, P21, POspC, P56, P58 et P83-100 ; en IgM, la bande P41 forte ou au moins 1 bande parmi les antigènes suivants : P17, OspC et P39<br>Pour PKo (*B. afzelii*) : au moins 2 bandes en IgG parmi les antigènes suivants : P14, P17, P21, OspC, P30, P39, P43, P58 et P83-100 ; en IgM, une bande P41 forte ou au moins 1 bande parmi les antigènes suivants : P17, OspC, P39<br>PBi (*B. garinii*) : au moins 1 bande en IgG parmi les antigènes suivants : P17, P21, OspC, P39 et P83-100. En IgM, une bande P41 forte ou au moins 1 bande parmi OspC et P39 |
| Robertson, 2000 | IE, MAbs | 7 règles d'interprétation en fonction de la souche utilisée,<br>2 à 3 bandes en général, en IgM les antigènes P41 et OspC sont importants, en IgG certains des antigènes suivants : P17, OspC, P39, P41, P43 et P58 P83/100 sont pris en compte, selon la souche utilisée |

[1] IE : immuno-empreinte.
[2] MAbs : calibration par anticorps monoclonaux.

observées dans différentes études et d'interpréter de manière fiable les résultats. Une étude européenne multicentrique a été réalisée sur ce principe dans les années 2000. Malgré cela, les auteurs n'ont pas réussi à définir des critères de positivité universels en immuno-empreinte adaptés au diagnostic de la borréliose de Lyme en Europe. Différents critères de positivité européens sont cependant disponibles, qui doivent, avant d'être adoptés, être testés par chaque laboratoire selon les normes minimales techniques recommandées par l'EUCALB.

Les limites de l'immuno-empreinte sont liées à la subjectivité de la détection et de l'interprétation visuelle des bandes, d'où l'intérêt d'*immuno-blots* recombinants plus faciles à lire.

En pratique, la réalisation d'une immuno-empreinte est justifiée après un test ELISA positif ou douteux, pour confirmer le résultat, car la spécificité de l'immuno-empreinte est supérieure à celle de l'ELISA. Cependant, en zone d'endémie de la borréliose de Lyme, son interprétation est difficile car la méthode met en évidence une séroprévalence élevée chez les sujets sains.

## Traitement

Le traitement de la borréliose de Lyme est fonction du stade de l'infection en termes de durée et d'antibiotique utilisé. À la phase précoce, on administre de l'amoxicilline ou des tétracyclines telle la doxycycline (200 mg/j pendant 2 semaines). Chez l'enfant, une pénicilline sera préférée, comme l'amoxicilline (50 mg/kg/j pendant 3 jours). Devant une forme sévère, une céphalosporine de troisième génération (ceftriaxone) à raison de 2 g/j durant 3 semaines sera privilégiée. En cas d'allergie aux pénicillines, parmi les macrolides, l'azithromycine peut être prescrite. Des recommandations thérapeutiques ont été établies au niveau européen (tableau 37.2.4).

La prophylaxie de la borréliose de Lyme réside dans la lutte contre les piqûres de tiques. Le port de vêtements clairs couvrants protecteurs lors d'excursion en forêt, surtout en période estivale, est efficace. Les répulsifs par vaporisation sur la peau ou les vêtements peuvent être utiles, mais ne sont pas recommandés chez les enfants.

Après l'excursion, l'examen soigneux corporel est l'élément essentiel de la prévention permettant d'enlever la tique le plus rapidement possible, sans l'écraser et en désinfectant soigneusement la lésion de piqûre.

Les *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes sont en général sensibles aux antibiotiques. Le traitement repose sur les tétracyclines en deux prises par jour ou la pénicilline G pendant 10 jours. L'érythromycine peut aussi être utilisée. La mise en route du traitement engendre une réaction de Jarish-Herxheimer quasi constante dans la fièvre récurrente à poux, variable dans le cas des fièvres récurrentes à tiques, mais proportionnelle à la gravité de l'infection. Cette réaction se manifeste par une exacerbation brutale et rapide des signes cliniques, avec état de choc, fièvre, frissons, accélération du pouls et hypertension. Lors de cette réaction, les spirochètes s'agglutinent dans le sang, puis disparaissent. Survient alors la défervescence fébrile accompagnée de sueurs et d'hypotension. Le choc hypotensif peut être fatal.

La prophylaxie des fièvres récurrentes repose sur l'amélioration des conditions d'hygiène corporelle et vestimentaire, la lutte contre les ectoparasitoses, la dératisation associée à l'élimination des tiques.

## Conclusion

Le diagnostic de la borréliose de Lyme repose, en pratique courante, sur des arguments cliniques et sérologiques, surtout lors des phases disséminées ou tardives de la maladie. Le diagnostic des fièvres récurrentes repose sur la confirmation bactériologique de la présence de spirochètes dans le sang par l'examen direct sur frottis sanguin ou de LCR après coloration (MGG).

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. Microbiol Rev 1986 ; 50 : 381–400.

Barbour AG. Relapsing fever and other *Borrelia* infections. In : Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editors. Tropical infectious diseases : principles, pathogens, and practice. Philadelphie : Churchill Livingstone ; 1999. p. 535–46.

Brouqui P, Stein A, Dupont HT, Gallian P, Badiaga S, Rolain JM, et al. Ectoparasitism and vector-borne diseases in 930 homeless people from Marseilles. Medicine (Baltimore) 2005 ; 84 : 61–8.

Conférence de consensus : Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives. 13 décembre 2006

Euzeby JP. http://www.bacterio.cict.fr/b/borrelia.html.

http://www.infectiologie.com/site/_congres_conf_org_spilf.php.

Johnson WD, Golightly LM. *Borrelia* species (relapsing fever). In : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Benett's principles and practice of Infectious Diseases. New York : Churchill Livingstone ; 2000.

Lipsker D, Jaulhac B. Lyme borreliosis. Biological and clinical aspects. Curr Probl Dermatol 2009 ; 37.

Postic D, Baranton G. *Borrelia*. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Section IX 5 : Bactéries d'identification difficile et/ou inhabituelles. Paris : ESKA ; 2002.

Rapports d'activité, Centre national de référence des *Borrelia*. InVS 2003–2010.

Rebaudet S, Parola P. Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe. FEMS Immunol Med Microbiol 2006 ; 48 : 11–5.

Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet 2003 ; 362 : 1639–47.

Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato : taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1999 ; 12 : 633–53.


### Chapitre 37.3

# Genre *Leptospira*

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

## Généralités

Le genre *Leptospira* appartient à la famille des *Leptospiraceae* qui comprend les genres *Leptospira* et *Leptonema*. Seul ce premier est pathogène pour l'homme.

Les *Leptospira* sont classiquement classés selon leurs déterminants antigéniques et deux espèces sont ainsi classiquement reconnues, *Leptospira interrogans*, comprenant les souches pathogènes pour l'homme, et *Leptospira biflexa,* regroupant les souches saprophytes. Ces deux espèces sont subdivisées en sérovars selon la réaction de Martin et Pettit, rassemblés en sérogroupes. On compte ainsi actuellement près de 300 sérovars repartis en 25 sérogroupes. Ces sérogroupes n'ont pas de base taxonomique mais constituent une base épidémiologique pratique (tableau 37.3.1).

Plus récemment, une classification moléculaire comprenant actuellement 17 espèces dénommées a été établie

TABLEAU 37-3-1

**Ancienne et nouvelle taxonomie des principales espèces de *Leptospira*.**

| *Espèce* | *Pathogénicité* | *Sérovar* | *Sérogroupe* |
|---|---|---|---|
| *L. interrogans* | + | *australis*<br>*bratislava*<br>*bataviae*<br>*canicola*<br>*hebdomadis*<br>*icterohemorragiae*<br>*copenhageni*<br>*lai*<br>*pomona*<br>*pyrogenes*<br>*hardjo* | Australis<br>Australis<br>Bataviae<br>Canicola<br>Hebdomadis<br>Icterohemorragiae<br>Icterohemorragiae<br>Icterohemorragiae<br>Pomona<br>Pyrogenes<br>Hardjo |
| *L. alexanderi* | + | *Manhao3* | Manhao |
| *L. fainei* | + | *hurstbridge* | Hurstbridge |
| *L. inadai* | + | *lyme* | Lyme |
| *L. kirschneri* | + | *bim*<br>*cynopteri*<br>*grippotyphosa*<br>*mozdok*<br>*panama* | Autumnalis<br>Cynopteri<br>Grippotyphosa<br>Pomona<br>Panama |
| *L. meyeri* | + | *semaranga* | Semaranga |
| *L. borgpetersenii* | + | *ballum*<br>*castellonis*<br>*javanica*<br>*sejroe*<br>*tarassovi* | Ballum<br>Ballum<br>Javanica<br>Sejroe<br>Tarassovi |
| *L. weillii* | + | *celledoni* | Celledoni |
| *L. noguchii* | + | *fortbragg* | Autumnalis |
| *L. santarosai* | + | *brasiliensis*<br>*georgia* | Bataviae<br>Mini |
| *L. biflexa* | – | *patoc* | Semaranga |
| *L. alstoni* | – | | |
| *L. broomii* | – | | |
| *L. wolbachii* | – | *codice* | |
| *L. wolfii* | – | | |

par hybridation ADN/ADN et par séquençage de l'ADNr 16 S. Cette classification confirme l'individualisation du genre *Leptospira* ; en revanche, elle est indépendante de la classification sérologique, à laquelle on se réfère en clinique et en épidémiologie.

## Épidémiologie et pouvoir pathogène naturel

La leptospirose a une distribution mondiale. Elle est présente dans les pays industrialisés comme dans les pays en voie de développement, mais son incidence est plus élevée dans les régions tropicales que dans les régions tempérées. En France métropolitaine, l'incidence moyenne est de 0,35 pour 100 000 habitants, Dans les DOM-TOM, l'incidence varie de 3 à 25 cas pour 100 000 habitants, avec un maximum en Guadeloupe et en Nouvelle-Calédonie. C'est ainsi que la France reste le pays européen avec l'incidence la plus forte.

La contamination humaine survient à la suite d'un contact direct ou indirect avec des urines d'animaux infectés. *Leptospira* survit facilement dans un milieu extérieur hydrique si celui-ci est à pH alcalin. Le réservoir est essentiellement animal : rongeurs (rats ++), animaux d'élevage (bovins essentiellement), mais aussi animaux domestiques.

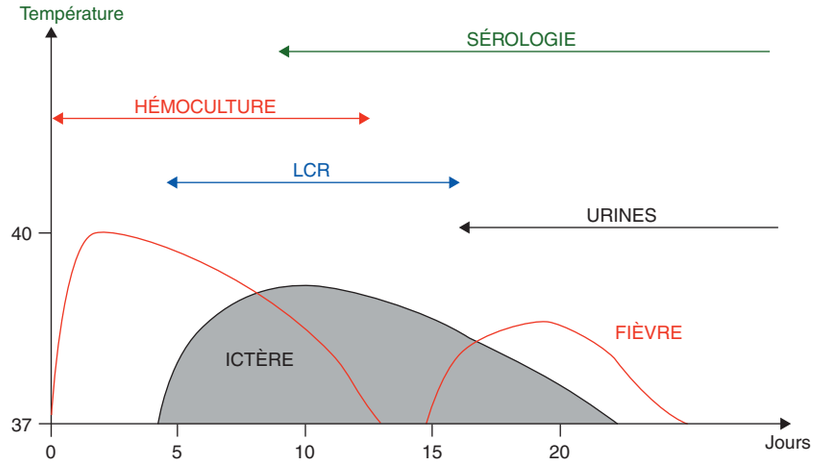



**Fig. 37.3.1.** – *Évolution de la leptospirose et prélèvements à réaliser.*

La leptospirose perdure par suite de la colonisation persistante et asymptomatique de ces spirochètes dans le tubule proximal rénal, notamment dans celui des petits rongeurs. Des associations entre certains hôtes et certains sérovars existent, telles qu'entre le rat et le sérovar Icterohaemorrhagiae.

La leptospirose est décrite dans certaines professions exposées aux morsures de rats mais, dans les pays industrialisés comme la France, l'homme se contamine le plus souvent par l'intermédiaire de milieux hydriques (étangs, rivières) lors d'activités de loisirs (baignade, pêche, voile).

Les leptospires pénètrent alors dans l'organisme par l'intermédiaire d'une érosion cutanée ou par les muqueuses, même intactes. Puis les spirochètes vont disséminer dans tous les organes et l'expression clinique est très variable, allant de la forme fébrile pure modérée à l'atteinte multiviscérale hémorragique. Dans la forme complète, le patient va typiquement présenter, 1 à 2 semaines après la contamination, un syndrome fébrile, un syndrome algique, une atteinte cutanéomuqueuse et un syndrome méningé. Cette phase fébrile dure 5 à 7 jours et est suivie d'une amélioration clinique. Une rechute fébrile est possible au 15e jour qui peut être associée à des altérations hépatiques (cytolyse + cholestase), rénales (dans 15 à 40 %), neurologiques (présence d'une méningite lymphocytaire dans 25 % des cas), hémorragiques, pulmonaires, cardiaques et oculaires (fig. 37.3.1). La mortalité varie de 5 à 15 %. Il n'y a pas de syndrome clinique plus spécifique d'un sérovar ou d'un autre.

## Caractères bactériologiques

Les *Leptospira* sont des spirochètes aux extrémités en crochet possédant un seul flagelle périplasmique à chaque pôle sans chevauchement au centre par différence avec *Treponema* et *Borrelia*. Les dimensions des *Leptospira* sont de 6 à 20 µm de long et 0,1 µm de large. Leur structure, et notamment celle de leur paroi, est semblable à celle des autres spirochètes. En revanche, *Leptospira* ne possède qu'un seul flagelle périplasmique à chaque pôle sans chevauchement au centre par différence avec *Treponema* et *Borrelia*. Comme *Borrelia*, leur mobilité est fonction des conditions de culture. Les *Leptospira* sont chimio-organotrophes et leur métabolisme est aérobie. Par différence avec les *Borrelia*, ils possèdent une catalase et leur croissance ne nécessite pas la présence d'hydrate de carbone ni d'acides aminés dans le milieu de culture.

Leur GC % varie de 35 à 41 %. Les *Leptospira* possèdent deux chromosomes circulaires et leur séquence a été récemment établie.

## Diagnostic bactériologique

### Aspects préanalytiques

Les prélèvements doivent être faits avant toute antibiothérapie, notamment ceux destinés à la mise en culture.

Le sang pour hémoculture ne doit pas être prélevé sur flacons d'hémoculture qui ne permettent pas la croissance de *Leptospira*. On prélèvera ≥ 1 ml de sang sur EDTA ou héparinate de lithium ou oxalate de sodium (proscrire le citrate de sodium qui lyse les leptospires) dans les dix premiers jours de fièvre. La recherche dans le LCR nécessite un volume ≥ à 0,5 ml de LCR qui sera prélevé durant la 2e semaine de la maladie.

La recherche de leptospires dans les urines ne s'effectue qu'à partir de la 3e semaine d'évolution et n'est que rarement positive. *Leptospira* est une bactérie de croissance lente nécessitant un milieu de culture riche ; il est donc impératif de réaliser, préalablement au prélèvement,

une désinfection soigneuse du méat urinaire. Cette bactérie étant de plus peu tolérante au pH acide habituel de l'urine, il est nécessaire, pour toute recherche par culture, de n'effectuer ce prélèvement qu'après avoir alcalinisé les urines du patient par administration de bicarbonates par voie orale. Dans tous les cas, les échantillons seront acheminés dans l'heure suivant le prélèvement à température ambiante. Au total, ces conditions sont rarement remplies et la recherche dans les urines est rarement positive.

La recherche de leptospires dans les eaux suspectes nécessite le recueil d'un litre d'eau.

La sérologie nécessite deux prélèvements, le premier réalisé à partir du 8e jour de la maladie (début de la fièvre), le deuxième effectué 10 jours plus tard. Une antibiothérapie précoce est susceptible de faire avorter la réponse immunitaire spécifique.

Le risque de contamination du personnel de laboratoire est prévenu par le port de gants, et la manipulation des cultures et des animaux infectés s'établit sous poste de sécurité microbiologique.

## Diagnostic direct

### *Examen direct*

Au microscope à fond noir, au grossissement × 100 ou plus, les leptospires apparaissent comme de longs bacilles ondulés et mobiles dont les tours de spire ne sont pas visibles. Cette recherche, étant ni sensible ni spécifique, la recherche par microscopie à fond noir sur le sang, le LCR ou les urines n'est pas recommandée.

### *Culture*

La culture est réalisée en ensemençant les échantillons sur milieu liquide d'Ellinghausen-MacCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH, Difco) ou milieu Tween-albumine. Ce milieu peut être rendu sélectif par ajout de 5-fluoro-uracile ou de fosfomycine, néomycine, kanamycine, rifampicine.

On ensemence un maximum de 10 % du volume final du milieu de culture avec l'échantillon à tester. Il est fortement conseillé de filtrer les urines au préalable sur filtre de porosité 0,45 µm, puis sur un filtre de 0,22 µm. Les cultures sont classiquement incubées à 30 °C à l'obscurité pendant 8 semaines. Elles sont systématiquement contrôlées au microscope à fond noir toutes les semaines car une culture positive ne trouble pas le milieu de culture, et elles sont repiquées systématiquement à J + 15 en cas de négativité de la culture primaire.

Les cultures positives sont identifiées par le Centre national de référence (CNR) des Leptospires à l'Institut Pasteur de Paris. L'identification est réalisée par le CNR par des méthodes moléculaires, et la détermination du sérogroupe se fait par microagglutination à l'aide d'un panel de sérums des différents sérogroupes. La détermination du sérovar s'effectue par des tests d'agglutination et d'absorption croisée.

### *Inoculation à l'animal*

L'inoculation à l'animal est effectuée par inoculation intrapéritonéale de 1 ml de l'échantillon à de jeunes cobayes ou à des hamsters qui peuvent être immunodéprimés pour augmenter la sensibilité de la méthode. Les animaux sont surveillés quotidiennement à la recherche de l'apparition d'une fièvre ≥ 41 °C. Ils sont alors sacrifiés, et le sang, le foie et les reins des animaux inoculés sont broyés en conditions de sécurité puis inoculés en milieu EMJH.

### *Techniques moléculaires*

Ces méthodes sont plus rapides et plus sensibles que l'isolement par culture et ne sont pas sujettes aux problèmes de contamination des échantillons. Elles sont de plus applicables aux échantillons de nature variée (sang, LCR, urine, humeur aqueuse) prélevés aux différents temps de la maladie. Il n'y a pas de consensus sur le gène cible à utiliser pour l'amplification. Certains auteurs utilisent les gènes d'ADNr, d'autres une séquence d'insertion.

La mise en œuvre de ces techniques est actuellement réservée aux laboratoires spécialisés. Cet acte n'est actuellement pas inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale. Le développement récent de différents protocoles par PCR en temps réel va permettre une diffusion large de ces outils diagnostiques en remplacement de la culture et de l'inoculation à l'animal.

## Diagnostic sérologique

Le sérodiagnostic demeure actuellement la méthode la plus utilisée pour établir le diagnostic de leptospirose. Il existe plusieurs méthodes : test de microagglutination sur lame ou « antigène TR », ELISA pour la recherche d'IgM, test d'agglutination microscopique ou MAT.

### *Agglutination sur lame ou « antigène TR »*

#### Principe

C'est une réaction d'agglutination macroscopique sur lame. On met à volume égal le sérum du patient au contact avec un antigène de *L. biflexa* souche patoc inactivé par chauffage (antigène thermorésistant « TR »). Après mélange, la réaction se lit quelques minutes plus tard en cherchant la présence d'amas à la périphérie avec éclaircissement au centre de la goutte réactionnelle.

#### Cinétique

Habituellement, ce test se positive 8 jours après le début de la maladie.

#### Avantages et inconvénients

C'est une réaction simple, rapide et peu onéreuse.

Ce test n'est qu'une réaction de dépistage car il est de spécificité médiocre et tous les résultats positifs doivent être confirmés.

### *Test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)*

#### Principe

Ces tests permettent la recherche d'IgM spécifiques, intéressante pour le diagnostic à un stade précoce de la maladie ainsi que pour le suivi évolutif.

#### Cinétique

L'ELISA IgM est un des tests de dépistage le plus précocement positif, soit 6 à 8 jours après le début de la maladie. Il se négative environ 2 mois après la maladie. Il est utilisable sur LCR en cas d'atteinte neurologique.

#### Avantages et inconvénients

Ce sont des méthodes sensibles et spécifiques. Néanmoins, certains sérogroupes de *Leptospira* (Grippotyphosa, fréquent en France, Australis) peuvent donner des faux négatifs.

### *Test d'agglutination microscopique ou MAT*

Ce test est l'ancienne réaction d'agglutination-lyse de Martin et Pettit mis au point en 1918. C'est la technique de référence.

#### Principe

Le test consiste à évaluer au microscope à fond noir le pourcentage d'agglutination de suspensions de souches représentatives des différents sérogroupes de *Leptospira* en présence de dilutions du sérum du patient. Le seuil de positivité en France métropolitaine est fixé à 1/100$^{e}$. On considère qu'il y a séroconversion si le taux est multiplié par quatre entre deux prélèvements.

#### Cinétique des anticorps

Le MAT se positive 10 à 12 jours après le début de la maladie, soit en général 2 jours après le TR et l'ELISA. Au début de la positivité, on observe une coagglutination vis-à-vis des antigènes de plusieurs sérogroupes. On détecte majoritairement des IgM, puis des IgG. Cela nécessite l'analyse de deux sérums pour pouvoir préciser le sérogroupe causal. Le MAT reste positif à un taux faible pendant des années vis-à-vis du sérogroupe homologue à celui de la souche responsable de l'infection.

#### Avantages et inconvénients

Ce test présente une très bonne spécificité si on analyse deux sérums à 15 jours d'intervalle, mais dans l'évolution de la maladie, c'est le dernier test à se positiver. Il peut être faussement négatif en cas d'antibiothérapie précoce.

C'est un test de réalisation lourde et complexe et d'interprétation délicate.

## Traitement

Deux protocoles antibiotiques sont possibles. Le plus souvent, on utilise la pénicilline G par voie intraveineuse ($6 \times 10^{6}$/j) ou de l'ampicilline ou de la ceftriaxone pendant une semaine pour les formes sévères. L'alternative est constituée par la doxycycline per os (100 mg × 2/j pendant 7 jours), plutôt indiquée pour les formes de gravité modérée.

En cas de contact accidentel, une prophylaxie peut être réalisée par une prise unique de 200 mg de doxycycline.

La vaccination humaine à l'aide d'un antigène du sérovar Icterohaemorrhagiae est proposée en France pour les professions exposées aux morsures de rats (égoutiers, éboueurs).

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Baranton G, Postic D, Dauwalder O. *Leptospira*. In : Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2007. p. 1507–20.

Baranton G, Postic D. Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. Int J Infect Dis 2006; 10 : 162–70.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infect Dis 2003; 3 : 757–71.

Levett P. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001; 14 : 296–326.

Rapport d'activité, Centre national de référence des *Leptospira*. InVS. 2009.

Chapitre 37.4

# Genre *Treponema*

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

## Généralités

Les agents des tréponématoses humaines appartiennent au genre *Treponema* qui fait partie de l'ordre des *Spirochaetales* et de la famille des *Spirochaetaceae*. Ce genre comprend actuellement plus de 26 espèces.

Le genre *Treponema* comprend notamment les pathogènes suivants :

- *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, qui est l'agent de la syphilis vénérienne. Cette maladie est actuellement en recrudescence en France et dans la plupart des pays européens ;
- *Treponema pallidum* subsp. *pertenue*, qui est l'agent du pian, infection cutanéomuqueuse à transmission directe, non vénérienne, fréquemment observée dans la zone intertropicale ;
- *Treponema pallidum* subsp. *endemicum*, qui est l'agent du bejel, infection non vénérienne rencontrée en Afrique du Nord ;
- *Treponema carateum*, qui est responsable de la caraté ou pinta, affection localisée en Amérique Centrale et du Sud, strictement cutanée, à transmission directe, également non vénérienne.

Ces quatre espèces de tréponèmes sont pathogènes pour l'homme et sont non cultivables.

Il existe d'autres espèces de tréponèmes qui sont commensales des muqueuses et cultivables sur milieu artificiel. Ces tréponèmes de la cavité orale sont en général non pathogènes. En association avec certaines bactéries anaérobies, ils interviendraient dans des gingivites et des parodonthies.

## Épidémiologie et pouvoir pathogène naturel

*Treponema pallidum* subsp. *pallidum* est responsable de la syphilis. La syphilis est connue depuis la fin du XV$^{e}$ siècle en Europe.

C'est une affection strictement humaine à transmission vénérienne qui évolue en plusieurs phases.

- La transmission se fait presque toujours par contact direct vénérien car la vitalité des tréponèmes est faible en dehors de l'organisme humain.
- Après une incubation silencieuse de 3 semaines, la *phase primaire* est caractérisée par le chancre d'inoculation : il s'agit d'une ulcération indolore à base indurée, siégeant au point d'inoculation (génital, anal, buccal ou cutané) et accompagnée d'une adénopathie satellite. Non traité, le chancre guérit spontanément en 4 à 6 semaines.
- La *phase secondaire* correspond à la phase de dissémination des bactéries. Elle débute 2 mois environ après le contage et se caractérise par des lésions cutanéomuqueuses très contagieuses qui peuvent être polymorphes (roséole, syphilides, plaques muqueuses, condylomes, alopécie, atteinte des ongles, etc.) et qui vont souvent s'accompagner de micropolyadénopathies et d'un syndrome infectieux. Ces signes disparaissent spontanément en 1 à 2 ans.
- En l'absence de traitement, survient alors une phase silencieuse, dite *syphilis latente* (pendant laquelle la maladie est cliniquement asymptomatique et non contagieuse).
- Dans 20 à 30 % des cas, cette phase est suivie 2 à 10 ans après d'une *phase tertiaire*, caractérisée par des atteintes viscérales, cardiovasculaires (aortite, anévrisme de l'aorte) ou neurologiques (paralysie générale), associées à des lésions osseuses ou cutanéomuqueuses.

Les malades sont contagieux pendant les phases primaire et secondaire où les tréponèmes sont très nombreux dans les lésions cutanées et muqueuses.

La syphilis peut être transmise au fœtus par sa mère lorsque celle-ci est atteinte de syphilis évolutive. Le risque pour le fœtus est très faible durant le 1$^{er}$ trimestre de grossesse mais élevé à partir du 4$^{e}$ mois. Le passage transplacentaire de *T. pallidum* entraîne alors une atteinte systémique du fœtus, responsable de la mort fœtale ou d'une forme néonatale précoce de mauvais pronostic. L'atteinte est d'autant plus sévère que la contamination est plus précoce.

Un nouveau-né contaminé au cours de l'accouchement développe une forme congénitale ; elle peut être asymptomatique ou comporter des lésions cutanéomuqueuses, une atteinte osseuse et des troubles hématologiques.

La contamination est aussi possible par l'intermédiaire de produits sanguins, d'où la réalisation d'un contrôle systématique des donneurs de sang. Dans les pays effectuant ce contrôle, ce mode de transmission reste possible chez les toxicomanes par voie intraveineuse.

Depuis que la pénicilline permet de traiter efficacement la syphilis et qu'un dépistage systématique a été instauré, le nombre de cas de syphilis a beaucoup diminué. Cette maladie a réémergé au début des années 2000 aux États-Unis, en Europe de l'Est et en France, du fait d'une conjonction de facteurs : infection par le VIH, toxicomanie, appauvrissement des populations et changement des mœurs sexuelles. Cette augmentation était parallèlement corrélée à une augmentation des gonococcies. Un réseau de surveillance de la syphilis en France a ainsi été créé en 2000 : le réseau RésIST coordonné par l'InVS puis un Centre national de référence (CNR) en 2006. Il récolte les données ethniques et cliniques auprès de sites volontaires :

les Centres d'information, de dépistage et de diagnostic des infections sexuellement transmissibles (Ciddist), des consultations hospitalières et des médecins de ville. Le nombre de cas de syphilis déclarés a d'abord augmenté jusqu'en 2007 pour diminuer en 2008 et 2009, en Île-de-France et dans les autres régions. L'augmentation de la proportion de syphilis diagnostiquée latente pourrait suggérer un défaut de diagnostic de la syphilis et donc une sous-déclaration. Parallèlement, en 2009, le nombre d'infections à gonocoque augmente fortement dans les deux sexes. L'analyse des données entre 2005 et 2009 montre que 95 % des patients atteints de syphilis sont des hommes et 5 % des femmes dont l'âge moyen est 32 ans. Près de 90 % sont des homo-bisexuels masculins en Île-de-France. Dans les autres régions, les hétérosexuels représentent 25 % des cas déclarés. La fellation non protégée est la pratique à l'origine de la contamination dans 55 % des cas. Un grand nombre de malades sont co-infectés par le VIH mais le pourcentage a diminué de 61 % en 2000 à 54 % entre 2005 et 2009.

Dans les tréponématoses endémiques (pian, pinta, bejel), la contamination n'est pas vénérienne et a le plus souvent lieu dans l'enfance par contact avec des lésions contagieuses. La clinique du pian est superposable à celle de la syphilis. Il évolue en trois phases mais ne se complique pas de localisations viscérales tardives. La syphilis endémique ou bejel s'observe aux Antilles, au Moyen-Orient (zones sèches) et dans les régions désertiques d'Afrique. Le pian se retrouve dans les régions intertropicales mais humides, et la pinta ou caraté en Amérique Centrale et Amérique du Sud.

Aucune technique de diagnostic direct ou indirect ne permet de distinguer ces agents pathogènes de tréponématoses non vénériennes de *T. pallidum* subsp. *pallidum*.

## Caractères bactériologiques

*T. pallidum* est une bactérie mobile, de forme hélicoïdale, mesurant 8 à 15 µm de long sur 0,3 µm de large. Elle a été mise en évidence au microscope à fond noir pour la première fois par Shaudinn et Hoffmann. Sa structure est commune à celle des autres spirochètes. Entre la membrane externe et le peptidoglycane on trouve des flagelles insérés aux extrémités et enroulés autour du corps bactérien qui constituent l'organe moteur et donne sa forme à la bactérie.

La couche de peptidoglycane est très mince et *T. pallidum* est une bactérie très fragile, rapidement tuée par la chaleur, le froid et la dessiccation. Ce spirochète ne survit pas dans le milieu extérieur et est strictement adapté à l'homme.

*T. pallidum* n'a actuellement jamais pu être cultivé in vitro. Seules des souches d'autres espèces de tréponèmes, non pathogènes, ont pu être cultivées, notamment *T. phagedenis*, souche Reiter, qui possède des antigènes communs à *T. pallidum* et qui, de ce fait, a été utilisée à des fins diagnostiques.

La culture de *T. pallidum* est possible in vivo par injection intratesticulaire de *T. pallidum* à un lapin qui provoque en 9 à 11 jours une orchite riche en tréponèmes. La souche Nichols est ainsi régulièrement entretenue sur testicule de lapin et est utilisée pour réaliser une suspension antigénique pour lames d'immunofluorescence indirecte (et le test diagnostique de Nelson qui a été abandonné).

Les antigènes de *T. pallidum* sont nombreux : peptides, glycoprotéines et polysaccharides de l'enveloppe externe sont antigéniques ainsi que les protéines des flagelles. Le cardiolipide qui suscite la formation d'anticorps fixant le complément (réagine syphilitique) est un constituant non spécifique de la membrane cytoplasmique.

## Diagnostic direct

### Aspects préanalytiques

Les prélèvements doivent être faits avant toute antibiothérapie. *T. pallidum* peut être mis en évidence dans les lésions primaires et secondaires de la maladie. Le prélèvement doit ramener une sérosité exempte de sang qui permettra un examen microscopique direct à l'état frais ou après fixation et coloration. Un résultat positif fait suspecter la syphilis, un résultat négatif ne l'élimine pas.

Les prélèvements à effectuer sont les suivants.

- Chancre et lésions cutanées : le prélèvement doit de préférence être réalisé au laboratoire (à défaut, acheminer au maximum dans les 30 minutes qui suivent) et être examiné immédiatement. Après nettoyage au sérum physiologique, on prélève les sérosités présentes au fond du chancre ou des lésions.
- Neurosyphilis : la recherche dans le LCR nécessite un volume ≥ 0,5 ml de LCR. Le LCR est acheminé tel quel au laboratoire, à +4 °C, en moins de 24 heures, ou transporté congelé puis conservé à –80 °C si le délai est plus long (l'examen au microscope à fond noir est alors sans valeur). Le LCR est surtout utilisé pour mettre en évidence une pléiocytose, une hyperprotéinorachie, la présence d'anticorps anti-*Treponema* ou une PCR spécifique.

### État frais

Au microscope à fond noir, les tréponèmes apparaissent comme des spirales ondulées et mobiles.

On ne peut distinguer *T. pallidum* des tréponèmes saprophytes (surtout *T. denticola* et *refringens*), d'où un risque de faux positif pour certaines localisations de lésions (bouche, anus). Ces localisations ne doivent pas faire l'objet d'une analyse en fond noir.

La sensibilité de ce test est variable en fonction de l'entraînement de l'observateur. Elle a été évaluée jusqu'à 97 % sur des prélèvements de lésions génitales dans des syphilis primaire et secondaire (Wheeler et al., 2004).

Néanmoins, la détection peut s'avérer négative s'il y a peu de tréponèmes dans le prélèvement (surtout dans les lésions cutanées), après traitement local ou général, ou à cause d'un problème technique (présence de sang, mauvais réglage du microscope, etc.). Cet examen est difficilement réalisable en dehors des services spécialisés et entraînés.

### Coloration

La méthode de Gram n'est pas utilisable. Les meilleurs résultats sont obtenus par l'imprégnation argentique de Fontana-Tribondeau, de réalisation délicate.

### Immunofluorescence directe

Les frottis sont recouverts d'une dilution d'anticorps monoclonaux anti-*T. pallidum* marqués par un fluorochrome ou par des anticorps polyclonaux non marqués révélés dans un second temps par une antiglobuline spécifique d'espèce marquée à la fluorescéine. Après lavages, les frottis sont observés en microscopie à éclairage ultraviolet.

Les avantages de la fluorescence sont une meilleure spécificité et une meilleure sensibilité. En effet, elle permet de distinguer *T. pallidum* des tréponèmes saprophytes.

### Test d'infectivité sur lapin

Cette méthode n'est pas praticable en routine et nécessite un laboratoire spécialisé. C'est la technique directe la plus sensible et le seul test valable pour démontrer la présence de tréponèmes virulents. Elle a une sensibilité proche de 100 % chez un malade n'ayant pas reçu d'antibiotiques.

### Méthodes moléculaires

Différentes cibles ont été proposées pour détecter la présence d'ADN de *T. pallidum* par PCR directement dans les échantillons biologiques et notamment les gènes des protéines de membrane externe.

La PCR a une bonne sensibilité dans les écouvillons de lésions de syphilis primaire, mais montre une sensibilité modérée dans le sang lors des syphilis primaire et secondaire. Dans la syphilis primaire, une sensibilité de 94,7 % et une spécificité de 98,6 % sont rapportées pour la détection de *T. pallidum* dans les lésions génitales. La PCR a permis de mettre en évidence une bactériémie chez environ 30 % des patients en phase secondaire.

Dans le liquide amniotique et l'humeur vitrée, la PCR se révèle un outil sensible et spécifique et donc une aide au diagnostic dans des situations où l'interprétation des sérologies est souvent délicate.

Dans le LCR, les résultats sont variables selon la littérature. La recherche d'inhibiteurs doit être systématique pour éviter les faux négatifs. La PCR ne permet pas de différencier *T. pallidum* de *T. pertenue.*

Le statut VIH ne modifie pas la validité de la PCR.

C'est une technique utilisée uniquement dans les laboratoires spécialisés car peu de kits commerciaux sont disponibles et évalués. Cette méthode n'est actuellement pas inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale.

## Diagnostic indirect ou sérologique

La recherche des anticorps antisyphilitiques est, depuis la fin du XIX$^{e}$ siècle, la méthode la plus utilisée pour le diagnostic biologique de la maladie.

Même avec les méthodes actuelles très sensibles, il persiste en début d'infection une phase où la sérologie est négative. En cas de contage récent, il est donc nécessaire de contrôler tout résultat négatif.

Les différents tests disponibles sont résumés dans le tableau 37.4.1 et présentés en algorithme dans la figure 37.4.1.

Les causes de fausses sérologies positives de la syphilis sont présentées dans le tableau 37.4.2. Voir aussi les encadrés 37.4.1 et 37.4.2.

### Réactions à antigène non tréponémique – VDRL (Veneral Disease Research Laboratory), RPR (*rapid plasma reagin*)

L'antigène utilisé est le cardiolipide, haptène lipidique présent chez *T. pallidum*, chez d'autres tréponèmes et d'autres bactéries, mais également dans des cellules végétales ou animales. Il a été utilisé historiquement pour la première fois pour le diagnostic de la syphilis par Wassermann qui a appliqué la réaction de fixation du complément de Bordet, d'où la dénomination de réaction de Bordet-Wassermann ou BW, dénomination encore utilisée improprement par certains prescripteurs, la réaction de fixation du complément n'étant plus utilisée pour cette sérologie.

#### *Principe du VDRL*

C'est une réaction d'agglutination passive entre le sérum non dilué et le réactif antigénique sur lame. L'intensité des agglutinats est notée de 1 à 4 croix.

En cas de dépistage positif, une quantification est effectuée par des dilutions de raison 2 du sérum. Le titre est donné par l'inverse de la dernière dilution présentant une réactivité à 2 croix.

#### *Cinétique*

Habituellement, le VDRL se positive 8 à 20 jours après l'apparition du chancre et quelques jours avant le TPHA et le FTA. Le taux des anticorps augmente rapidement au cours de la syphilis secondaire. C'est la première technique à se négativer après traitement. En l'absence de traitement, le taux peut rester en plateau à des valeurs variables d'un sujet à l'autre.

**TABLEAU 37-4-1**

**Comparaison des différents outils de diagnostic sérologique de la syphilis.**

| | *Tests de dépistage* | | | | *Tests complémentaires* | | | | *Nouveaux tests diagnostiques* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *VDRL-RPR* | *TPHA/TPPA* | *FTA-Abs* | *ELISA* | *IgM* | | | *Nelson (n'est plus pratiqué)* | *Tests «rapides»* | *Western-blot ou Dot-blot* |
| | | | | | *FTA-IgM* | *SPHA* | *ELISA* | | | |
| Nature de l'antigène | Suspension lipidique | Hématies sensibilisées avec lysat de *T. pallidum* | *T. pallidum* entiers fixés sur une lame | Lysat de *T. pallidum* ou protéines recombinantes | *T. pallidum* entiers fixés sur une lame | Hématies sensibilisées avec lysat *T. pallidum* | Lysat de *T. pallidum* ou protéines recombinantes | *T. pallidum* vivants | Protéines recombinantes (P15, P17, TmpA, P47 kDa) | Lysat de *T. pallidum* ou protéines recombinantes |
| Intérêts | – Simple<br>– Rapide<br>– Peu coûteux<br>– Suivi du traitement | – Spécifique<br>– Simple<br>– Peu coûteux<br>– Adaptable à de grandes ou petites séries | – Spécifique<br>– Sensible | – Simple<br>– Spécifique<br>– Sensible<br>– Automatisable, applicable à de grandes séries | – Précoce<br>– Sensible<br>– Spécifique<br>– Marqueur syphilis active<br>– Suivi thérapeutique<br>– Syphilis congénitale | | | Spécificité 100 % | – Test unitaire au « coup par coup » | – Confirmation<br>– Diagnostic syphilis congénitale (IgM spécifiques)<br>– Marqueur d'évolutivité ? |
| Limites | – Faux positif : infections bactériennes, virales, MAI, etc.<br>– Faux négatifs (phénomène de zone) | – Peu influencé par traitement<br>– Faux négatifs : phénomène de zone<br>– Faux positifs : autres tréponématoses | – Lecture délicate<br>– Peu influencé par traitement<br>– Faux positifs : MAI, autres tréponématoses | – Tests qualitatifs<br>– Coût<br>– Peu influencé par traitement<br>– Faux positifs : autres tréponématoses | – Lecture délicate<br>– Faux positifs : MAI | – Réalisation et lecture opérateur-dépendants | – Coût | – Entretien souche vivante<br>– Standardisation<br>– Coût | – Tests qualitatifs<br>– Stabilité à température ambiante<br>– Performance<br>– variable | – Coût<br>– Faux positifs : autres tréponématoses |

MAi : Maladie auto-immune.

**TABLEAU 37-4-2**

**Causes de sérologie syphilis faussement positive.**

| |
|---|
| **Faux VDRL positifs** (fréquents) |
| *Fausses réactions aiguës :*<br>– Causes infectieuses<br>• *bactériennes :* lèpre, tuberculose, leptospirose, borréliose, etc.<br>• *virales* : varicelle, oreillons, mononucléose infectieuse, hépatite virale, rougeole, etc.<br>• *parasitaires* : paludisme, etc.<br>– Causes non infectieuses : grossesse, vaccinations, utilisation de drogues par voie intraveineuse, etc. |
| *Fausses réactions positives chroniques*<br>– Causes infectieuses : infections virales (VIH) ou parasitaires chroniques<br>– Causes non infectieuses :<br>• maladies auto-immunes : lupus, anémies auto-immunes<br>• gammapathie monoclonale<br>• hépatopathie chronique<br>• syndrome des antiphospholipides<br>cancers, etc. |
| **Faux TPHA positifs** (très rare)<br>– Souvent transitoire et d'origine non identifiée<br>– Maladies auto-immunes, grossesse, âge, etc.<br>– Borréliose de Lyme. |
| **Faux FTA positifs** (rare)<br>– Facteurs rhumatoïdes, anticorps anti-ADN.<br>– Maladies auto-immunes, grossesse, infections virales ou bactériennes (autres spirochètes), etc. |

**ENCADRÉ 37.4.1**

### Dépistage de la syphilis en France

En France, le dépistage de la syphilis comprend, selon la nomenclature des actes de biologie, au moins une réaction de chacun des deux groupes suivants :
• Groupe 1 : VDRL Latex, VDRL coloré ou VDRL charbon
• Groupe 2 : FTA-Abs (immunofluorescence indirecte absorbée), TPHA (hémagglutination passive), EIA (méthode immuno-enzymatique) (voir fig. 37.4.1)
Si un des deux tests est positif, un titrage doit être pratiqué sur les deux tests.

### *Avantages et inconvénients*

C'est une réaction simple, rapide et peu onéreuse. Ce test, quantitatif, constitue une bonne technique de dépistage, de suivi des syphilis symptomatiques, de surveillance de l'apparition de recontaminations et un bon marqueur de suivi de l'efficacité thérapeutique.

Le VDRL peut être faussement négatif par l'existence d'un phénomène de zone, d'où la nécessité de toujours tester au moins trois dilutions de chaque sérum. Cela se voit surtout dans les sérums des femmes enceintes, des sujets co-infectés par le VIH et dans le LCR.

Le principal problème est son manque de spécificité. Les causes de faux positifs sont nombreuses : infections bactériennes, virales et parasitaires (tableau 37.4.2) et certains états physiologiques ou pathologiques (grossesse, maladies auto-immunes, toxicomanie, dysprotéinémies, etc.).

**ENCADRÉ 37.4.2**

### Quelques points importants à propos de la syphilis

• Aucun test sérologique ne permet de faire la différence entre une syphilis et une tréponématose non vénérienne (pian, bejel ou pinta).
• Toujours pratiquer les sérologies répétées dans le même laboratoire.
• Un VDRL isolé n'est pas synonyme de syphilis (grossesse, syndrome des anticardiolipides par exemple).
• Le sérodiagnostic de la syphilis ne se positive qu'au 5e à 10e jour du chancre.
• TPHA et VDRL sont toujours fortement positifs au stade de syphilis secondaire. Le TPHA affirme ou infirme le diagnostic de tréponématose, le VDRL en précise l'évolutivité.
• Ne pas chercher à négativer un test tréponémique par des traitements répétés.
• La syphilis est une infection sexuellement transmissible (IST) ; elle peut donc être associée à d'autres IST qu'il convient de rechercher.
• La syphilis est sévère chez la femme enceinte. Son dépistage reste justifié.
• Devant un résultat positif, il est très utile de disposer d'une sérologie antérieure négative.

## Réactions à antigène tréponémique (TPHA, FTA, Nelson, ELISA, *Western-blot*)

### *TPHA (treponema pallidum haemagglutination assay) ou TPPA (treponema pallidum particle agglutination assay)*

#### Principe

C'est une réaction d'hémagglutination passive qui met en contact le sérum du patient avec des hématies (TPHA) ou des particules de gélatine (TPPA) sensibilisées avec un ultrasonicat de *T. pallidum*, après absorption des anticorps anti-antigène de genre *Treponema* et antihématies. Pour le dépistage, le sérum est testé au 1/80e, 1/160e et 1/320e. En cas de positivité, des dilutions de raison géométrique 2 sont réalisées pour le titrage, Les titres obtenus peuvent parfois être très élevés.

Le TPHA est très spécifique s'il est bien réalisé (≥ 99 %) et très sensible, sauf peut-être au stade très précoce de la syphilis où il serait moins sensible que le FTA.

### Cinétique

Le TPHA se positive entre la 3e et 4e semaine après la contamination, soit une semaine à 10 jours après l'apparition du chancre. Le TPHA reste positif longtemps, même chez un malade guéri.

### Avantages et inconvénients

La technique est peu onéreuse et s'applique à de grandes comme à de petites séries.

Il existe de fausses réactions négatives dans certaines syphilis très précoces ainsi qu'en présence d'un excès d'anticorps (phénomène de zone). Ce dernier risque est prévenu en testant systématiquement plusieurs dilutions du même sérum. Le TPHA se positive plus tardivement que le FTA-Abs en début d'infection. Des études récentes rapportent que le TPPA serait plus sensible que le TPHA et le FTA-Abs pour le diagnostic des syphilis primaires.

D'exceptionnelles fausses positivités ont été ponctuellement rapportées dans certaines maladies auto-immunes, la lèpre, la grossesse, ou chez des sujets avec des taux élevés d'IgM, IgA ou IgG non spécifiques.

## *FTA (fluorescent treponemal antibody test)*

### Principe

C'est une réaction d'immunofluorescence indirecte qui met en contact le sérum du patient au 1/200e sur une lame recouverte de tréponèmes entiers tués, d'où la dénomination de FTA-200. Après lavage, les anticorps fixés sont révélés par une antiglobuline humaine marquée par un fluorochrome et la lame est lue en épifluorescence.

Ce test, donnant initialement de nombreuses fausses positivités, a été modifié pour donner le FTA-Abs, ou FTA absorbé, où le sérum du malade est préalablement absorbé par un ultrasonat de tréponèmes saprophytes (souche Reiter). Les résultats qualitatifs sont exprimés en croix selon l'intensité de la fluorescence.

En cas de positivité, des dilutions de sérum de raison géométrique 2 sont effectuées et le titre est l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction fluorescente à deux croix.

### Cinétique des anticorps

Décelables peu après l'apparition du chancre, les anticorps existent à tous les stades de la maladie. Après traitement, ils se négativent lentement et disparaissent dans la majorité des cas.

### Avantages et inconvénients

C'est un test sensible (86 à 96 % selon les stades) et spécifique (92 à 99 %) qui permet de confirmer un diagnostic mais aussi de suivre l'efficacité d'un traitement.

Il existe des faux positifs : maladies auto-immunes, autres spirochétoses (borréliose de Lyme, leptospirose, mais cela est rare) et, selon les auteurs, en cas d'herpès génital.

En revanche, la lecture de ce test reste subjective et exige un personnel expérimenté.

## *Test immuno-enzymatique ou ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)*

### Principe

Les techniques immuno-enzymatiques indirectes ou compétitives utilisent des antigènes tréponémiques purifiés ou recombinants (souche Nichols). Elles existent pour les IgM et les IgG. Le nombre de coffrets commercialisés a nettement augmenté ces dernières années.

Les méthodes ELISA fondées sur une technique d'immunocapture ou de compétition peuvent être plus sensibles que les méthodes sandwich. Les ELISA utilisant des antigènes recombinants ne donneraient pas de meilleures performances que les tests utilisant un sonicat de *T. pallidum* comme antigène.

Ces tests permettent aussi la recherche d'IgM spécifiques, intéressante pour le diagnostic à un stade très précoce de la syphilis ainsi que pour le suivi évolutif.

### Cinétique

L'ELISA est l'un des tests de dépistage le plus précocement positif.

### Avantages et inconvénients

Ce sont des méthodes simples, sensibles, rapides qui sont automatisables donc applicables à de grandes séries et objectives. Elles ne présentent jamais de phénomène de zone. On peut en outre détecter les Ig totales ou les IgG et les IgM séparément. La sensibilité de certains tests ELISA serait supérieure à celle du TPHA. L'ELISA constitue donc une méthode alternative intéressante aux techniques de dépistage.

Néanmoins, les tests sont actuellement uniquement qualitatifs, ce qui ne dispense pas actuellement de réaliser les autres tests si le résultat est positif. Le coût est élevé par rapport au prix du remboursement d'un dépistage sérologique de la syphilis.

La titration des deux tests, en cas de positivité d'un seul test de dépistage, représente un contrôle interne, puisqu'un problème technique sur un test qualitatif peut alors être identifié lors de la titration des deux tests en confirmation (la titration du test non tréponémique étant par ailleurs justifiée par son intérêt dans le suivi du traitement).

## *Test d'immobilisation des tréponèmes (TPI) ou test de Nelson et Mayer*

Ce test a longtemps été considéré comme la technique de référence mais n'est plus utilisé étant donné les problèmes liés à l'entretien d'animaux vivants infectés par ce pathogène.

### Principe

Des tréponèmes pâles vivants, virulents sont immobilisés par l'action des anticorps du patient en présence de complément et en comparaison avec un tube témoin. Les résultats qualitatifs sont exprimés en pourcentage d'immobilisation.

### Cinétique des anticorps

Les immobilisines sont décelées entre 25 et 40 jours après l'apparition du chancre, soit en fin de phase primaire ou début de phase secondaire. Après un traitement efficace, elles disparaissent chez la plupart des malades ; en l'absence de traitement, elles persistent à tous les stades de la maladie.

### Avantages et inconvénients

C'est un test de réalisation complexe et d'interprétation délicate. Il présente une spécificité de 100 % mais, dans l'évolution de la maladie, c'est le dernier test à se positiver.

Il n'est plus pratiqué en France actuellement et peut être remplacé par un test d'immuno-empreinte.

## *Test d'immuno-empreinte* (Western-blot)

### Principe

Des protéines spécifiques de *T. pallidum* sont immobilisées sur une membrane que l'on met en contact avec le sérum du patient. Il existe plus de 22 antigènes tréponémiques polypeptidiques qui réagissent avec le sérum de patients syphilitiques. De nombreux travaux montrent que les bandes les plus importantes pour diagnostiquer une syphilis sont celles de 15,5, 17, 44,5 (TmpA) et 47 kDa.

### Cinétique

Le *Western-blot* serait positif lors de la primo-infection avant le TPHA. La cinétique d'apparition des bandes en fonction de l'évolution de la maladie est encore peu documentée. Les études sont contradictoires mais il semble que :

- les protéines de 17 kDa et TmpA soient mises en évidence dès le stade primaire ;
- la protéine de 15,5 kDa soit détectée aux stades précoce et tardif ;
- la protéine de 47 kDa soit moins spécifique.

### Avantages et inconvénients

Il existe des réactifs commercialisés prêts à l'emploi qui permettent de détecter les IgG et les IgM en 3 heures. La technique est de réalisation facile, sensible et très spécifique. Le *Western-blot* IgG est considéré comme une méthode de confirmation d'une sérologie de dépistage positive ou douteuse qui peut remplacer le test de Nelson.

La méthode est plus sensible que le TPHA. On ne retrouve pas d'interférences avec les anticorps anticardiolipidiques, les facteurs rhumatoïdes ou lors de la grossesse. Des réactions croisées seraient possibles avec les autres spirochétoses.

À noter que ce test ne permet pas de différencier une cicatrice sérologique d'une syphilis latente, ni de distinguer la syphilis des tréponématoses endémiques.

## *Tests rapides*

### Tests immunochromatographiques

La méthode permet de tester les échantillons au coup par coup. Deux antigènes recombinants spécifiques de *T. pallidum* (protéines 17 kDa et 47 kDa) liés à des particules d'or colloïdal sont immobilisés sur une membrane. La bandelette est immergée dans le sérum à tester et, après migration par chromatographie, une bande colorée apparaît au niveau de la zone où sont immobilisés les antigènes en cas de positivité.

C'est un test simple, rapide, qualitatif, de dépistage qui doit être confirmé en cas de positivité par un dosage quantitatif des anticorps (TPHA, FTA). Les tests ont des performances variables selon les coffrets.

### PaGIA (*particle gel immunoassay*)

Cette technique met en jeu des billes sensibilisées avec des antigènes recombinants TpN15, TpN17, TpN47. Après centrifugation des tubes contenant la matrice de gel, la réaction finale se traduit sous la forme d'une agglutination en présence d'un sérum positif. Cette technique offre une excellente spécificité et une sensibilité comparable à celle des autres tests tréponémiques. Elle a l'avantage d'être simple et ne demande que 20 minutes.

### Agglutination

C'est une technique d'agglutination de particules de latex dans laquelle les antigènes recombinants de *T. pallidum* sont liés à des particules de latex.

La sensibilité des tests rapides qui peuvent être réalisés directement au bout du doigt sur sang total est variable selon les études. Les avantages sont leur coût faible, la rapidité des résultats ainsi que leur faisabilité sans matériel ni formation, ce qui est pratique dans les centres de dépistage. Cependant, une confirmation par un autre test avec titrage est nécessaire pour dater l'infection et suivre l'efficacité du traitement.

## *Recherche d'IgM spécifiques antitréponémiques*

### Cinétique des IgM

Les IgM sont les premiers anticorps à apparaître, dès la 2e semaine de l'infection, suivies rapidement par les IgG. Chez les patients non traités, on peut aussi mettre en évidence des IgM au cours de la phase secondaire. Chez les

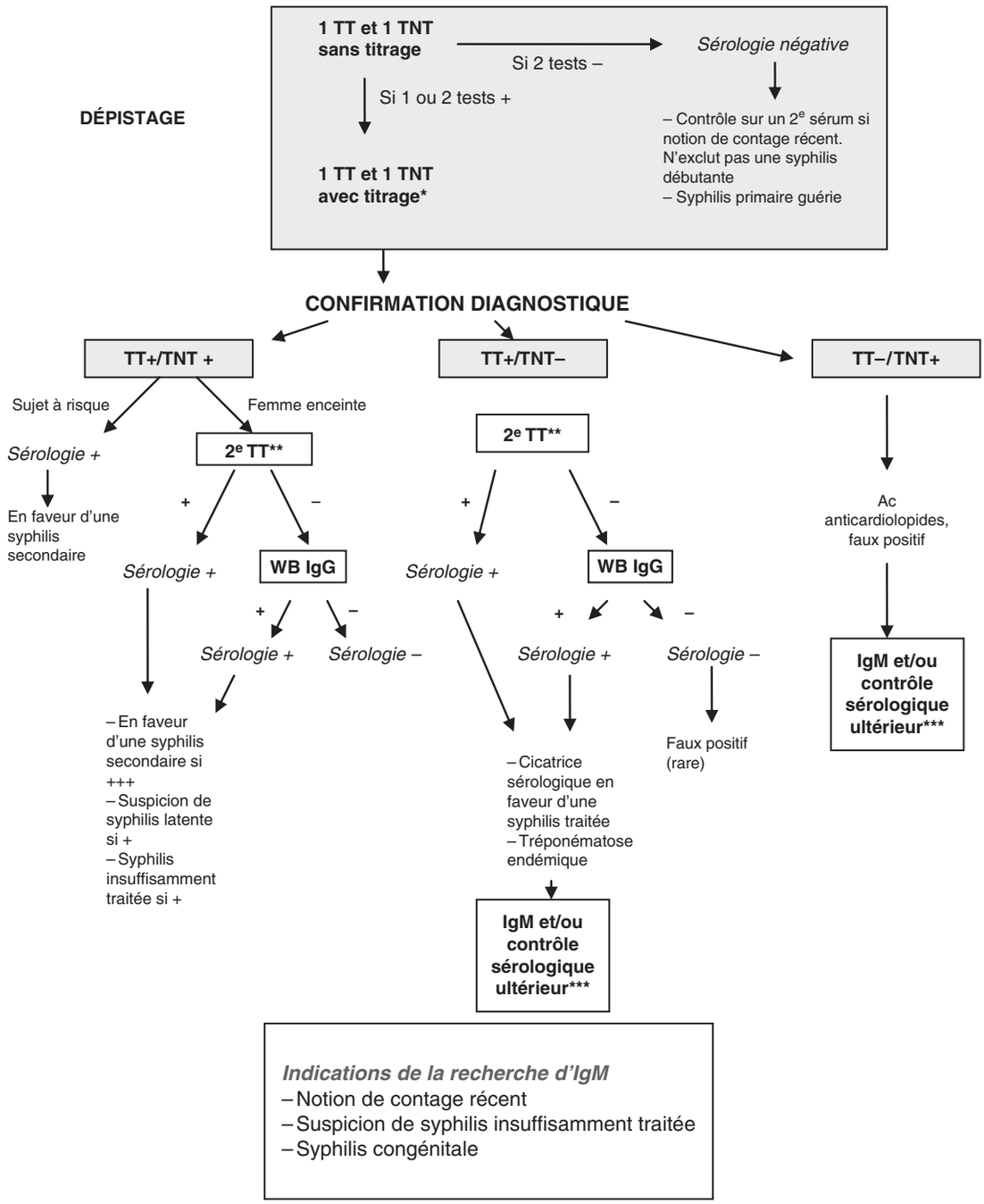



**Fig. 37.4.1.** – *Algorithme pour le diagnostic de la syphilis d'après la législation et la pratique en France (recommandations HAS 2007).*
TT : tests tréponémiques classiques (TPHA, TPPA, FTA-ABS) et ELISA (IgG ou IgG/M) ; TNT : tests non tréponémiques (VDRL, RPR) ; WB : *Western-blot*.
* Pas de titrage du TT si dépistage en ELISA.** ELISA si dépistage avec un TT classique ; TT classique si dépistage en ELISA.
*** Option possible en cas de suspicion de syphilis précoce.

patients traités correctement, les IgM diminuent rapidement et disparaissent en quelques mois. La présence d'IgM signe une syphilis active.

### Intérêts de la recherche d'IgM

La principale indication est la syphilis congénitale. Chez le nouveau-né, des IgM positives affirment une syphilis congénitale avant l'apparition des IgG de l'enfant.

La recherche d'IgM est aussi intéressante en cas de réinfection, de neurosyphilis ou devant la notion de contage récent avec IgG négatives.

Chez le patient traité, la persistance d'IgM fait craindre un échec thérapeutique ou une recontamination et indique la nécessité d'un nouveau traitement.

### Méthodes de recherche des IgM spécifiques

#### *FTA-Abs IgM*

Les IgM sont recherchées par une réaction d'immunofluorescence indirecte absorbée, avec comme révélateur un conjugué monospécifique antichaîne μ.

Ce test présente les mêmes inconvénients que le FTA-Abs. Il existe de fausses réactions positives dues au facteur rhumatoïde et aux anticorps antinucléaires. Des faux négatifs dus à l'inhibition compétitive par les IgG sont possibles dans les syphilis secondaires. La lecture de la fluorescence est délicate.

#### *19S FTA Abs-IgM*

Le principe est le même que le FTA-Abs IgM, mais le sérum est initialement fractionné par ultracentrifugation pour retenir les anticorps de classe M, ce qui permet d'obtenir une meilleure spécificité. Cependant, la réalisation technique est lourde et la quantité de sérum nécessaire importante.

#### *SPHA (solid phase hemadsorption assay) ou IgM-SPHA*

La recherche des IgM est réalisé grâce à une réaction d'immunocapture puis d'hémagglutination. Une globuline humaine anti-IgM fixée sur un support solide (cupule de microplaque) permet la capture des IgM du sérum du patient. Les IgM spécifiques anti-*T. pallidum* sont ensuite révélées par des hématies sensibilisées (réactifs du TPHA).

Cette réaction est d'une grande sensibilité mais de réalisation et de lecture délicate.

#### *ELISA et Western-blot IgM*

Les méthodes ELISA pour rechercher les IgM par immunocapture sont simples, sensibles et spécifiques. Les fausses négativités IgM liées à la compétition des IgG sont supprimées ainsi que les fausses positivités liées aux anticorps antinucléaires. Seuls les facteurs rhumatoïdes peuvent interférer dans de rares cas.

Le *Western-blot* IgM semblerait de grande valeur pour le diagnostic des syphilis congénitales.

## Interprétation des sérologies

### *Cinétique des anticorps dans la syphilis non traitée*

La cinétique d'apparition des anticorps est la suivante :

- FTA-IgM ou ELISA IgM (+) : 25 à 30 jours après la contamination ;
- puis positivité du FTA-IgG ou ELISA ;
- puis positivité du VDRL ;
- puis positivité du TPHA ou TPPA (30 à 40 jours après contamination) ;
- enfin, positivité du test de Nelson : 50 à 60 jours après la contamination.

La cinétique est schématisée à la figure 37.4.2.

Le titre des anticorps augmente ensuite jusqu'à un titre élevé (≥ 1280 à 2560 en TPHA) en phase secondaire (après 6 à 18 mois d'évolution).

Il existe une diminution des anticorps en phase de latence (1 à 2 ans après la contamination), avec présence d'un VDRL douteux ou faiblement positif tandis que les réactions tréponémiques restent positives.

On observera ensuite une réascension des anticorps à un taux variable en phase tertiaire mais le VDRL reste négatif dans 50 % des cas.

### *Cinétique des anticorps dans la syphilis traitée*

La cinétique est schématisée à la figure 37.4.3.

- Si le traitement est instauré au début du chancre, les anticorps peuvent rester négatifs.

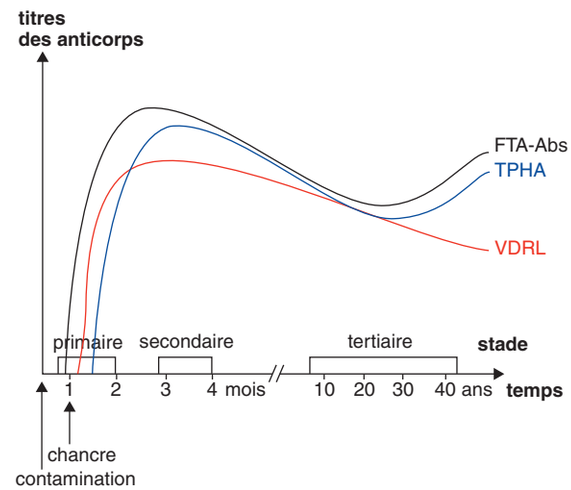



**Fig. 37.4.2.** – *Cinétique des anticorps dans la syphilis non traitée.*

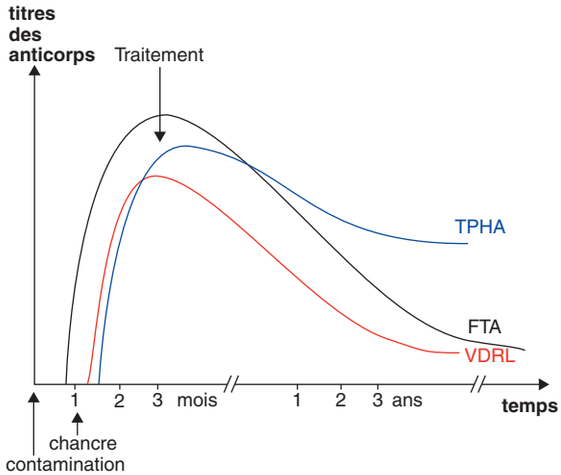



**Fig. 37.4.3.** – *Cinétique des anticorps dans la syphilis traitée.*

- Si le traitement a lieu au stade de syphilis primaire, on observe une chute rapide des anticorps et leur disparition en 3 à 6 mois.
- En cas de traitement plus tardif, on note une chute des IgM et du VDRL, mais il persistera très longtemps une cicatrice sérologique en TPHA, ELISA et FTA.
- En cas de traitement au stade tertiaire symptomatique, les réactions sont peu ou pas influencées par le traitement.

## *Profils sérologiques en fonction du stade de la maladie* (tableau 37.4.3)

### Syphilis primaire

Le FTA et l'ELISA IgM sont les techniques les plus sensibles à ce stade (tableau 37.4.4). Le VDRL est plus sensible que le TPHA mais il est moins spécifique. Il peut exister des différences de sensibilité entre les réactifs TPHA commercialisés.

### Syphilis secondaire

Tous les tests sérologiques, tréponémiques et non tréponémiques sont nettement positifs.

### Syphilis latente

La syphilis latente est définie non par des signes cliniques mais par la notion de syphilis acquise dans un délai inférieur à 1 an (en Grande-Bretagne) ou à 2 ans (aux États-Unis) pour la syphilis latente précoce, et supérieur à 1 ou 2 ans pour la syphilis latente tardive.

**TABLEAU 37-4-3**

**Interprétation des tests sérologiques de la syphilis.**

| *Résultats des tests sanguins ou sériques* | | | *Affection la plus probable* |
|---|---|---|---|
| *Test non tréponémique : RPR/VDRL* | *Test tréponémique : TPHA/ELISA* | *Test tréponémique : FTA-Abs* | |
| | | + | Syphilis primaire si données cliniques compatibles |
| + (titre variable) | + | + | Syphilis infectieuse (primaire, secondaire, latente précoce)<br>OU<br>Suivi de syphilis traitée<br>OU<br>Personnes provenant de régions endémiques : pian (par exemple Caraïbes), pinta (par exemple Amérique Centrale) ou bejel |
| – | + | + | Syphilis traitée<br>OU<br>Syphilis latente tardive de durée inconnue<br>OU<br>Personnes provenant de régions endémiques : pian, pinta ou bejel<br>OU<br>Infection très précoce (syphilis primaire débutante) |
| + | – | – | Faux positif biologique* (répéter 3 à 4 semaines plus tard) |

* Voir tableau 37.4.1.

TABLEAU 37-4-4

**Différents profils sérologiques observés au stade primaire.**

| VDRL | TPHA/ELISA | FTA | Conclusion |
|---|---|---|---|
| – | – | – | Stade très précoce |
| + | + | + | Profil typique d'infection |
| ± | – | + | Profil rare, le TPHA/ELISA se positive rapidement ensuite. Utilité de renouveler les tests. Contexte clinique à ce stade évocateur (chancre, rapport sexuel récent avec une personne ayant fait une syphilis) |
| – | + | + | Réinfection au stade précoce avec antécédent de syphilis traitée. Le patient a déjà des taux d'anticorps résiduels, reflet de sa syphilis antérieure |

Au stade de syphilis latente précoce, la positivité des tests (TPHA, ELISA, FTA-Abs, VDRL) rend le diagnostic aisé. Au stade de syphilis latente tardive, les résultats des sérologies peuvent être très variables en fonction de l'ancienneté du contage. La différenciation entre une syphilis latente tardive et une cicatrice sérologique repose alors essentiellement sur l'interrogatoire.

### Syphilis tertiaire

La syphilis tertiaire est devenue rare dans les pays industrialisés.

Lors d'une neurosyphilis, les anticorps sont détectés par toutes les méthodes TPHA, FTA-Abs, ELISA, Nelson, VDRL dans le sérum. De façon exceptionnelle, les anticorps lipidiques (VDRL) peuvent avoir disparu.

## Diagnostic d'une neurosyphilis

C'est un diagnostic difficile qui repose biologiquement sur des arguments non spécifiques (hypercellularité du LCR, hyperprotéinorachie) et sur la démonstration de la production d'anticorps spécifiques dans le LCR.

La positivité du VDRL dans le LCR est très spécifique mais peu sensible. Un VDRL positif dans le LCR indique presque toujours une atteinte du système nerveux central, mais un VDRL négatif n'exclut pas une neurosyphilis.

Un FTA-Abs, ELISA ou TPHA positif dans le LCR est un test très sensible mais non spécifique de la neurosyphilis. Un test négatif dans le LCR permet d'exclure un diagnostic de neurosyphilis.

La mise en évidence d'IgM antitréponémiques dans le LCR (IgM SPHA, FTA-Abs IgM, ELISA IgM) est en faveur d'une neurosyphilis mais peut aussi ne résulter que d'un transfert passif. Il faut donc déterminer un index (TPHA ou TPA ou index IgG) pour prouver la production locale d'anticorps spécifiques.

Le diagnostic de neurosyphilis est en général posé sur l'association de résultats sérologiques positifs, d'anomalies de la numération cellulaire et/ou de la protéinorachie et de manifestations cliniques. Une recherche par PCR peut être réalisée ; sa valeur est variable selon la littérature.

La surveillance biologique d'une neurosyphilis traitée repose sur les tests sérologiques et la vérification du LCR tous les 3 mois jusqu'à normalisation.

## Diagnostic d'une syphilis congénitale

Il existe un risque de transmission maternofœtale au cours de la syphilis, d'où l'intérêt du dépistage systématique chez la femme enceinte. L'examen sérologique prénatal avant le 3e mois de grossesse n'est plus obligatoire en France alors que les tréponèmes peuvent passer la barrière placentaire entre le 4e et le 9e mois.

L'interprétation des sérologies syphilis chez la femme enceinte peut être compliquée par la présence de réactions faussement positives liées à la grossesse ; elles sont dans ce cas souvent de faible intensité et dissociées. La recherche d'IgM chez la femme enceinte permet de faire la différence entre une syphilis évolutive et une syphilis ancienne guérie. Dans le doute, il ne faut pas hésiter à traiter la patiente et il convient d'instaurer un suivi sérologique de la mère et de l'enfant.

L'interprétation de la présence d'anticorps chez le nouveau-né doit être faite en prenant en considération les antécédents de la mère, y compris le stade de la syphilis, les antécédents thérapeutiques et les résultats des tests sérologiques de la syphilis. Il faut tester des échantillons veineux de la mère et du bébé (tests tréponémiques et non tréponémiques) et tenir compte du passage passif des IgG maternelles. Le diagnostic repose donc sur :

- des IgM positives (peu sensible) ;
- un titre du VDRL chez le bébé 4 fois supérieur à celui de la mère ;
- une ascension du taux d'anticorps sur deux sérums successifs chez le bébé.

Les tests semblant le plus intéressants pour le diagnostic de syphilis congénitale sont le FTA-Abs 19S IgM, l'ELISA IgM, le *Western-blot* et la PCR sur le sang du cordon ou le liquide amniotique.

Des prélèvements de placenta, de cordon ou de lésions cutanées du nouveau-né peuvent être observés en microscopie sur fond noir pour déceler *T. pallidum* (mais ils sont peu sensibles).

Les anticorps transmis passivement par la mère disparaissent en 3 à 6 mois chez un enfant non infecté.

Chez un enfant infecté et traité, les anticorps tréponémiques peuvent persister plus longtemps et seule une diminution significative du titre du VDRL permet de vérifier l'efficacité du traitement.

### Syphilis et VIH

Comme la syphilis est une maladie ulcérative sexuellement transmissible, les patients avec une syphilis ont un risque accru d'acquérir ou de transmettre le VIH. Tous les patients chez qui l'on diagnostique une syphilis doivent être testés pour le VIH et ceux suivis pour le VIH doivent avoir un dépistage régulier de la syphilis.

La réponse sérologique syphilitique n'est généralement pas modifiée par l'infection VIH. Il a été rapporté cependant des séronégativités des tests tréponémiques ou des réponses anormalement faibles ou retardées chez des patients ayant une syphilis secondaire. On a également décrit des fausses positivités dans les tests non tréponémiques et une négativation plus rapide du VDRL sous traitement.

Du fait de la possibilité d'évolution vers une neurosyphilis malgré un traitement adapté, certains auteurs préconisent l'analyse systématique du LCR chez les sujets infectés par le VIH et présentant une syphilis primo-secondaire ainsi qu'un traitement plus long avec des doses plus élevées. Cette attitude ne fait actuellement pas l'unanimité.

### Problèmes d'interprétation

Lorsque les trois principaux tests, VDRL, TPHA/ELISA et FTA, sont positifs à des taux élevés dans un contexte clinique évocateur, l'interprétation est simple.

En revanche, en l'absence de signes cliniques, l'interprétation de certains profils peut être délicate.

Les sérologies sont dissociées (VDRL négatif, TPHA/ELISA douteux ou faiblement positif, FTA négatif ou douteux) : profil en faveur d'une tréponématose ancienne guérie (anticorps résiduels). Il peut aussi s'agir d'une réaction non spécifique (tableau 37.4.2). On peut vérifier la spécificité des anticorps par un *Western-blot*.

Un dernier cas reste possible : une syphilis latente tardive à VDRL négatif (décrite dans les publications) et dont le diagnostic est improbable, à moins que l'interrogatoire ne retrouve la notion de syphilis acquise, et des sérologies antérieures positives diminuant dans le temps en l'absence de tout traitement antibiotique.

Si les trois marqueurs sont positifs à des taux limites de seuil, c'est un profil en faveur d'une tréponématose ancienne traitée (anticorps résiduels) ou d'une syphilis évolutive. En cas de traitement, il faut pouvoir comparer à des sérologies antérieures pour observer une diminution du titre des anticorps par le VDRL.

Des « faux positifs » peuvent exister en VDRL surtout (anticardiolipides), mais aussi en TPHA et FTA (tableau 37.4.2). En général, les taux sont fables et les sérologies dissociées.

Il existe également de « faux négatifs » en FTA. Chez les patients séropositifs pour le VIH, on peut observer une négativation totale du TPHA après traitement qui ne se retrouve pas chez les patients immunocompétents.

Il faut se méfier d'un VDRL rendu négatif alors que le TPHA est très élevé : il peut s'agir d'un phénomène de zone en présence d'un excès d'anticorps. Il suffit de diluer le sérum pour voir apparaître une réaction positive.

## Traitement

Le traitement de la syphilis repose essentiellement sur des données cliniques.

L'antibiotique de choix est la pénicilline par voie parentérale exclusivement pour obtenir des taux sériques suffisamment importants. L'antibiothérapie est efficace à tous les stades de la syphilis, mais uniquement sur la multiplication de *T. pallidum* et non sur les complications cardiovasculaires ou neurologiques liées au pouvoir pathogène du tréponème.

Si la syphilis est traitée au moment de l'apparition du chancre, la guérison sera rapide et les sérologies se négativeront rapidement.

Au stade secondaire, après injection de pénicilline, la contagiosité est supprimée en quelques heures, les signes cliniques disparaissent et la guérison sera totale et définitive. Il faut donner des doses croissantes progressives de pénicilline.

Il n'a pas été signalé, à ce jour, de résistances du tréponème à la pénicilline.

D'autres antibiotiques ont été évalués : doxycycline, ceftriaxone, érythromycine et azithromycine. L'érythromycine est active mais ne pénètre pas dans le LCR ou la barrière placentaire. Un essai clinique randomisé important suggère qu'une dose unique d'azithromycine est aussi efficace que la pénicilline dans le traitement des syphilis précoces. Cependant, des échecs sont décrits, dus à la résistance intrinsèque de certaines souches de *T. pallidum* aux macrolides.

Quelques études démontrent l'efficacité de la ceftriaxone avec différents schémas.

Il existe de nombreux protocoles thérapeutiques dont deux émanant d'instances internationales : l'OMS et le CDC d'Atlanta. Ils sont résumés dans le tableau 37.4.5.

Les patients doivent être prévenus d'une possible réaction de Jarisch-Herxheimer qui cause un rash cutané dans les 24 premières heures du traitement. Chez les patients avec une atteinte cardiovasculaire, neurologique ou ophtalmique ainsi que pendant la grossesse, cette réaction peut engendrer de graves complications. L'adjonction de corticoïdes 24 heures avant de débuter le traitement antibiotique est recommandée.

## Conclusion

La syphilis est une maladie pour laquelle la confrontation clinicobiologique est indispensable. Sa recrudescence a traduit un relâchement de la prévention et rappelle de ne pas hésiter à demander une sérologie dans des circonstances variées. Lorsque les signes cliniques sont absents, l'interrogatoire doit permettre de retrouver la notion de

TABLEAU 37-4-5

**Traitement de la syphilis (recommandations du CDC).**

| *Stade* | *Traitement* |
|---|---|
| **Syphilis précoce** | |
| Syphilis primaire<br>Syphilis secondaire<br>Syphilis latente précoce | Injection unique de 2,4 x$10^6$ U de benzathine pénicilline G (Extencilline®)<br>En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 100 mg × 2/24 h 14 jours ou azithromycine 1 g per os ou ceftriaxone 500 mg IM 10 jours |
| **Syphilis tardive** | |
| Syphilis latente tardive | 3 injections IM de 2,4 × $10^6$ U de benzathine pénicilline G (Extencilline®) à 8 jours d'intervalle<br>En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 200 mg × 2/24 h 28 jours |
| Syphilis tertiaire | – Atteinte cutanée et cardiovasculaire : pénicilline 600 000 U par jour pendant 15 à 20 jours (prévention de la réaction d'Herxheimer +++)<br>– Neurosyphilis : 3 à 4 × $10^6$ U de pénicilline G toutes les 4 h pendant 10 à 14 jours ou injection IM de pénicilline 2,4 × $10^6$ U + probénécide 500 mg × 4 par jour pendant la même durée<br>– En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 200 mg × 2/24 h 28 jours ou ceftriaxone 2 g IM ou IV 10 à 14 jours |
| **Syphilis et VIH** | **Stade précoce :** idem que chez les sujets non infectés par le VIH<br>Neurosyphilis : idem ci-dessus |
| **Syphilis congénitale** | |
| Femme enceinte | 2,4 × $10^6$ U de benzathine pénicilline G (Extencilline®) en IM et répéter la dose une semaine plus tard<br>Une 3e dose une semaine plus tard est conseillée en cas de syphilis tardive |
| Enfant | Pénicilline G 50 000 UI/kg par IV en une cure en l'absence de symptômes<br>150 000 UI/kg/j pendant 10 à 14 jours en cas de symptômes |

syphilis acquise dans le passé, de sérologie antérieure (négative ou positive), de prise d'antibiotiques. Sans ces informations, les tests sérologiques seuls ne permettent pas toujours le diagnostic. En cas de doute, il ne faudra pas hésiter à traiter. Dans la grande majorité des cas, le traitement est simple et consensuel.

Des études à partir de séries de patients bien documentées devraient permettre de mieux définir la place du *Western-blot* et de la biologie moléculaire dans la stratégie diagnostique.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Andre J, Alacoque B. Tréponèmes pathogènes pour l'homme. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2004 Section IX, chapter 4.

Basse-Guerineau AL, Assous MV. Les sérologies d'interprétation délicate. Rev Prat 2004 ; 54 : 387–91.

Basse-Guerineau AL, Assous MV. Diagnostic bactériologique de la syphilis. BEH 2001 ; 35–36 : 172–5.

Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM, Lukehart SA. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 1348–52.

Couturier E, Dupin N, Janier M, et al. Résurgence de la syphilis en France, 2000-2001. BEH 2001 ; 35–36 : 168–9.

Egglestone SI, Turner AJL. Serological diagnosis of syphilis. Commun Dis Public Health 2000 ; 3 : 158–62.

French P. Syphilis. BMJ 2007 ; 334 : 143–7.

Gayet-Ageron A, Ninel B, Toulous-Trellu L, Lansenschlager S, Furrer H, Piguet V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. Sex Transm Infect 2009 ; 85 (4) : 264–9 Epub 2009 Jan 20.

Ghanem K. Neurosyphilis : a historical perspective and review. CNS Neuro Therap 2010 ; 16 : e157–68.

Grivois JP, Caumes E. Neurosyphilis : quand faut-il y penser ? Rev Prat 2004 ; 54 : 396–9 Revue.

Hagedorn HJ, Kraminer-Hagedorn A, De Bosschere K, Hulstaert F, Pottel H, Zrein M. Evaluation of INNO-LIA Syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 973–8.

HAS. Évaluation a priori du dépistage de la syphilis en France mai. 2007.

Herremans T, Kortbeek L, Notermans DW. A review of diagnostic tests for congenital syphilis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010 ; 29 : 495–501.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Heymans R, Van der Helm JJ, De Vries HJC, Fennema HSA, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol 2010 ; 48 : 497–550.

Janier M. Syphilis : aspects cliniques, biologiques et therapeutiques. Rev Prat 2004 ; 54 : 376–82.

Janier M, Chastang C, Spindler E, et al. A prospective study of the influence of HIV status on the seroconversion of serological tests for syphilis. Dermatology 1999 ; 198 : 362–9.

Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev 1995 ; 8 : 1–21.

Lee V, Kinghorn G. Syphilis : an update. Clin Med 2008 ; 8 : 330–3.

Luger AF, Schmidt BL, Kaulich M. Significance of laboratory findings for diagnosis of neurosyphilis. Int J STD AIDS 2000 ; 11 : 224–34.

Mandelbrot L, Marcollet A. Syphilis et grossesse. Rev Prat 2004 ; 54 : 392–5.

Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. Sex Transm Dis 2003 ; 80 : 411–4.

Peeling RW, Htun Y. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis : an overview. Bull World Health Org 2004 ; 82 : 439–46.

Riedner G, Rusizoka M, Todd J, et al. Single dose azithromycin versus penicillin G benzathine for the treatment of early syphilis. N Engl J Med 2005 ; 353 : 1236–44.

Schmidt BL. Evaluation of a new particle gel immunoassay for determination of antibodies against *Treponema pallidum*. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 2833–5.

Schmidt BL, Edjlali M, Luger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 1279–82.

Sena AC, White BL, Sparling PF. Novel *Treponema pallidum* serologic tests : a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. Clin Infect Dis 2010 ; 51 : 700–8.

Young H. Guidelines for serological testing for syphilis. Sex Transm Infect 2000 ; 76 : 403–5.

Zeltser R, Kurban AK. Syphilis. Clin Dermatol 2004 ; 22 : 461–8.

Zhou P, Gu Z, Xu J, Wang X, Liao K. A study evaluating ceftriaxone as a treatment agent for primary and secondary syphilis in pregnancy. Sex Transm Dis 2005 ; 32 : 495–8.

CHAPITRE

# 38 Mycobactéries

C. Martin, F. Denis

## Généralités

Les mycobactéries sont des micro-organismes responsables de maladies chez l'homme et chez les animaux. En bactériologie, on distingue classiquement les mycobactéries tuberculeuses responsables de la tuberculose des mycobactéries non tuberculeuses, agents de mycobactérioses survenant le plus souvent sur des terrains fragilisés (sujets mucoviscidosiques) ou immunodéprimés (sujets greffés, sida).

Le diagnostic de tuberculose ou de mycobactériose est un diagnostic clinique, radiologique et bactériologique. La distinction entre ces deux entités ne peut être réalisée qu'au laboratoire.

Le genre *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae* dans l'ordre des actinomycétales auquel appartiennent de nombreux genres (tableau 38.1). Les mycobactéries se présentent comme des bacilles aérobies ou microaérophiles, immobiles, non ramifiés et non sporulés présentant une propriété tinctoriale essentielle : l'acido-alcoolo-résistance (BAAR) due à la richesse en lipides de leur paroi. Les contraintes techniques d'études des mycobactéries dues à une croissance lente, une structure pariétale complexe ont longtemps retardé l'acquisition des connaissances concernant le genre *Mycobacterium* par rapport à d'autres genres d'intérêt médical. Dans les années 1990, le développement de méthodes de culture rapide en milieu liquide ont permis une diminution des délais d'obtention des souches et des antibiogrammes. Au même moment, l'avènement des techniques de biologie moléculaire d'amplification génique et le séquençage automatisé ont permis de connaître la séquence complète du génome de *M. leprae*, de *M. tuberculosis* H37Rv puis de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Ces données ont été à l'origine de l'avancée des connaissances phylogénétiques, structurales (enzymes des voies de synthèse des composés pariétaux) et métaboliques, et ont eu des retombées dans le domaine diagnostique et clinique, permettant la mise au point de techniques d'identification, de détection et des méthodes d'épidémiologie moléculaire, la découverte de nouveaux mécanismes de résistance aux antituberculeux, le criblage de nouveaux agents antimycobactériens. Ces avancées ont rendu possible une réponse au clinicien plus rapide et plus précise à chaque étape technique du diagnostic (examen direct, culture, identification, antibiogramme) lors de l'exploration d'une tuberculose maladie.

La génomique comparative des différentes espèces des mycobactéries de la tuberculose a permis la mise au point de méthodes d'exploration in vitro de l'infection tuberculeuse latente (ITL). L'ITL est un état consécutif à la colonisation d'un sujet par le bacille de la tuberculose. Le diagnostic de cette phase asymptomatique reposait jusqu'en 2005 uniquement sur l'étude de l'hypersensibilité cutanée à la tuberculine après injection intradermique (intradermoréaction [IDR]). Cette méthode qui met en évidence une réaction locale est utilisée avant vaccination (sauf chez le nouveau-né) et dans le cadre d'enquêtes autour d'un cas de tuberculose. Elle présente de nombreux inconvénients tels que les réactions croisées avec le BCG, la difficulté de réalisation et de lecture. Des tests appelés IGRA (Interferon γ Release Assay) mesurant la réponse d'hypersensibilité retardée sont des tests sanguins in vitro mesurant la production d'interféron γ par des cellules mononucléées du sang périphérique après stimulation par des antigènes spécifiques des mycobactéries du complexe *tuberculosis*, mais absents chez les souches vaccinales de BCG.

Il est classique d'opposer les mycobactéries tuberculeuses responsables de la tuberculose aux mycobactéries non tuberculeuses (MNT) responsables de mycobactérioses. Nous verrons dans ce chapitre que les étapes initiales du diagnostic sont identiques et que seules les épreuves d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques diffèrent. Parmi ces nouvelles approches, la détection directe du génome bactérien à partir des prélèvements n'a pas montré sa supériorité par rapport à la culture par manque de sensibilité. Les techniques bactériologiques mises en œuvre pour l'étude des mycobactéries sont spécifiques, ce qui oblige chaque laboratoire ayant un secteur de mycobactériologie à s'équiper (hottes aspirantes de type PSM1, étuves pour conservation longue, milieux spécifiques) et à adopter une organisation particulière dictée par les impératifs techniques (ensemencements, lectures, délais longs). La prévention du risque biologique dans les laboratoires de biologie médicale a été renforcée (arrêté du 16 juillet 2007 publié au *Journal Officiel de la République Française* le 4 août 2007). Le texte précise les conditions de manipulation des prélèvements susceptibles de contenir des agents infectieux et la manipulation de souches en fonction du niveau de risque, de la classe de l'agent et des conditions d'exposition. Ce texte concerne notamment les mycobactéries de la tuberculose qui appartiennent à la classe 3 et doivent être manipulées dans une zone de confinement de type 3 (NSB3 : niveau de sécurité biologique de niveau 3).

Le laboratoire de mycobactériologie est également un des pivots de la surveillance de la tuberculose, d'autant plus qu'il a depuis 2002 également la charge de déclarer les nouveaux cas de tuberculose aux autorités sanitaires.

TABLEAU 38-1

**Genres appartenant à l'ordre des Actinomycétales.**

| *Actinomycètes aérobies* | *Actinomycètes aéro-anaérobies* | *Actinomycètes anaérobies* |
|---|---|---|
| *Actinomadura* | *Arachnia* | *Actinomyces* |
| *Streptomyces* | *Arcanobacterium* | *Bifidobacterium* |
| *Arthrobacter* | *Cellulomonas* | *Eubacterium* |
| *Brevibacterium* | *Corynebacterium* | *Mobilincus* |
| *Microbacterium* | *Gardnerella* | |
| *Nocardia** | *Oerskovia* | |
| *Rhodococcus** | *Propionibacterium* | |
| *Tsukamurella** | *Rothia* | |
| *Mycobacterium** | *Turicella* | |

* Acido-alcoolo-résistance partielle ou totale.

Une collaboration étroite est nécessaire entre le biologiste et le clinicien afin de tout mettre en œuvre pour permettre la guérison du patient et de s'assurer de la mise en place des mesures nécessaires à la non-transmission à l'entourage.

## Habitat et pouvoir pathogène

Par leurs aspects cliniques et épidémiologiques, les infections dues à des mycobactéries sont divisées en trois grandes entités : la lèpre (*M. leprae*), la tuberculose dont les agents étiologiques sont les bacilles tuberculeux (*Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum*), et les mycobactérioses provoquées par les mycobactéries commensales dites « atypiques » (*M. avium, M. abscessus, M. chelonae, M. intracellulare, M. kansasii, M. marinum, M. szulgai, M. ulcerans, M. xenopi*, etc.).

Actuellement, plus de 140 espèces de mycobactéries ont été décrites. En fonction de leur vitesse de croissance, les mycobactéries sont séparées en deux groupes (mycobactéries à croissance lente et mycobactéries à croissance rapide). La présence d'une seule copie du gène codant l'ARN ribosomique 16S (croissance lente) ou de deux copies (croissance rapide) est corrélée à la vitesse de croissance. La croissance et le métabolisme lents des mycobactéries concourent certainement à leur capacité de s'adapter aux conditions environnementales (tableau 38.2). La répartition du caractère pathogène pour l'homme des espèces à l'intérieur de chacun des groupes n'est pas homogène. C'est parmi le groupe des mycobactéries à croissance rapide que l'on retrouve les espèces considérées comme non pathogènes, excepté *M. abscessus, M. chelonae* et *M. fortuitum*. Cette observation contraste avec l'analyse du groupe de mycobactérie à croissance lente où sont réunies les espèces pathogènes obligatoires (mycobactéries de la tuberculose, *M. leprae*) ou potentiellement pathogènes (*M. avium, M. intracellulare, M. kansasii, M. malmoense, M. marinum, M. ulcerans, M. scrofulaceum, M. szulgai, M. xenopi*). Excepté pour *M. marinum* et *M. ulcerans* (phylogénétiquement proches des mycobactéries de la tuberculose), les autres espèces sont des pathogènes opportunistes qui provoquent des infections chez des patients présentant une immunodépression (cancer, VIH, greffe, corticothérapie, etc.). Cependant, leur isolement à partir de prélèvements polybactériens (pulmonaires le plus souvent) doit conduire le biologiste à confronter ces données aux éléments cliniques et radiologiques pour retenir l'implication dans le processus pathologique de la mycobactérie isolée et faire la différence entre simple colonisation et infection. Des recommandations édictées par l'American Thoracic Society (ATS) en 1997 puis réactualisées en 2007 préconisent l'association d'au moins un critère clinique ou radiologique à un critère microbiologique. Les critères cliniques sont définis par la présence de symptômes pulmonaires ou la présence d'anomalies à la radiographie ou au scanner (nodules, micronodules, cavernes, infiltrats, opacités), toutes autres étiologies ayant été éliminées. Les critères bactériologiques correspondent à l'isolement de la mycobactérie à partir de deux expectorations recueillies indépendamment, à partir d'un liquide bronchoalvéolaire (LBA), ou encore d'expectorations ou d'un LBA associé à une analyse histologique compatible (granulome).

L'éventail des niches écologiques est varié et certaines espèces sont isolées uniquement à partir de l'environnement tandis que d'autres ont une spécificité limitée à un hôte unique (*M. leprae*). Seul un nombre restreint d'espèces n'a pas été isolé de l'environnement, dont les mycobactéries de la tuberculose et le bacille de la lèpre qui n'a jamais été cultivé sur milieu inerte. Les niches écologiques pour une espèce donnée ne sont pas toujours bien connues. Les MNT à croissance rapide (groupe IV de la classification de Runyon) sont principalement isolées du sol, de l'eau et, à une fréquence moindre, des végétaux ou des sphaignes. Les MNT à croissance lente potentiellement pathogènes sont également présentes dans le sol, l'eau douce ou de mer, sur les poussières et, moins fréquemment, sur les végétaux. Certaines mycobactéries sont des pathogènes pour une ou plusieurs espèces animales domestiques (*M. bovis* chez les bovins et caprins ; *M. avium* subsp. *paratuberculosis* chez les bovins ou encore *M. avium* subsp. *avium* chez les oiseaux ou les rongeurs). Enfin, *M. ulcerans* (responsable de l'ulcère de Buruli : pathologie déclarée émergeante par l'OMS), dont le biotope est hydrotellurique, a un cycle de transmission complexe où des mollusques herbivores et des insectes

**TABLEAU 38-2**

**Supports fondamentaux des particularités du diagnostic au laboratoire des infections à mycobactéries.**

| *Données fondamentales* | *Propriétés* | *Étapes concernées* |
|---|---|---|
| Nombre de copies ADNr 16S | | |
| 1 seule copie | Croissance lente | Culture sur milieux riches (Löwenstein-Jensen) et durée d'incubation longue |
| 2 copies | Croissance rapide | Culture sur milieux ordinaires et durée d'incubation courte |
| Séquences d'insertion répétées | Différenciation *intraspecies* | Épidémiologie moléculaire |
| Métabolisme lipidique (données génétiques et chromatographiques) | Affinité tinctoriale<br>Hydrophobicité<br>– Résistance aux agents chimiques<br>– Résistance aux antibiotiques hydrophiles | Examen direct (Auramine, Ziehl-Neelsen)<br>Décontamination (soude)<br>Familles d'antibiotiques actives (isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide) |
| Gènes du métabolisme aérobie et anaérobie | Adaptation à la tension en oxygène | Incubation en aérobiose |
| Antigènes polysaccharidiques, protéiques et glycolipidiques | Antigénicité | Possibilité de sérologie mais nombreuses réactions croisées |

sont impliqués respectivement comme hôtes intermédiaires et vecteurs (piqûre). La répartition géographique est très variée et dépend de l'espèce considérée ; certaines, fréquemment isolées dans un pays ou une région, peuvent être rares ou absentes dans une autre zone. La présence des MNT dans l'eau douce et de mer et leur persistance dans les réseaux d'eau potable (présence dans les biofilms, capacité de survivre chez les amibes) impliquent l'utilisation d'eau stérile lors du prélèvement et à chaque étape du diagnostic au laboratoire. La transmission des mycobactéries se produit lors d'ingestion, par aérosolisation ou lors d'effraction cutanée. La capacité de survivre dans les cellules, de former des biofilms avec les matières organiques et d'être aérosolisé avec des hydrates de carbone est conférée par l'hydrophobicité due à la très grande richesse en lipide de la paroi (tableau 38.2). Cette propriété confère également une résistance naturelle :

- aux désinfectants (ammonium quaternaires, dérivés oxydants, dérivés chlorés, glutaraldéhyde) pouvant être à l'origine de contaminations transmises par fibroscope ;
- aux agents chimiques (bases, acides, détergents), permettant leur utilisation pour éliminer la majorité des bactéries commensales beaucoup plus sensibles à ces produits avant la mise en culture des produits pathologiques ;
- à certains antibiotiques hydrophiles.

Les propriétés physiologiques particulières du bacille tuberculeux (croissance lente avec un temps de division de 20 heures, caractère aérobie) et les propriétés structurales déjà énoncées vont nécessiter la mise en œuvre d'une méthodologie particulière détaillée dans ce chapitre.

Les particularités cliniques et histologiques de la tuberculose découlent de l'équilibre existant entre les facteurs de virulence du bacille de la tuberculose (paroi riche en lipides, enzymes protectrices du stress oxydatif) et les moyens de défense mis en jeu par l'hôte (coopération cellulaire) qui entraîneront la formation du granulome et la nécrose tissulaire (fig. 38.1). La tuberculose est une maladie chronique contagieuse transmise par voie aérienne affectant principalement le système respiratoire. Le patient tuberculeux est le réservoir de bactéries et émet un aérosol de bacilles lors de la toux, et il infectera ainsi les sujets qui auront été à son contact proche. Les particules qui véhiculent les bacilles tuberculeux, une fois inhalées, vont parvenir au niveau de l'alvéole pulmonaire où elles vont être phagocytées par un macrophage. Selon les individus et le terrain, les bacilles vont soit être tués (majorité des cas), soit survivre et se multiplier à l'intérieur des macrophages. Après cette primo-infection qui associe une lésion pulmonaire à une adénopathie satellite, l'hôte réagit à cette primo-infection en initiant une réponse immunitaire innée immédiate et une immunité cellulaire spécifique adaptative en 4 à 6 semaines. Pour la plupart des personnes, l'infection s'arrête à ce stade. Si la mise en place de l'immunité adaptive est trop longue, une dissémination dans l'organisme des macrophages infectés par voie sanguine et lymphatique va provoquer le développement de lésions secondaires pulmonaires (nodules, tuberculomes et cavernes) ou extrapulmonaires (ganglionnaires, ostéoarticulaires [mal de Pott], rénales, péricardiques, péritonites, méningites, organes hématopoïétiques). Au niveau de ces localisations, l'infection peut être contrôlée par la réaction immunitaire ou évoluer si celle-ci n'est pas mise en place ou si les défenses immunitaires sont amoindries. Par ailleurs, une réinfection d'un patient, souvent chez un sujet âgé, peut survenir et la cinétique des événements physiopathologiques se trouve accélérée. Les mécanismes de la réaction immunitaire mise en jeu lors de l'infection tuberculeuse sont

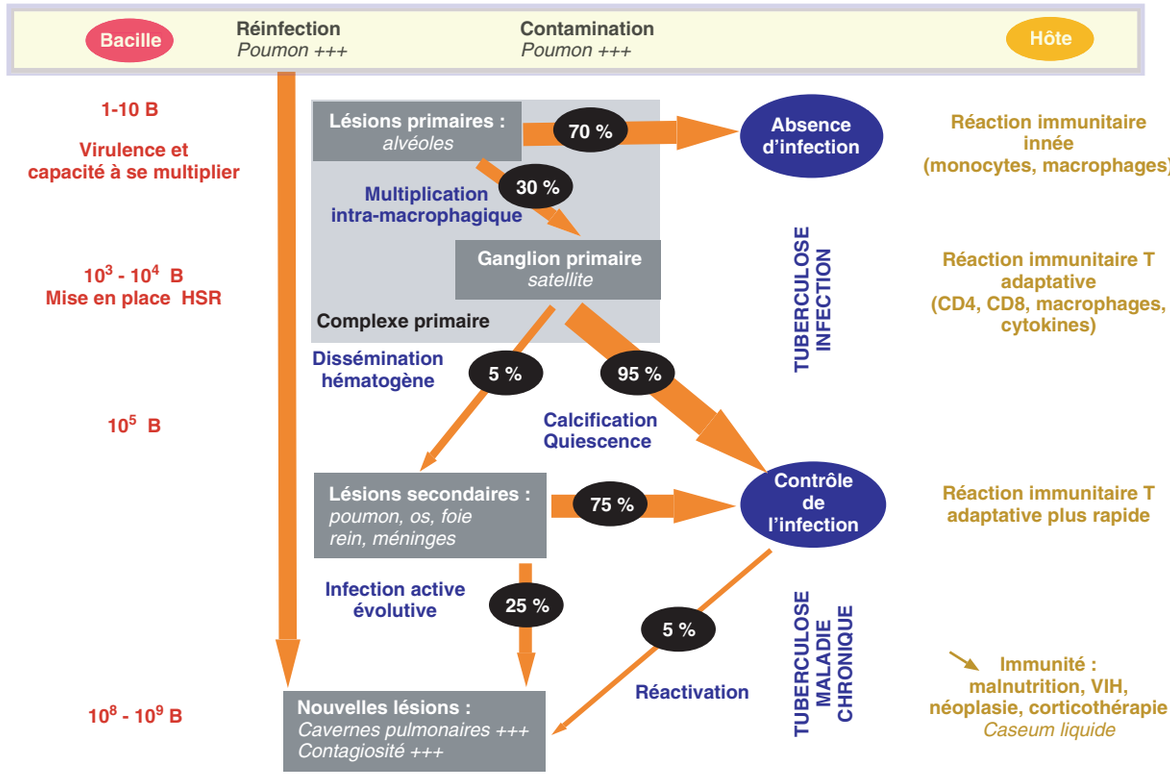



Fig. 38.1. – *Équilibre physiopathologique lors de la tuberculose.*

complexes et ne sont pas tous connus. Parmi les mécanismes bien identifiés, on peut citer :

- l'inhibition de la fusion phagolysosomiale avec intervention d'une protéine spécifique présente à la surface du phagosome (TACO) ;
- l'activation des macrophages par la production d'interféron γ et la prolifération clonale des lymphocytes par l'interleukine 2 produite par les lymphocytes CD4 et CD8 ;
- une augmentation de l'activité métabolique, de la production de TNFα et la production de composés oxygénés toxiques par les macrophages activés.

## Démarche diagnostique

La confirmation bactériologique du diagnostic de la tuberculose ou de mycobactériose doit, dans tous les cas, être recherchée. Le diagnostic bactériologique comprend obligatoirement un examen direct et une culture. L'isolement de la souche donnera lieu à une identification et systématiquement à une étude de la sensibilité aux antituberculeux majeurs pour les mycobactéries de la tuberculose. Parmi les techniques de détection (amplification génomique) et de diagnostic rapide (antigènes solubles urinaires, anticorps) récemment développées, seule la détection après amplification présente actuellement un intérêt, essentiellement dans le cas où la présence de BAAR a été observée à l'examen direct. En effet, la distinction entre mycobactérie tuberculeuse et non tuberculeuse est très importante pour le clinicien afin de prendre la décision d'isoler le patient, si celle-ci n'a pas déjà été prise, et d'instaurer un traitement antituberculeux spécifique. La détermination de la sensibilité aux antibiotiques est différente selon le résultat de cette étape. Les différentes étapes du diagnostic des mycobactéries sont présentées à la figure 38.2.

Par rapport aux méthodes usuelles de la bactériologie, les particularités du diagnostic des infections à mycobactéries sont liées à leur temps de croissance long et à la nécessité de concentrer et d'éliminer les bactéries commensales des prélèvements (décontamination). Ces particularités induisent respectivement des résultats de culture différés et un travail technique conséquent de préparation des échantillons pour réaliser examen microscopique et mise en culture.

## Règles de sécurité et législation

La prévention du risque biologique dans les laboratoires de biologie médicale (arrêté du 16 juillet 2007 publié au *Journal Officiel de la République Française* le 4 août 2007) concernant les prélèvements susceptibles de contenir des agents infectieux et la manipulation délibérée de souches est fondée sur le niveau de risque en fonction de la classe de l'agent. Les mycobactéries de la tuberculose,

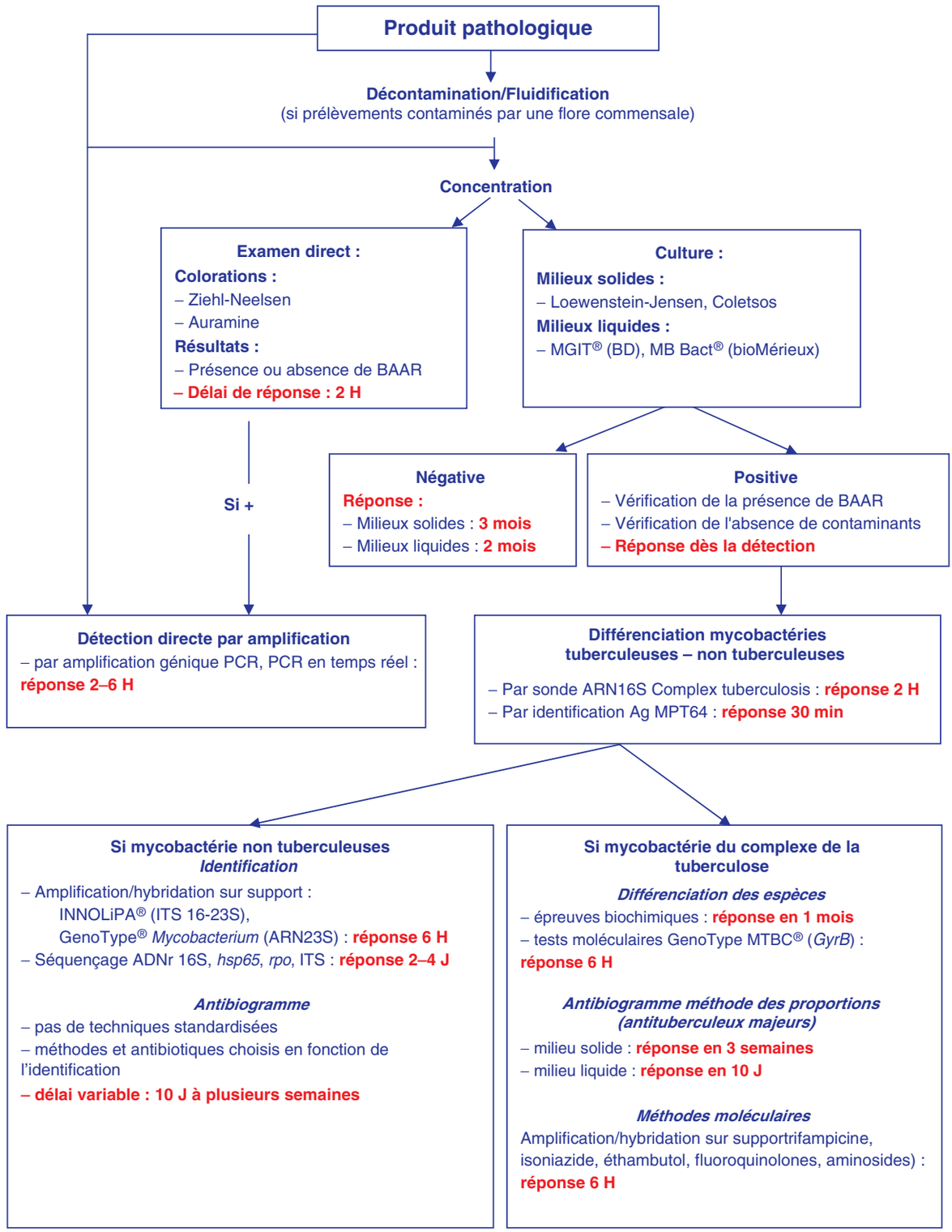



**Fig. 38.2.** – *Principales étapes du diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries.*

mais aussi *Salmonella* Typhi, *Brucella*, etc., appartiennent à la classe 3 et doivent être manipulées dans une zone de confinement de type 3 (NSB3).

Des règles de sécurité strictes doivent donc être observées lors du traitement des échantillons cliniques, de la manipulation des cultures pour réaliser l'identification et l'antibiogramme : utilisation de récipients fermant hermétiquement, observation des règles d'acheminement pour les substances infectieuses, manipulation des prélèvements sous des postes de sécurité microbiologique (PSM), utilisation de centrifugeuses munies de capot de sécurité pour éviter la propagation d'aérosol.

Les examens directs et les mises en culture pourraient être réalisés dans une zone NSB2 afin de transmettre les résultats des examens directs rapidement et d'éviter une transmission aérienne au personnel soignant et à l'entourage des patients. Seule la manipulation de culture positive de mycobactéries de la tuberculose en vue de la réalisation d'un antibiogramme par exemple serait à réaliser impérativement en zone NSB3.

## Prélèvements

Tous les organes peuvent être le siège d'une infection à mycobactéries. Pour la majorité des prélèvements destinés à la recherche de mycobactéries, les techniques de prélèvement ne sont pas différentes des autres recherches. Le biologiste pourra également réorienter le prélèvement en vue de la recherche de mycobactéries en fonction des résultats négatifs de la bactériologie standard et du contexte clinique. La majorité des prélèvements (85 %) a une origine bronchopulmonaire (expectorations, tubages, aspirations bronchiques). Les autres prélèvements sont essentiellement des prélèvements d'urines, des produits de ponction (liquides céphalorachidiens [LCR], liquides pleuraux, abcès, ganglions) et des biopsies.

L'émission bacillaire étant intermittente, les prélèvements bronchopulmonaires (expectorations et tubages gastriques) et urinaires doivent être répétés si possible 3 jours de suite et traités séparément. Les prélèvements initiaux sont réalisés chez des sujets sans antibiothérapie antituberculeuse. Les prélèvements respiratoires (expectorations, tubages gastriques, LBA) sont recueillis dans du matériel stérile, de préférence des tubes à centrifuger à vis de 50 ml fermant de manière hermétique pour éviter tout risque de contamination. Les prélèvements extrapulmonaires sont recueillis dans des pots stériles. La conservation des prélèvements à 4 °C en vue d'un examen différé de 72 heures permet, en limitant la prolifération des bactéries commensales, un examen fiable (examen direct et culture).

### Prélèvements respiratoires

Les prélèvements doivent permettre l'obtention de sécrétions respiratoires profondes et éviter les prélèvements salivaires. Les expectorations spontanées sont recueillies après un effort de toux le matin au lever. Si le sujet ne tousse pas, les expectorations sont provoquées par inhalation d'un aérosol de sérum physiologique ou après kinésithérapie.

Les tubages gastriques permettent le recueil des sécrétions bronchiques dégluties au cours de la nuit et sont réalisés au lit du malade chez un sujet alité depuis la veille et à jeun (annexe 38.1). Les aspirations bronchiques, les brossages et les liquides de lavages alvéolaires recueillis lors d'une fibroscopie sont aussi contributifs dans le diagnostic de tuberculose. Suite à ces examens endoscopiques, les tubages se révèlent souvent positifs.

Deux techniques récemment rapportées permettent de palier les difficultés rencontrer pour obtenir des expectorations chez les bébés et les enfants et chez les adultes qui ne crachent pas. La première technique repose sur l'inhalation d'un vasoconstricteur (salbutamol, 200 µg) suivie d'une nébulisation d'eau salée (5 ml) et d'oxygène (5 l/min) pendant 15 minutes. Une percussion thoracique suivie d'une aspiration douce des sécrétions nasopharyngées sont réalisées. La seconde utilise un dispositif constitué d'une capsule de gélatine reliée à une ficelle. Après ingestion de la capsule, une stimulation de la sécrétion bronchique par une solution de NaCl à 20 % est réalisée pendant 90 minutes. La capsule est ensuite déglutie et recueillie à l'aide de la ficelle, puis soumise aux étapes classiques du diagnostic de laboratoire.

### Urines

Après restriction hydrique la veille du prélèvement, 50 ml des urines du matin sont prélevés dans un pot stérile. En pra-

**ANNEXE 38.1**

**Réalisation du tubage gastrique pour recherche de mycobactéries**

**Matériel**
- Sonde à usage unique après repère de distance cardia et pylore par rapport aux arcades dentaires
- Seringue de 20 ml
- Demi-verre d'eau
- Flacons à prélèvements

**Malade**
- Assis, tête légèrement en arrière
- Coopératif et prévenu des désagréments : toux, nausée (plus il déglutira, moins l'épreuve sera pénible)

**Réalisation pratique**
- Amener la sonde en arrière de la langue sans toucher la cavité buccale
- Faire progresser la sonde au rythme des efforts de déglutition jusqu'au repère cardia
- Monter la seringue et aspirer en descendant la sonde jusqu'au repère pylore
- Si aucun liquide n'est aspiré, injecter 5 à 10 ml d'eau, mobiliser la sonde dans l'estomac et réaspirer
- Retirer la sonde et vider l'ensemble sonde–seringue dans un flacon. Si la quantité est faible, chasser le liquide présent dans la sonde avec 2 à 3 ml d'eau

tique, en l'absence de fortes présomptions de tuberculose rénale, seules les urines présentant une pyurie aseptique (leucocyturie supérieure à 10 000/ml) seront ensemencées.

### Sang

La recherche de mycobactéries dans le sang est pratiquée à partir d'une ponction veineuse, le sang étant recueilli dans un tube contenant un anticoagulant liquide (SPS, citrate, héparine). Elle peut également être réalisée sur les flacons des systèmes de lecture automatisée (Myco/F-Lytic®, Becton Dickinson ; MB Blood®, bioMérieux) VersaTREK® (Magellan biosciences, Biocentric) et sur le système de lyse-centrifugation Isolator® (Oxoid).

### LCR et liquides d'épanchements (ascites, pleuraux, articulaires)

Un volume de 3 ml est nécessaire à l'étude cytobactériologique de ces prélèvements. Dans les méningites tuberculeuses, la cytologie montrera une leucocytorachie modérée (100/mm$^3$) avec une prédominance de lymphocytes. L'étude biochimique menée parallèlement montrera une glycorachie et un taux de chlorure diminué ainsi qu'une protéinorachie légèrement augmentée (< 1 g/l).

### Ponctions d'abcès

Le prélèvement à la seringue doit être privilégié et la seringue adressée directement au laboratoire. Les prélèvements à l'écouvillon sont déposés dans un flacon stérile et humidifiés avec quelques gouttes d'eau distillée stérile ou d'eau physiologique stérile.

### Biopsies et pièces opératoires

Une bonne collaboration (transmission de résultats d'examen direct et de prélèvements) entre les laboratoires d'anatomie pathologique et de bactériologie permet de conforter et de rattraper certains diagnostics. Le prélèvement effectué stérilement est envoyé dans un flacon stérile contenant un petit volume d'eau stérile. Les prélèvements biopsiques envoyés dans un liquide fixateur (Boin, etc.) sont impropres à l'étude bactériologique. Si le laboratoire est situé à l'extérieur de la structure ayant effectué le prélèvement, celui-ci devra être transporté à 4 °C après avoir été conditionné selon les normes en vigueur.

## Décontamination, fluidification, concentration

En fonction du caractère polymicrobien ou monobactérien, les prélèvements vont faire l'objet ou non d'une décontamination. Cette étape a pour but d'éliminer la flore commensale des échantillons qui envahirait les milieux de culture avant la détection des mycobactéries qui sont des bactéries à croissance lente. Les mycobactéries sont plus résistantes à l'action des antiseptiques, des acides et des bases dilués que les bactéries commensales. Les liquides de ponction, les ponctions de collections fermées ou les biopsies prélevées stérilement sont ensemencées sans décontamination après centrifugation. Les autres prélèvements considérés comme polybactériens (tubages, expectorations, liquides d'aspiration bronchique, urines, abcès fistulisés, etc.) sont soumis à une méthode de fluidification–homogénéisation–décontamination.

La technique la plus fréquemment utilisée (fig. 38.3) associe l'action décontaminante d'une solution de soude à l'action mucolytique de la N-acétyl-L-cystéine en présence de citrate de sodium. Cette solution de décontamination est mise en présence d'une quantité égale de produit pathologique, puis il faut agiter à l'aide d'agitateur de type Kahn. La décontamination est arrêtée après 25 minutes de contact par neutralisation à l'aide d'un tampon phosphate (pH 6,8). Après 30 minutes de centrifugation à 3000 rpm, le culot est obtenu après élimination du surnageant. Une goutte du culot est déposée sur deux lames en vue de la coloration pour l'examen direct. Le culot est ensuite repris par 1 ml d'eau distillée stérile ou du tampon PBS pour la mise en culture sur milieux solides (Löwenstein, Coletsos), à raison de 0,2 ml déposé en haut de la pente ou de 0,5 ml dans les tubes ou flacons contenant les milieux liquides. Une fraction est conservée pour une recherche de génome par amplification génique

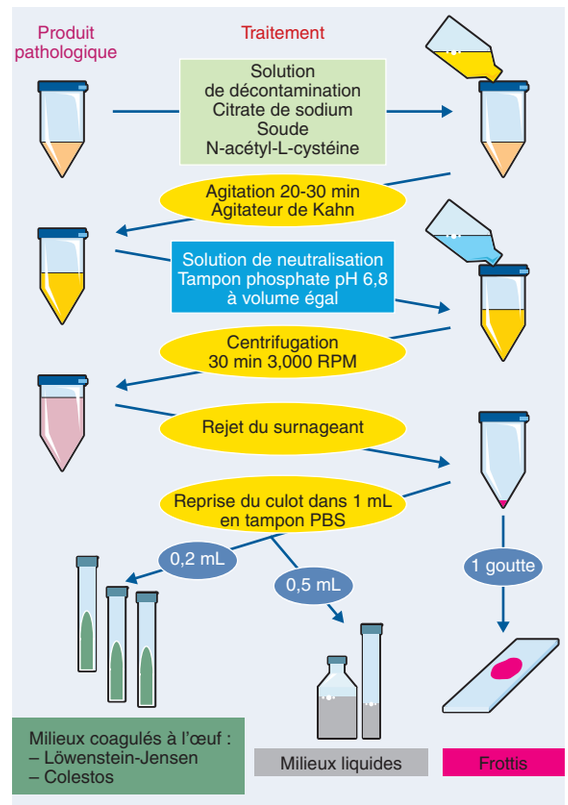



**Fig. 38.3.** – *Étapes de la décontamination d'un produit pathologique. Exemple de la méthode de Kubica.*

qui pourra être réalisée secondairement (examen direct positif, situations cliniques particulières).

Cette méthode est préconisée pour l'ensemencement des prélèvements en milieux liquides. Des réactifs destinés à réaliser cette étape sont commercialisés en coffrets afin de standardiser les procédures (MycoPrep®, Becton Dickinson ; MycoProSafe®, J2L Elitech).

D'autres méthodes moins fréquemment répandues, utilisant la soude à 4 % (méthode de Petroff), l'acide oxalique à 5 %, l'acide sulfurique à 4 % ou le chlorure de benzalkonium sont assez agressives. D'autres, plus douces, associant le lauryl-sulfate de sodium et la soude, sont utilisées dans des laboratoires ne réalisant pas de culture en milieu liquide (tableau 38.3 et annexe 38.2). La concentration et le temps d'action de l'agent décontaminant sont des paramètres essentiels à respecter strictement afin d'obtenir une élimination des contaminants sans altérer la viabilité des mycobactéries. Un taux de 2 à 5 % de cultures contaminées est admis. Un taux supérieur ou inférieur nécessite un ajustement de la méthode et plus particulièrement le temps de contact avec la soude.

## Examen microscopique

Les espèces du genre *Mycobacterium* sont difficilement colorées par la coloration de Gram. Le principe des colorations (Ziehl-Neelsen, auramine) des mycobactéries

**ANNEXE 38.2**

### Homogénéisation et décontamination

**Méthode de Petroff (modifiée)**

Réactifs

• Solution décontaminante stérile (soude à 4 %)
– Soude pure en pastilles : 10 g
– Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
– Stérilisation à l'autoclave
• Solution de neutralisation
– Acide sulfurique à 4 %
– Solution aqueuse de Bleu de tournesol

Technique

– Déposer le prélèvement dans un tube à centrifuger de 50 ml
– Ajouter un volume égal de solution de soude puis agiter
– Mettre le tube à l'étuve à 37 °C jusqu'à homogénéisation (20 à 30 minutes au plus)
– Neutraliser
– Centrifuger à 2000 g (3000 rpm) pendant 20 minutes
– Décanter le liquide surnageant
– Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2 à 3 gouttes du culot neutralisé

**Méthode au Lauryl-sulfate de sodium**

Réactifs

• Solution décontaminante
– Lauryl-sulfate de sodium pur : 30 g
– Soude pure en pastilles : 10 g
– Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
– Répartir par flacon de 30 ml et stériliser à l'autoclave
• Solution de neutralisation
– Pourpre de bromocrésol (1/250) : 2 ml
– Acide phosphorique pur : 1,5 ml
– Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
– Répartir par flacon de 30 ml et stériliser à l'autoclave

Technique

– Mettre le crachat dans un tube à centrifuger à vis de 50 ml
– Ajouter 3 ml de la solution décontaminante à 2 ml de produit pathologique
– Agiter une demi-heure sur agitateur de Kahn (30 minutes)
– Verser 30 ml de solution de neutralisation (jaune)
– Centrifuger à 2000 g (3000 rpm) pendant 20 minutes
– Décanter le liquide surnageant
– Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2 à 3 gouttes du culot neutralisé

**Méthode de Kubica à la N-acétylcystéine et à la soude**

Réactifs

• Solution décontaminante
– Citrate de sodium ($3H_2O$) : 2,94 g
– Eau distillée q.s.p. : 100 ml
– Soude pure en pastilles : 10 g
– Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
– Mélanger extemporanément 50 ml de chacune des solutions autoclavées et ajouter 0,5 g de N-acétyl-L-cystéine (NALC)
• Solution de neutralisation (tampon phosphate pH 6,8)
– Solution A
– Phosphate disodique : 9,47 g
– Eau distillée q.s.p. : 100 ml
– Solution B
– Phosphate monopotassique : 9,08 g
– Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
– Mélanger 50 ml de chacune des solutions puis autoclaver
– Solution stérile d'albumine bovine (fraction V : 0,2 %)

Technique

– Déposer le prélèvement dans un tube à centrifuger de 50 ml
– Ajouter un volume égal du réactif NALC-NaOH
– Agiter au vortex 30 secondes au maximum
– Agiter 20 à 30 minutes sur un agitateur de Kahn (20 à 25 °C)
– Remplir à le tube avec le tampon phosphate stérile
– Centrifuger 30 minutes à 3000 g
– Décanter le surnageant dans un récipient
– Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2 à 3 gouttes du culot neutralisé

La solution d'albumine bovine permet de resuspendre le culot. Cette pratique n'est pas recommandée pour ensemencer les flacons Bactec 12.

**TABLEAU 38-3**

**Caractéristiques des différentes méthodes de décontamination des échantillons en vue de la recherche de mycobactéries.**

| *Méthode* | *Agent décontaminant* | *Agent fluidifiant* | *Neutralisation* | *Cultures milieux liquides* | *Amplification* | *Remarques* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tacquet-Tison | Soude 1 %<br>Soude 2 % | Lauryl sulfate | Acide sulfurique | – | – | Activité bactériostatique de l'agent fluidifiant, biologie moléculaire non réalisable |
| Kubica | Soude 1 % | N-acétyl-cystéine 0,5 %<br>Citrate de sodium | Tampon phosphate | + | + | Recommandée si milieux liquides |
| Petroff | Acide oxalique | Soude 2 %<br><br>0 | Acide chlorhydrique<br>Tampon phosphate | +<br><br>+ | +<br><br>+ | Moindre sensibilité<br><br>Peut être associée à la méthode de Kubica |

repose sur la propriété d'acido-alcoolo-résistance. Les frottis sont effectués soit après centrifugation (30 minutes de centrifugation à 3000 rpm) pour les prélèvements non contaminés, soit à partir du culot de décontamination pour les autres prélèvements. Les lames utilisées pour la confection des frottis doivent être neuves et éventuellement dégraissées par un mélange acide sulfurique–alcool (90/10). Les solutions de coloration doivent être préparées avec de l'eau stérile (des mycobactéries sont parfois présentes dans l'eau du robinet). Pour les pièces opératoires, on peut également pratiquer des empreintes. Les frottis réalisés doivent être fins, pas trop étalés. Ils sont séchés sur plaque chauffante puis fixés avec de l'alcool méthylique pur.

Il existe deux groupes de technique de coloration (fig. 38.4). L'examen direct après coloration fuchsine

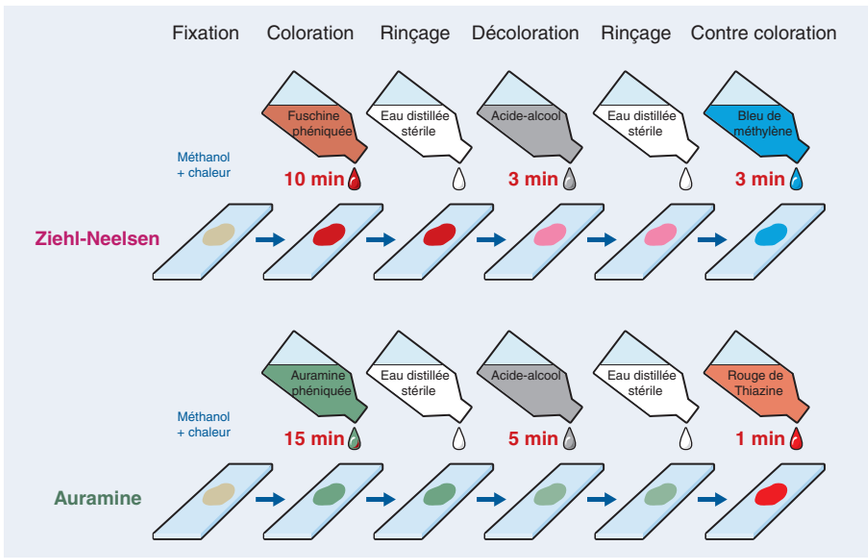



Fig. 38.4. – *Étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen et de la coloration à l'auramine.*

de Ziehl-Neelsen est utilisé pour des petites séries et la confirmation de frottis positif après coloration à l'auramine qui nécessite un microscope à fluorescence. Afin d'éviter la préparation des réactifs et pour mieux standardiser la méthode, de nombreux coffrets de réactifs prêts à l'emploi sont disponibles dans le commerce.

## Coloration de Ziehl-Neelsen

Le frottis est coloré par une solution alcoolique saturée de fuchsine basique phéniquée pendant 10 minutes. Après décoloration (3 minutes) avec un mélange acide–alcool (acide sulfurique à 25 % dans l'alcool à 90°), la lame est rincée à l'eau distillée stérile puis contre-colorée 3 minutes par une solution aqueuse de bleu de méthylène à 3 % (annexe 38.3). Les frottis sont ensuite rincés à l'eau distillée puis séchés à l'étuve. Une technique à chaud plus longue peut aussi être réalisée. L'observation est effectuée à l'objectif × 100 à l'immersion avec de l'huile minérale. Les mycobactéries colorées par la fuchsine phéniquée apparaissent en rouge vif sur le fond bleu de la préparation (débris cellulaires, mucus, bactéries commensales)

**ANNEXE 38.3**

### Méthodes de coloration – Examens microscopiques

**Méthode de Ziehl-Neelsen modifiée selon IUTC**

Réactifs
- Solution alcoolique saturée de fuchsine
  - Fuchsine basique : 0,3 g
  - Éthanol à 95° : 10 ml
- Solution aqueuse de phénol
  - Phénol (cristaux) : 5 g
  - Eau distillée : 90 ml
  - Faire fondre à 95 °C (bain-marie) puis ajouter l'eau
- Solution de travail
  - Mélanger les deux solutions (fuchsine et phénol)
- Solution de décoloration
  - Acide sulfurique à 25 % (v/v)
- Solution de contre-coloration
  - Bleu de méthylène hydrosoluble : 1 g
  - Alcool 95° : 10 ml
  - Phénol : 1 g
  - Eau distillée q.s.p. : 100 ml

Technique
- Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée
- Chauffer très doucement jusqu'à l'émission de vapeur
- Le colorant doit agir 10 minutes sans ébullition ni dessèchement
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis d'alcool 5 minutes
- Couvrir le frottis d'acide sulfurique à 25 % 3 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène, 2 minutes
- Rincer la lame à l'eau stérile et laisser sécher à l'air

**Coloration à froid (Kinyou modifiée)**

Réactifs
- Solution alcoolique saturée de Fuchsine
  - Fuchsine basique : 4 g
  - Méthanol : 20 ml
- Solution aqueuse de phénol
  - Phénol : 48 g
  - Eau distillée : 600 ml
- Solution de travail
  - Mélanger les deux solutions (fuchsine et phénol)
- Solution de décoloration
  - Acide chlorhydrique : 30 ml
  - Éthanol à 95° : 970 ml
- Solution de contre-coloration :
  - Bleu de méthylène hydrosoluble (ou chlorure) : 0,3 g
  - Eau distillée stérile q.s.p. : 100 ml

Technique
- Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée 10 minutes sans chauffer
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis du mélange acide-alcool pendant 3 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène 2 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air

**Méthode à l'auramine (méthode de Degommier)**

Réactifs
- Solution auramine
  - Auramine O : 1 g
  - Eau distillée : 500 ml
- Solution de phénol aqueux
  - Phénol (cristaux) : 1 kg
  - Eau distillée : 100 ml
  - Faire fondre à 95 °C (bain-marie) puis ajouter l'eau
  - Conserver à +4 °C
- Solution de travail
  - Chlorure de magnésium : 2 g
  - Phénol aqueux : 50 ml
  - Eau distillée stérile : 500 ml
  - Solution d'auramine : 500 ml
  - Mélanger puis filtrer (conserver à +4 °C)
- Solution de décoloration
  - Chlorure de sodium : 5 g
  - Éthanol à 95° : 1000 ml
  - Acide chlorhydrique : 5 ml
- -Solution de contre-coloration
  - Rouge de thiazine (solution aqueuse à 0,1 %) : 1 g
  - Phénol aqueux : 50 ml
  - Chlorure de magnésium : 2 g
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml

Technique
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir avec la solution d'auramine 20 minutes
- Rincer la lame à l'eau stérile
- Couvrir avec le mélange acide–alcool 3 minutes

• Rincer la lame à l'eau distillée stérile
• Couvrir avec la solution de rouge de thiazine, 1,30 minute
• Rincer la lame à l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air

**Méthode à l'auramine (méthode de Smithwick)**

Réactifs
• Solution auramine
– Auramine O : 0,1 g
– Éthanol 95° : 10 ml
• Solution de travail
– Phénol à 3 % : 30 g
– Eau distillée stérile : 500 ml
– Mélanger les deux solutions (auramine et phénol)
• Solution de décoloration
– Éthanol à 70° : 100 ml
– Acide chlorhydrique : 0,5 ml
• Solution de contre-coloration
– Rouge de thiazine : 0,1 g
– Phosphate disodique à 0,1 % : 100 ml

Technique
– Fixer la lame, laisser sécher
– Rincer la lame à l'eau distillée stérile
– Couvrir avec la solution d'auramine 5 minutes
– Rincer la lame à l'eau distillée stérile
– Couvrir avec le mélange acide–alcool 2 minutes
– Rincer la lame à l'eau distillée stérile
– Couvrir avec la solution de rouge de thiazine, 2 minutes
– Rincer la lame à l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air

(fig. 38.5A). *M. tuberculosis* apparaît sous forme de bacille long, parfois d'aspect granuleux se regroupant en torsades, ou en cordes si le frottis est réalisé à partir d'un milieu liquide (fig. 38.5B).

## Coloration à l'auramine

Le principe de la coloration est le même que pour la coloration de Ziehl-Neelsen : coloration des bacilles par une solution d'auramine O phéniquée à froid pendant 15 minutes. Après rinçage avec de l'eau distillée, une décoloration pendant 5 minutes par le mélange acide–alcool (acide chlorhydique–éthanol) est réalisée. Une contre-coloration avec une solution de rouge de thiazine (1 minute) est effectuée après un nouveau rinçage à l'eau distillée (annexe 38.3). Les lames séchées recouvertes d'une lamelle en verre sont observées à l'aide d'un microscope muni d'un dispositif à fluorescence à l'objectif × 25. Les mycobactéries apparaissent comme des bacilles fluorescents jaune-vert sur fond rouge (fig. 38.5C).

Un frottis est considéré comme négatif (absence

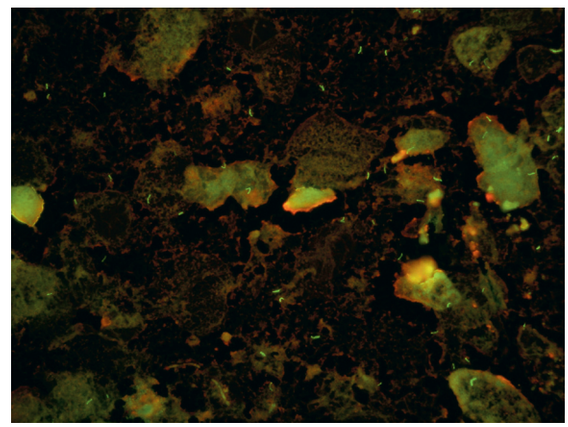


**Fig. 38.5A.** – *Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration après coloration à l'auramine (grossissement × 400). Présence de bacilles colorés en jaune fluorescent (BAAR).*

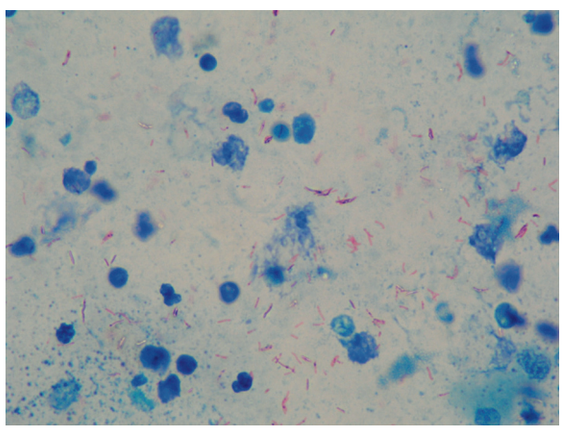


**Fig. 38.5B.** – *Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration après coloration de Ziehl-Neelsen (grossissement × 1000). Présence de bacilles colorés en rose (BAAR).*

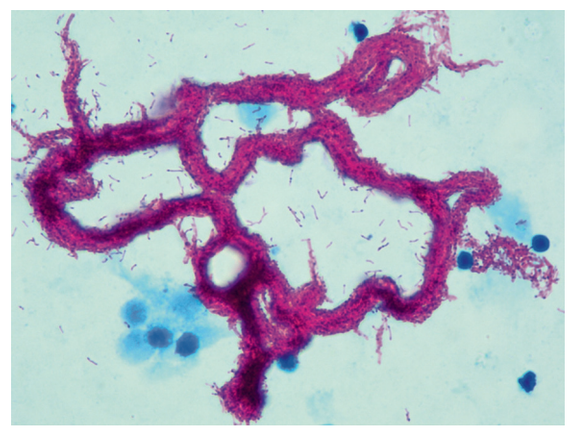


**Fig. 38.5C.** – *Examen direct après coloration de Ziehl-Neelsen (grossissement × 1000) d'une culture de mycobactéries de la tuberculose en milieu liquide. Présence de bacilles groupés en « cordes ».*

TABLEAU 38-4

**Microscopie semi-quantitative des examens directs.**

| *Nombre de bacilles observés* | | | *Réponse* |
|---|---|---|---|
| *Auramine (× 250)* | *Auramine (× 400)* | *Ziehl-Neelsen (× 1000)* | |
| Aucun | Aucun | Aucun | Absence de BAAR |
| 1 à 10 en 30 champs | 1 à 2 en 70 champs | 1 à 2 en 300 champs | Équivoque, à contrôler |
| 1 à 10 en 10 champs | 2 à 20 en 50 champs | 1 à 10 en 100 champs | Présence de BAAR (+) |
| 1 à 10 par champ | 4 à 40 en 10 champs | 1 à 10 en 10 champs | Présence de BAAR (++) |
| 10 à 100 par champ | 4 à 40 par champ | 1 à 10 par champ | Présence de BAAR (+++) |
| >100 par champ | >40 par champ | >10 par champ | Présence de BAAR (++++) |

d'éléments suspects) après au moins 15 minutes d'observation de la lame par la méthode de Ziehl-Neelsen (300 champs) et au moins 5 minutes par la méthode à l'auramine. La méthode à l'auramine permet d'éliminer rapidement les frottis négatifs et intéresse donc les laboratoires effectuant de grandes séries. Chaque frottis positif devra être contrôlé en recolorant la même lame ou une autre lame par la méthode de Ziehl-Neelsen. L'examen direct ne permettant pas de distinguer les espèces du genre *Mycobacterium*, la réponse signalera la présence ou l'absence de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) et exprimera en cas de positivité la densité bacillaire. Par exemple, les réponses seront du type : présence de 10 BAAR/champ, ou rapportées selon un système communément utilisé (tableau 38.4). Parfois, de très rares formes de BAAR de morphologie plus ou moins altérée peuvent être observées. Dans ces cas, il est prudent de confronter ces résultats aux résultats des examens directs des autres prélèvements de la série (contamination de laboratoire), et parfois d'attendre la positivité des cultures.

L'examen microscopique a une spécificité très élevée, voisine de 100 %. Des faux positifs peuvent être observés si les réactifs utilisés ont été préparés avec de l'eau du robinet (mycobactéries saprophytes), et avec des prélèvements contenant des *Nocardia* ou des bactéries apparentées. La sensibilité est relativement faible : le prélèvement doit contenir $10^5$ BAAR/ml pour que la probabilité de positivité de l'examen soit supérieure à 95 %. Pour les frottis présentant moins de 10 BAAR, il est recommandé de contrôler sur un autre prélèvement. Néanmoins, l'examen microscopique demeure une étape incontournable dans le diagnostic, particulièrement en cas de suspicion de tuberculose. La présence de BAAR à l'examen direct dans des prélèvements respiratoires indique que le patient est « bacillifère » et contagieux. Ce résultat doit être transmis au service clinique sans délai en vue de l'instauration d'un traitement antituberculeux et de la prise immédiate de mesures d'isolement si celles-ci n'ont pas été initiées. De même, l'absence de BAAR (après 3 semaines de traitement généralement) à l'examen direct de trois prélèvements consécutifs est nécessaire à la levée des mesures d'isolement du patient.

## Méthodes de culture

La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes en raison d'une croissance lente (quelques jours à plusieurs semaines) et de la nécessité d'apporter des lipides (tableau 38.2). Les milieux se présentent en tube ou flacon à vis afin de permettre une observation prolongée sans dessiccation et sans création d'aérosols. L'association d'un milieu liquide à des milieux solides est recommandée. Les mycobactéries nécessitent pour la plupart des milieux enrichis et des conditions strictes pour leur croissance (température comprise entre 30 et 45 °C, aérobiose et pH optimal situé à 6,7).

### Milieux solides

Le milieu le plus utilisé pour l'ensemencement des produits pathologiques est le milieu de Löwenstein-Jensen à base de sels minéraux, de fécule de pomme de terre, de glycérine, de vert malachite (antiseptique) et d'œuf (albumine). L'adjonction de certains composés comme le pyruvate de sodium dans le milieu de Coletsos ou le citrate de fer favorise la croissance respectivement de *M. bovis*, *M. africanum* et de *M. haemophilum*. Les milieux sont présentés sous forme de tubes fermés à vis ou par du coton et obturés par une capsule en plastique.

Trois gouttes du culot de centrifugation sont déposées au sommet de la pente gélosée. Deux (si couplés à des milieux liquides) à six tubes sont ensemencés et incubés à 37 °C exceptés pour les prélèvements d'origine cutanée et ostéoarticulaire, incubés à 30, 37 et 42 °C. Les tubes sont incubés inclinés et incomplètement vissés afin de permettre l'évaporation de l'excès de liquide de l'échantillon (48 heures). Les milieux sont observés une fois par semaine pendant au moins 8 semaines. L'observation des cultures durant la première semaine permettra de mettre en évidence une contamination par des bactéries commensales ou la présence d'une mycobactérie à croissance rapide. Dès l'apparition de colonies, un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen sera effectué pour vérifier la présence de BAAR avant de déclarer la culture positive.

Le nombre de colonies est rapporté ainsi que le délai d'apparition de la culture.

Sur milieu de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent après 2 à 3 semaines d'incubation (fig. 38.6A) en fonction de la densité microbienne de l'échantillon. Les colonies sont lisses et crèmes sur les cultures jeunes, puis atteignent plus de 5 mm de diamètre et deviennent beiges, rugueuses, à bords irréguliers en chou-fleur dites « eugoniques ». Les colonies de *M. bovis* et *M. africanum* ont une croissance plus lente : 3 à 6 semaines sur milieu Löwenstein. Les colonies de *M. bovis* apparaissent plates, petites (1 à 2 mm), lisses « dysgoniques », blanchâtres, brillantes, tandis que les colonies de *M. africanum* se présentent avec les caractéristiques suivantes : petites colonies rondes, mates, crèmes et granuleuses.

Les mycobactéries atypiques ont été classées par Runyon selon le délai d'apparition des colonies et leur pigmentation. Les deux espèces de mycobactéries du groupe I à croissance lente et à pigmentation photo-inductible les plus fréquemment rencontrées sont *M. marinum* (fig. 38.6C) et *M. kansasii*. À 30 °C, les colonies de *M. marinum* sont rondes, plus ou moins rugueuses, blanchâtres à l'obscurité et jaune orangé après exposition à la lumière. *M. kansasii* donne des cultures avec des colonies irrégulières, eugoniques et jaune citron après exposition à la lumière. Le groupe des mycobactéries scotochromogènes (groupe II) comprend des espèces saprophytes comme *M. gordonae*, ou pathogènes comme *M. szulgai* (fig. 38.6B). *M. avium* (mycobactéries du groupe III à croissance lente et non pigmentées) présente des colonies fines rondes bombées, lisses, brillantes, blanchâtres, crèmes sur les vieilles cultures. *M. xenopi* (fig. 38.6D), appartenant à ce même groupe, présente des colonies fines lisses qui deviennent jaunes sur les vieilles cultures. Parmi les mycobactéries appartenant au groupe IV des mycobactéries à croissance rapide (inférieure à 7 jours), l'espèce *M. chelonae* présente des colonies lisses non pigmentées (fig. 38.6E).

### Milieux gélosés semi-synthétiques

Des milieux semi-synthétiques transparents (Middlebrook 7H10 et 7H11) contiennent des sels minéraux, du pyruvate de sodium, de l'hydrolysat de caséine (7H11) et nécessitent l'adjonction extemporanée d'un supplément contenant acide oléique, dextrose albumine et catalase lors de leur préparation, et une incubation sous 5 % de $CO_2$. Ils demeurent cependant moins performants lors de la primoculture. Les colonies de *M. tuberculosis* sont plates, sèches et rugueuses. La croissance de *M. tuberculosis* est un peu plus précoce (milieu transparent), mais l'observation des colonies est plus difficile que sur les milieux à l'œuf et nécessite parfois une observation à la loupe binoculaire.

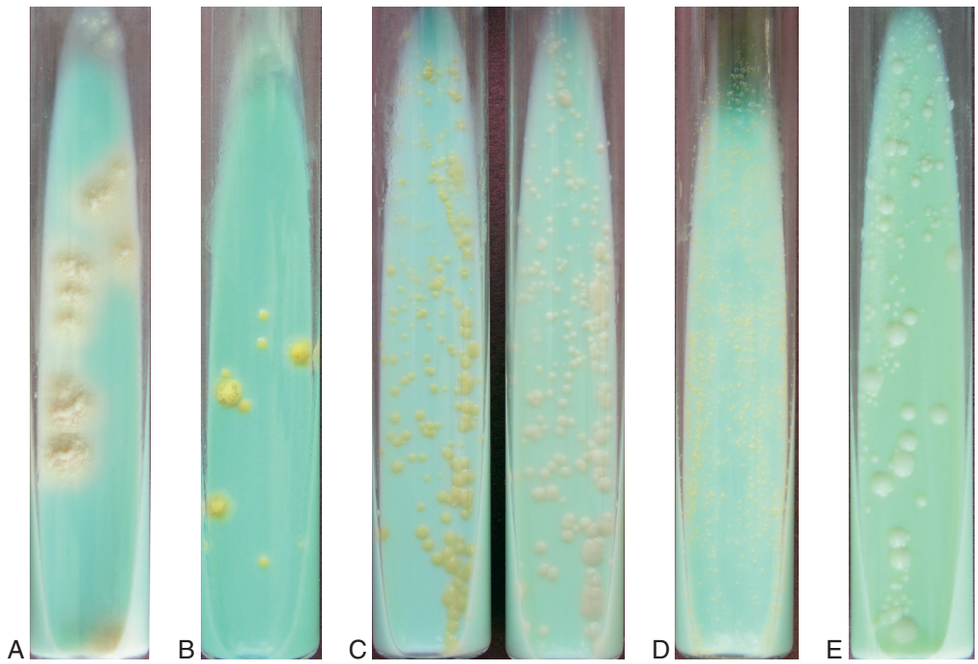



**Fig. 38.6.** – *Cultures sur milieu de Löwenstein-Jensen.*
A) – Colonies de *Mycobacterium tuberculosis.*
B) – Colonies de *Mycobacterium szulgai* (espèce scotochromogène).
C) – Colonies de *Mycobacterium marinum* (espèce photochromogène).
D) – Colonies de *Mycobacterium xenopi* (espèce non pigmentée à croissance lente).
E) – Colonies de *Mycobacterium chelonae* (espèce à croissance rapide).

### Milieux liquides

Les milieux liquides sont fabriqués pour la plupart avec la même base (7H9) et doivent être supplémentés avec des facteurs de croissance rendus sélectifs à l'aide d'un mélange d'antibiotiques (afin d'augmenter la spécificité de la culture). Certains de ces milieux peuvent être couplés à une détection automatique de la croissance (MGIT 960®, MB 9000®, BacT/Alert 3D®).

#### *Méthode MGIT*

À l'aide d'une pipette en plastique à usage unique, 0,5 ml de l'échantillon est inoculé dans un flacon, auquel 0,8 ml d'un mélange constitué par le supplément inhibiteur Panta (polymyxine B, azlocilline, acide nalidixique, triméthoprime et amphotéricine B) et du stéarate de polyoxyéthylène ont été préalablement ajoutés afin d'augmenter la spécificité de la culture. Le milieu MGIT (*Mycobacteria growth indicator tube*) est un milieu 7H9 supplémenté contenant un indicateur de fluorescence sensible à la concentration du milieu en $O_2$ composé. Une diminution de la concentration en $O_2$ génère, après excitation à 365 nm, une fluorescence visible à l'œil nu ou détectable à l'aide d'un automate (MGIT 960®, Becton Dickinson). L'inoculation des tubes ne nécessite pas l'utilisation d'aiguille.

#### *BacT/Alert 3D®*

La croissance dans les flacons BacT/Alert MP® (bioMérieux) est détectée à la base du flacon par un indicateur colorimétrique sensible à l'augmentation du pH (présence de $CO_2$) reconnu par l'automate (BacT/Alert 3D®). L'ensemencement des flacons, supplémentés par un mélange Pantav contenant de la vancomycine en plus des antibiotiques contenus dans le mélange Panta, nécessite le recours à une aiguille.

#### *VersaTREK®*

Le système VersaTREK® (Magellan biosciences, Biocentric) est fondé sur la surveillance de la diminution de pression intervenant dans le flacon de culture due à la consommation d'$O_2$ lors de la croissance bactérienne.

#### *MB Redox®*

Le milieu MB Redox® (Heipha Diagnostika/Biotest) est un milieu de Kirchner contenant un sel de tétrazolium incolore qui, pendant la croissance bactérienne, est réduit en formazan (rouge à violet) insoluble en milieu aqueux. Le formazan s'accumule à la surface sous forme de grains permettant de visualiser les microcolonies sous forme de particule colorée. Le virage coloré des particules est visible à l'œil nu. Ce milieu prêt à l'emploi ne nécessite pas l'adjonction d'un supplément antibiotique et vitaminique.

#### *Bio FM®*

Le milieu Bio FM® (Biorad) est un milieu liquide Middlebrook 7H9 enrichi en OADC contenant un substrat chromogène. Les cultures positives présentent une coloration bleue virant parfois au violet.

### Hémocultures

Des milieux pour hémocultures disponibles pour les systèmes automatisés de détection (Myco/F lytic®, BacT/Alert MB Blood®) contiennent de la saponine qui permet la lyse des cellules et du SPS comme anticoagulant.

L'existence de faux négatifs (examen direct positif et culture négative) est liée le plus souvent à l'instauration d'un traitement chez le patient (prélèvement de contrôle), mais peut aussi se présenter avec des prélèvements paucibacillaires. Un pourcentage plus élevé (15 %) de recouvrement de cultures positives et un délai de détection plus court avec les systèmes utilisant des milieux liquides par rapport aux milieux solides (12 jours en moyenne) sont observés. Toutefois, le recours en parallèle à un milieu solide demeure nécessaire pour accroître le taux d'isolement, pour détecter les cultures mixtes et pour obtenir une culture en cas de contamination du milieu liquide.

La confrontation du délai de positivité des cultures avec les résultats de l'examen direct permet de détecter les erreurs de lecture (examen direct négatif avec une culture positive abondante). Comme pour l'examen direct, il est prudent de confronter le résultat d'une culture aux résultats de la série (contamination de laboratoire).

## Identification

Les techniques de biologie moléculaire d'identification ont supplanté les méthodes biochimiques. Dans ce paragraphe, nous nous limiterons à la description des techniques moléculaires couramment utilisées dans les laboratoires de mycobactériologie, puis nous présenterons une synthèse des épreuves biochimiques d'identification de routine. L'utilisation des méthodes moléculaires a permis de s'affranchir, dans la plupart des cas, de l'étude longue et fastidieuse des caractères métaboliques. Les régions de l'ADN les plus fréquemment ciblées par ces techniques sont les gènes codant les ARN 16S, les séquences intergéniques 16–23S, ARNr 23S, *recA*, *gyrB*, *hsp65* et *rpoB*. Seuls certains tests phénotypiques (niacine, nitrate réductase) sont encore utilisés couramment.

### Stade initial : différenciation entre mycobactéries du complexe de la tuberculose et mycobactéries non tuberculeuses

Le premier stade de l'identification a pour but de différencier les mycobactéries de la tuberculose des autres

mycobactéries. Cette étape n'est réalisée qu'après contrôle microscopique de la présence de BAAR sur les milieux de culture. Deux techniques (hybridation en milieu liquide et immunochromatographie) sont actuellement disponibles. Une sonde monospécifique (*Mycobacterium tuberculosis* Complex, Accuprobe®) d'ADN complémentaire d'ARNr 16S marquée par un ester d'acridinium est mise en présence d'un lysat de culture préparé à partir de milieux solides ou liquides. Après hybridation avec l'ARN ribosomique et élimination des fragments de sonde non hybridés, la sonde hybridée est détectée par chimioluminescence à l'aide d'un luminomètre. Cette sonde présente de très bonnes sensibilité (100 %) et spécificité (proche de 100 %). Seules quelques rares souches de *M. terrae* et de *M. celatum* ont produit un signal de faible intensité proche du seuil de détection de 30 000 RLU (*relativ ligth unit*). L'avantage essentiel de cette méthode est l'utilisation unitaire ou en courte série et la rapidité de la réponse fournie aux cliniciens (2 heures). Un résultat positif permet de conforter le clinicien dans son choix thérapeutique ou d'instaurer un traitement antituberculeux.

Plus récemment, une technique immunochromatographique, reposant sur la mise en évidence de l'antigène MPT64, permet une identification des isolats du complexe *tuberculosis* en 15 minutes. Des résultats faussement négatifs avec des isolats de *M. bovis* BCG ont été rapportés avec cette technique.

Pour les mycobactéries atypiques, des informations peuvent être obtenues de l'observation de la primoculture des milieux solides : aspect, délai d'apparition et pigmentation des colonies, ces deux dernières caractéristiques étant à la base de la classification de Runyon (fig. 38.7).

## Différenciation des espèces du complexe de la tuberculose

La détermination des espèces à l'intérieur de ce complexe fait appel à des épreuves phénotypiques en première intention. Les souches à phénotype indéterminé nécessiteront alors l'utilisation de méthodes moléculaires (par détection du polymorphisme du gène *gyrB*, GenoType® MTBC, Hain Diagnostika) (fig. 38.7).

### *Réactions phénotypiques*

Le délai d'obtention des cultures et la morphologie des colonies associées à l'étude de quelques caractères biochimiques permettent de porter un diagnostic des mycobactéries tuberculeuses. Le diagnostic d'espèces précis des mycobactéries du complexe de la tuberculose est effectué en réalisant les épreuves suivantes :

- à partir d'une culture abondante sur milieu solide âgée de 4 semaines, recherche de la production de niacine (acide nicotinique) à l'aide de bandelette réactive (TB Niacin test strip®, BBL) ;

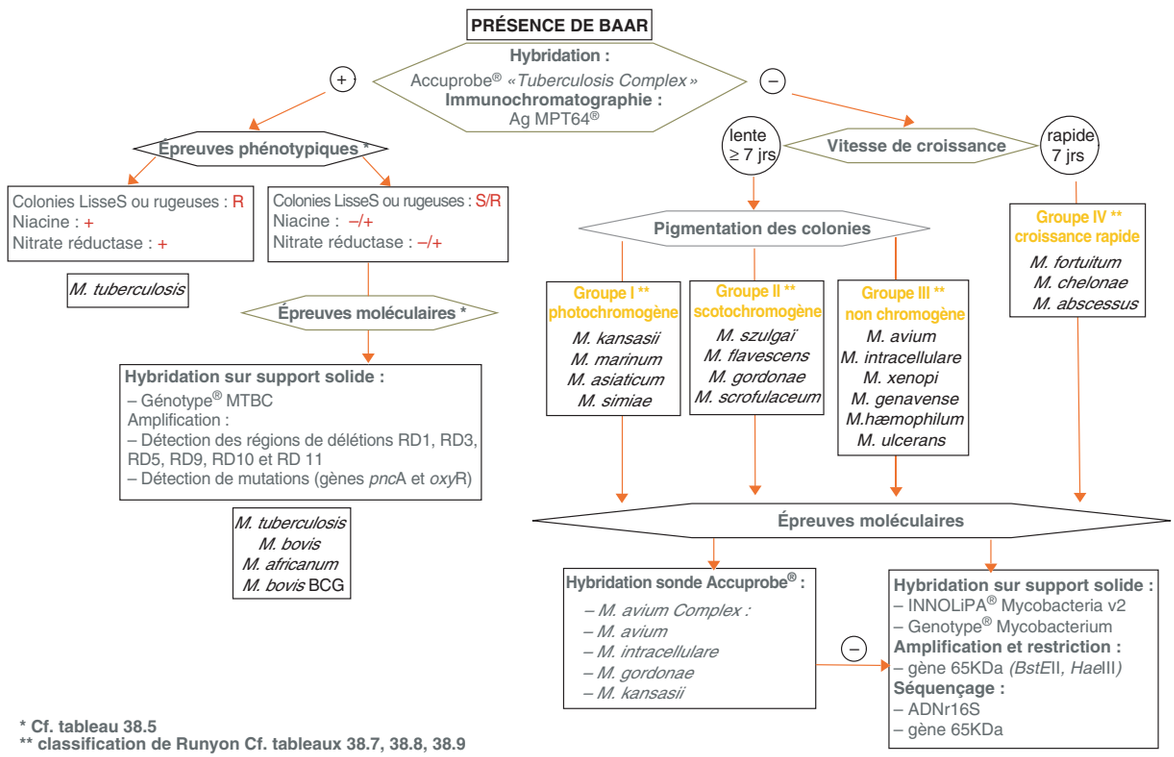



**Fig. 38.7.** – *Arbre décisionnel pour l'identification des mycobactéries au laboratoire.*

- recherche de la nitrate réductase ;
- croissance sur milieu Löwenstein-Jensen contenant du TCH (acide 2-thiophène carboxylique) (Biorad) à 2 mg/l ;
- croissance sur milieu Löwenstein-Jensen contenant 30 mg/ml de D-cyclosérine (bioMérieux) (tableau 38.5 et annexe 38.4).

### *Méthodes génotypiques*

La distinction entre *M. bovis* et les souches de BCG ainsi que l'identification de quelques variants de *M. tuberculosis* nécessitent parfois la détermination de caractères génotypiques (tableau 38.5). Ces tests reposent sur la mise en évidence de régions de délétions (RD1, RD4, RD9) et sur la détection de mutations des gènes *pnc*A et *oxy*R. Récemment, un coffret a été commercialisé (Hain Diagnostika/Biocentric), fondé sur la détection du polymorphisme du gène *gyrB* (GenoType® MTBC) par PCR multiplex. Trois amplicons marqués à la biotine sont ensuite hybridés avec des sondes spécifiques complémentaires fixées sur une bandelette. L'hybridation est révélée par le complexe streptavidine–phosphatase alcaline. Ce coffret permet d'identifier précisément en une seule étape les mycobactéries de la tuberculose, excepté *M. africanum* génotype I, indissociable de *M. tuberculosis*.

## Identification des mycobactéries atypiques

### Méthodes génotypiques

Les méthodes d'identification moléculaire sont réalisables à partir de cultures en milieux solides ou liquides. Le principe et les espèces identifiées par ces techniques commercialisées sont précisés dans le tableau 38.6. Ces techniques peuvent être classées en trois grands groupes selon leur spectre d'identification : les sondes monospécifiques ; les systèmes de détection après amplification et hybridation sur support solide identifiant 10 à 16 espèces ; et enfin les systèmes de détection universelle fondés sur le séquençage ou la restriction enzymatique. La stratégie d'utilisation de ces techniques doit tenir compte du coût, de l'épidémiologie (plus de 50 % des souches isolées dans un laboratoire sont des mycobactéries de la tuberculose), de critères d'orientation (pigmentation, vitesse de croissance). Les techniques universelles de séquençage permettant une approche sans a priori de l'espèce sont utilisées en seconde intention.

### Sondes commercialisées

Des sondes commercialisées (Accuprobe®, Gen-probe, bioMérieux), fondées sur le même principe que la sonde *Mycobacterium tuberculosis complex*, sont disponibles pour les mycobactéries du complexe aviaire (MAC), *M. avium, M. intracellulare*, *M. kansasii* et *M. gordonae*. La spécificité est bonne pour l'ensemble de ces sondes. En revanche, la sensibilité est variable ; 100 % pour *M. gordonae*, 95 % pour *M. avium* et *M. intracellulare*.

### Détection du polymorphisme de séquence de gènes à l'aide de coffrets commercialisés

D'autres méthodes moléculaires (hybridation sur support solide après amplification par PCR) permettent d'identifier une souche (GenoType Mycobacterium CM et AS®, Hain Diagnostika-Biocentric ; INNO-LiPA Mycobacteria®, Innogenetics) et sont disponibles (tableau 38.6) ; elles permettent d'identifier les espèces habituellement isolées en pratique médicale. Le kit INNO-LiPA Mycobacteria®v2 permet, à l'aide de 22 sondes spécifiques situées dans la région inter-16-23S, de distinguer 16 espèces, tandis que le coffret GenoType Mycobacterium CM® permet d'identifier 14 espèces à l'aide des 17 sondes positionnées au niveau de l'ADNr 23S. Des difficultés d'identification sont signalées pour des souches appartenant au complexe *avium-intracellulare* avec ces deux coffrets, témoignant de la nécessité d'une clarification taxonomique de ce groupe. Le coffret GenoType Mycobacterium AS®, commercialisé plus récemment, permet l'identification de 16 espèces.

### Polymorphisme de restriction du gène *hsp65*

Le gène *hsp65* code une protéine de choc thermique universelle. L'utilisation d'amorces spécifiques du genre *Mycobacterium* (Tb11 : 5'ACCAACGATGGTGTCTCC AT3' et Tb12 : 5'CTTGTCGAACCGCATACCCT3') permet l'amplification de 439 paires de bases. L'amplicon est digéré séparément par *Bst*EII et *Hae*III. La taille des fragments est déterminée après séparation par électrophorèse en gel d'agarose à 4 % à bas point de fusion (Resophor®, Eurobio). Les résultats de cette méthode appelé PRA (*PCR-restriction enzymatic analysis*) sont interprétés à l'aide d'un algorithme publié par Telenti. La prise en compte de la taille des fragments obtenus après digestion avec *Bst*EII puis de la taille de bandes obtenues après restriction par *Hae*III permet d'identifier une cinquantaine d'espèces de mycobactéries. La lecture est parfois difficile. Il est préférable de constituer sa propre banque de profils pour optimiser la lecture des gels.

### Séquençages des gènes *hsp65* et *ARN 16S*

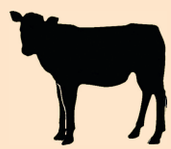
Le séquençage du gène *hsp65* constitue une alternative à la méthode de restriction et est réalisé à l'aide des mêmes amorces. Le séquençage de l'*ADNr 16S* permet d'identifier la majorité d'intérêt médical après comparaison de la séquence obtenue à des banques de données disponibles sur Internet (Blast, Ridom). Les positions 590–609 et 182–202 sont respectivement spécifiques de genre et d'espèce. Le séquençage d'autres gènes (*rpoB*, *its*) est possible, mais les banques de données concernant ces cibles sont incomplètes.

### *Réactions phénotypiques*

Les épreuves d'orientation reposent principalement sur l'étude de la morphologie des bacilles à l'examen direct et

**TABLEAU 38-5**

**Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des mycobactéries du complexe de la tuberculose.**

| Espèces / Caractères | *M. tuberculosis* | *M. africanum* | *M. bovis* | *M. caprae* | *M. pinnipedii* | *M. microtii* | *BCG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hôte | | |  | | | | |
| *Fréquence d'isolement* | +++++ | ++ | ++ | + | + | + | ++ |
| Phénotypiques | | | | | | | |
| Morphologie des colonies | Rugueuse | Eugonique | Lisse | Lisse | Lisse | Lisse | Rugueuse |
| Niacine | + | +/- | – | – | – | – | – |
| Nitrate réductase | + | +/- | – | – | +/– | + | – |
| TCH | R | R/S | S | S | R/S | S | S |
| Pyrazinamide | S | S | R | S | S | S | R |
| Tbl | S | S/R | S | S | S | S | R |
| D-cyclosérine | S | S | S | S | S | S | R |
| *Génotypiques* | | | | | | | |
| *mpt40* | + | + | – | – | + | – | – |
| *pnc A* (nucléotide 169) | C | C | G | C | C | C | G |
| *oxy* R (nucléeotide 285) | G | G | A | A | C | C | A |
| Spoligotype : spacers 39–43 | Présence (1 à 5) | Variable | Absence | Absence | Absence | Absence | Absence |
| RD1 | + | + | + | + | + | + | – |
| RD4 | + | + | – | + | + | + | – |
| RD9 | + | - | – | – | – | – | – |
| RD12 | + | + | + | – | + | + | – |

ANNEXE 38.4

## Recherche de la production d'acide nicotinique et de la présence d'une nitrate réductase

**Recherche de l'acide nicotinique par bandelette (Niacin Test®, Difco)**

Technique
- Déposer à la surface d'une culture sur milieu de Löwenstein 1 ml d'eau distillée stérile (si possible additionnée de 1 % de Tween 80®).
- Laisser le tube incliné pendant 20 minutes et recueillir l'eau dans un tube à hémolyse
- Tremper la bandelette imprégnée de réactif dans le tube à hémolyse
- Laisser à température ambiante pendant 15 à 20 minutes en agitant de temps en temps

Test positif = coloration jaune de la suspension
Test négatif = absence de coloration de la suspension
Témoin positif : coloration jaune avec culture de *M. tuberculosis*

**Réduction des nitrates (épreuve de Virtanen)**

Technique
- Une anse de mycobactéries à étudier est émulsionnée dans 2 gouttes d'eau distillée stérile dans un tube à hémolyse.
- Ajouter 2 ml d'une solution à 0,085 % de nitrate de sodium
- Incuber 2 h à 37 °C
- Ajouter 0,2 ml du réactif A et 0,2 ml du réactif B
- Réaction + = coloration rose à rouge résultat de la réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase
- Si pas de coloration, *ajouter une pincée de poudre de zinc* : le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, une coloration rose apparaît ; la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase)
- Si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé (bactéries ayant une nitrate réductase très active)

Témoin positif = culture de *M. tuberculosis*
Témoin négatif = culture de *M. bovis*.
Réactifs
- Solution de nitrate de sodium
  – Nitrate de sodium : 0,085 g
  – Eau distillée : 100 ml
- Réactif A de Griess
  – Acide sulfanilique : 0,80 g
  – Acide acétique : 30 ml
  – Eau distillée : 100 ml
- Réactif B de Griess
  – Alpha naphtylamine : 0,50 g
  – Acide acétique : 30 ml
  – Eau distillée : 100 ml

**ADRESSE UTILE**

**Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux**
Laboratoire de bactériologie-hygiène
CHU Pitié-Salpêtrière
47–83, boulevard de l'Hôpital
75651 Paris cedex 13
Tél. : 01 42 16 20 81 et 01 42 16 20 83
Fax : 01 42 16 20 72
E-mail: cnr.myctb@psl.aphp.fr

**LISTE DES FOURNISSEURS**

**Becton Dickinson**
11, rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix
Tél. : 04 76 68 37 30 – Fax : 04 76 68 35 04
www.bd.com

**bioMérieux**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Étoile
Tél. : 04 78 87 20 00 – Fax : 04 78 37 20 90
www.biomerieux.com

**Bio-Rad Laboratories**
3, boulevard Raymond-Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette
Tél. : 01 47 95 60 00 – Fax : 01 47 41 91 33
www.bio-rad.com

**HAIN Diagnostika**
72147 Nehren Allemagne
Distribué par Biocentric
270, rue Jenner
83150 Bandol – France
Tél. : 04 94 63 46 46 – Fax : 04 94 63 46 47
www.biocentric.com

**Heipha Diagnostika/Biotest**
80, rue Hélène-Boucher
ZI Centre
78530 Buc
Tél. : 01 39 20 20 80 – Fax : 01 39 20 20 81
www.sfrl.fr

**LISTE DES FOURNISSEURS**

**Innogenetics**
8, rue du Maréchal de Lattre-de-Tassigny
59800 Lille
Tél. : 01 64 59 14 54
www.innogenetics.com

**Qiagen S.A.**
3, avenue du Canada, LP 809
91974 Courtabœuf cedex
Tél. : 01 60 92 09 20 – Fax : 01 60 92 09 25
www.qiagen.com

**Roche Diagnostic**
2, avenue du Vercors
38242 Meylan cedex
Tél. : 04 76 76 30 30 – Fax : 04 76 76 30 01
www.roche-diagnostics.fr

**TABLEAU 38-6**

**Principe et caractéristiques des méthodes moléculaires d'identification des mycobactéries à partir de cultures.**

| *Méthode* | *Accuprobe®* | *INNO-LiPA® Mycobacterium v2* | *GenoType® Mycobacterium CM* | *GenoType® Mycobacterium AS* |
|---|---|---|---|---|
| Fabricant | Gen Probe | Innogenetics | Hain dignostika | Hain dignostika |
| Principe de détection | Hybridation ARN/ ADN | Hybridation ADN/ ADN | Hybridation ADN/ ADN | Hybridation ADN/ ADN |
| Gène cible | ARN165 | ITS 16-235 | AND 235 | ADN 235 |
| Étape d'amplification | - | point final | point final | point final |
| Type de méthode | monospécifique | polyspécifique | polyspécifique | polyspécifique |
| Temps d'exécution | 2 H | 5 H | 5 H | 5 H |
| Espèces ou complexes | | | | |
| MTB* | + | + | + | |
| MAC** | + | | | |
| MAIS*** | | + | | |
| *M. avium* | + | + | + | |
| *M. intracellulare* | + | + | + | |
| *M. kansasii* | + | + (3 génotypes) | + | + (4 génotypes) |
| *M. gordonae* | + | + | + | |
| *M. xenopi* | | + | + | |
| *M. chelonae* | | + (4 génotypes) | + | |
| *M. abscessus* | | | + | |
| *M. scrofulaceum* | | + | + | |
| *M. interjectum* | | | + | |
| *M. celatum* | | + | | + |
| *M. fortuitum complex* | | + | + (I et II) | |
| *M. szulgai* | | | | + |
| *M. phlei* | | | | + |
| *M. malmoense* | | + | + | |
| *M. marinum/ulcerans* | | + | + | |
| *M. peregrinum* | | + | + | |
| *M. haemophilum* | | | | + |
| *M. simiae* | | + | | + |
| *M. mucogenicum* | | + | | + |
| *M. smegmatis* | | | | + |
| *M. genavense/triplex* | | + | | + |
| *M. gastri* | | | | + |
| *M. asiaticum* | | | | + |
| *M. shimoidei* | | | | + |
| *M. goodi* | | | | + |
| *M. mucogenicum* | | | | + |
| *M. heckenshornense* | | | | + |
| *M. lentiflavum* | | | | + |

*Mycobactéries du complexe de la tuberculose **Mycobactéries du complexe *avium*. *** *Mycobacterium avium – intracellulare – scrofulaceum*

**TABLEAU 38-7**

**Caractères culturaux et biochimiques distinctifs des souches de mycobactéries photochromogènes à croissance lente (groupe I).**

| Tests \ Espèces | *M. kansasii* | *M. marinum* | *M. asiaticum* | *M. simiae** |
|---|---|---|---|---|
| Vitesse de croissance LJ ** | 21 jours | 3–5 jours | 21 jours | 21 jours |
| Croissance sur LJ à :<br>– 30 °C<br>– 37 °C | <br>+<br>+ | <br>+<br>– | <br>+<br>+ | <br>+<br>+ |
| Hydrolyse Tween 80® (10 jours) | + | + | – | + |
| Niacine | – | – | – | + |
| Nitrate réductase | + | – | – | – |
| Arylsulfatase (14 jours) | ± | + | + | – |
| Uréase | ± | + | – | + |
| Phosphatase acide | + | + | | – |

* Existence de souches non chromogènes.
** LJ : Löwenstein-Jensen.

des colonies sur milieux solides, des critères utilisés dans la classification de Runyon (vitesse de croissance et pigmentation de la souche) et sur la recherche d'une activité catalasique. Cette dernière épreuve permet de distinguer les mycobactéries de la tuberculose des mycobactéries atypiques. Les mycobactéries de la tuberculose possèdent une catalase thermosensible (68 °C), à la différence des autres mycobactéries.

À partir des résultats des épreuves d'orientation, des tests culturaux (sensibilité à des substances antibacillaires, assimilation de substrats, croissance sur milieux ordinaires) et des épreuves biochimiques de mise en évidence d'activités enzymatiques sont choisis pour permettre une identification biochimique complète.

Les caractères biochimiques et les profils phénotypiques des principales espèces de mycobactéries atypiques classées selon les critères de la classification de Runyon (vitesse de croissance et pigmentation) sont présentés dans les tableaux 38.7 à 38.9.

## Détection génomique

Pour pallier la lenteur relative des méthodes de cultures, même si celles-ci ont vu leur temps de réponse significativement raccourci avec les cultures en milieu liquide, de nombreuses techniques de détection et d'amplification du génome des mycobactéries de la tuberculose ont été mises au point puis commercialisées.

La PCR (*polymerase chain reaction*) a été utilisée dès le début des années 1990 pour la détection des mycobactéries et principalement celle de la tuberculose. Il existe une étape d'hybridation à l'aide d'une sonde dont les cibles sont variées (ADN 16S, espace inter-16-23S, séquence d'insertion IS*6110*, Ag 38KDa, Ag 65 KDa).

Les techniques de détection génomique après amplification sont réalisées sur des produits pathologiques décontaminés (soude et N-acétyl-L-cystéine) et concentrés. Les étapes d'extraction des échantillons, d'amplification et de détection des produits amplifiés doivent respecter des procédures qui sont précisées dans un autre chapitre afin de protéger les manipulateurs et de prévenir la survenue des résultats faussement positifs.

L'extraction constitue une étape préalable indispensable à la détection de l'ADN des mycobactéries et peut être réalisée avec des résultats satisfaisants en utilisant des coffrets d'extraction adaptés à différents types de prélèvements (tissus, sang) qui incluent des microcolonnes de purification (Quiagen). Maintenant, des automates d'extraction permettent d'obtenir des résultats équivalents.

Pour éviter le monopole lié à l'utilisation de la *Taq* polymérase, de nombreux procédés ont été mis au point pour amplifier des séquences génomiques.

Les méthodes de détection (colorimétriques ou fluorimétriques) des produits amplifiés sont variées et de plus en plus souvent automatisées, et permettent une détection des produits en temps réel au fur et à mesure du déroulement de la réaction d'amplification (PCR en temps réel) pour certaines d'entre elles (tableau 38.10). Les méthodes de détection des produits amplifiés sont variées et font appel à des agents intercalants ou des sondes. Les principaux avantages de ces techniques sont l'absence d'étapes post-PCR, avec pour conséquences une rapidité de la technique, du rendu des résultats, d'une diminution des risques de contamination et la possibilité d'ajouter des contrôles internes coamplifiés et corévélés.

Les principaux coffrets commercialisés sont :

- le test classique de PCR (Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test®, Roche ; MTBC Genoquick®, Hain Diagnostika), et la méthode plus récente en temps réel Amplicor COBAS® TaqMan® MTB Test) ;

**TABLEAU 38-8**

**Caractères culturaux et biochimiques distinctifs des souches de mycobactéries scotochromogènes (groupe II) à croissance lente et des souches de mycobactéries non pigmentées à croissance lente (groupe III).**

| Test \ Espèces | *M. flavescens* | *M. gordonae* | *M. scrofulaceum* | *M. szulgai** | Complexe *M. avium* | *M. genavense* | *M. haemophilum* | *M. malmoense* | Complexe *M. terrae*** | *M. xenopi**** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Groupe de Runyon | II | II | II | II | III | III | III | III | III | III |
| Croissance LJ à : | | | | | | | | | | |
| – 30 °C | + | + | + | + | V | V | + | + | + | V |
| – 37 °C | + | + | + | + | + | + | – | + | + | + |
| – 42 °C | V | – | + | – | + | + | – | – | – | + |
| Hydrolyse Tween® 80 | + | + | – | V | – | – | – | + | + | – |
| Nitrate réductase | + | – | – | + | – | – | – | – | + | – |
| Arylsulfatase (14 jours) | + | – | – | + | V | – | – | – | V | + |
| Uréase | + | V | V | + | – | – | – | V | – | – |
| Phosphatase acide | – | V | – | + | – | | – | – | + | – |

LJ : Löwenstein-Jensen.
* Photochromogène à 22 °C.
** *M. terrae, M. triviale* et *M. nonchromogenicum.*
*** Parfois scotocromogène.

**TABLEAU 38-9**

**Caractères culturaux et biochimiques distinctifs des souches de mycobactéries à croissance rapide (groupe IV).**

| Test \ Espèces | *M. fortuitum* | *M. peregrinum* | *M. fortuitum biovar III* | | *M. chelonae* | *M. abscessus* | *M. mucogenicum* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | I | II | | | |
| Nitrate réductase | + | + | + | + | – | – | ± |
| Citrate de fer ammoniacal | + | + | + | + | – | – | – |
| NaCl à 5 % | + | + | + | + | ± | + | – |
| Arylsulfatase (3 jours) | + | + | + | + | + | + | + |
| Croissance sur : | | | | | | | |
| – Citrate de Na | | – | – | – | + | – | + |
| – Mannitol | – | + | + | + | – | – | + |
| – Inositol | – | – | + | + | – | – | – |
| – Sorbitol | – | – | + | – | – | – | – |

- l'amplification transcriptionnelle associant l'action de deux enzymes d'une transcriptase inverse et d'une ARN polymerase (Amplified Mycobacterium Tuberculosis MTD® Direct Test, Gene-Probe) ;
- l'amplification par déplacement de brin (Strand Displacement Amplification® [SDA], Becton Dickinson) : technique complexe utilisant l'enzyme de Klenow dépourvue d'activité exonucléasique, une enzyme de restriction *Hinc*II, des désoxynucléotides dont l'un est modifié (dATP) et deux jeux d'amorces complémentaires. Cette réaction est isotherme ; la déshybridation est entretenue par une enzyme de restriction à la place de l'action de la chaleur ;
- la technique NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) qui est une technique isotherme d'amplification d'ARN. Un ARN cible est recopié en son ADN complémentaire à l'aide d'une transcriptase inverse. Une RNase H permet l'élimination de l'ARN,

**TABLEAU 38-10**

**Principe et caractéristiques des méthodes de détection moléculaire des mycobactéries à partir d'échantillons cliniques – Identification.**

| *Méthode* | *Amplicor®* | *AMTD®* | *SDA®* | *Genoquick MTB®* | *GenoType Direct Myco®* | *Xpert MTB/RIF®* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Fabricant | Roche | Gen Probe | Becton Dickinson | Hain diagnostika | Hain diagnostika | Cepheid |
| Principe de détection | Fluorescence | Luminescence | Luminescence | Colorimétrie | Colorimétrie | Fluorescence |
| Gène cible | ADN 16S | ADN 16S | ADN 16S – IS*6110* | IS *6110* | ADN23S | *rpob* |
| Étape d'amplification | Point final | Point final | Temps réel | Point final | Point final | Temps réel |
| Type de méthode | PCR | AMTDT | SDA | PCR | NASBA | PCR |
| Temps d'exécution | 6 h | 6 h | 2,5 h | 3 h | 5 h | 2 h |
| Détection de résistance associée | – | – | – | – | – | Rifampicine |
| Espèces | | | | | | |
| MTB*<br>*M. avium*<br>*M. intracellulare*<br>*M. kansasii*<br>*M. malmoense* | + | + | +<br>+ | + | +<br>+<br>+<br>+<br>+ | + |

* Mycobactéries du complexe de la tuberculose.

**TABLEAU 38-11**

**Principe et caractéristiques des méthodes de détection moléculaire des mycobactéries à partir d'échantillons cliniques – Détection moléculaire de la résistance aux antituberculeux.**

| *Méthode* | *Fabricant* | *Antibiotique* | *Gène* | *Nombre de sondes « sauvages »* | *Nombre de sondes « mutées »* |
|---|---|---|---|---|---|
| INNO-LiPA Rif.TB® | Innogenetics | Rifampicine | *rpo*B | 5 | 4 |
| MTBDR *plus*® | Hain diagnostika | Rifampicine<br>Isoniazide | *rpoB*<br>*katG*<br>*inhA* | 8<br>1<br>2 | 4<br>2<br>4 |
| MTBDR *sl*® | Hain diagnostika | Fluoroquinolones<br>Aminosides<br>Ethambutol | *gyrA*<br>*rrs*<br>*embB* | 3<br>2<br>1 | 6<br>2<br>2 |
| Xpert MTB/RIF®* | Cepheid | Rifampicine | *rpoB* | 5 | 0** |

* PCR en temps réel.
** La détection de la résistance est observée par la diminution du nombre de sondes hybridées sur le produit de PCR.

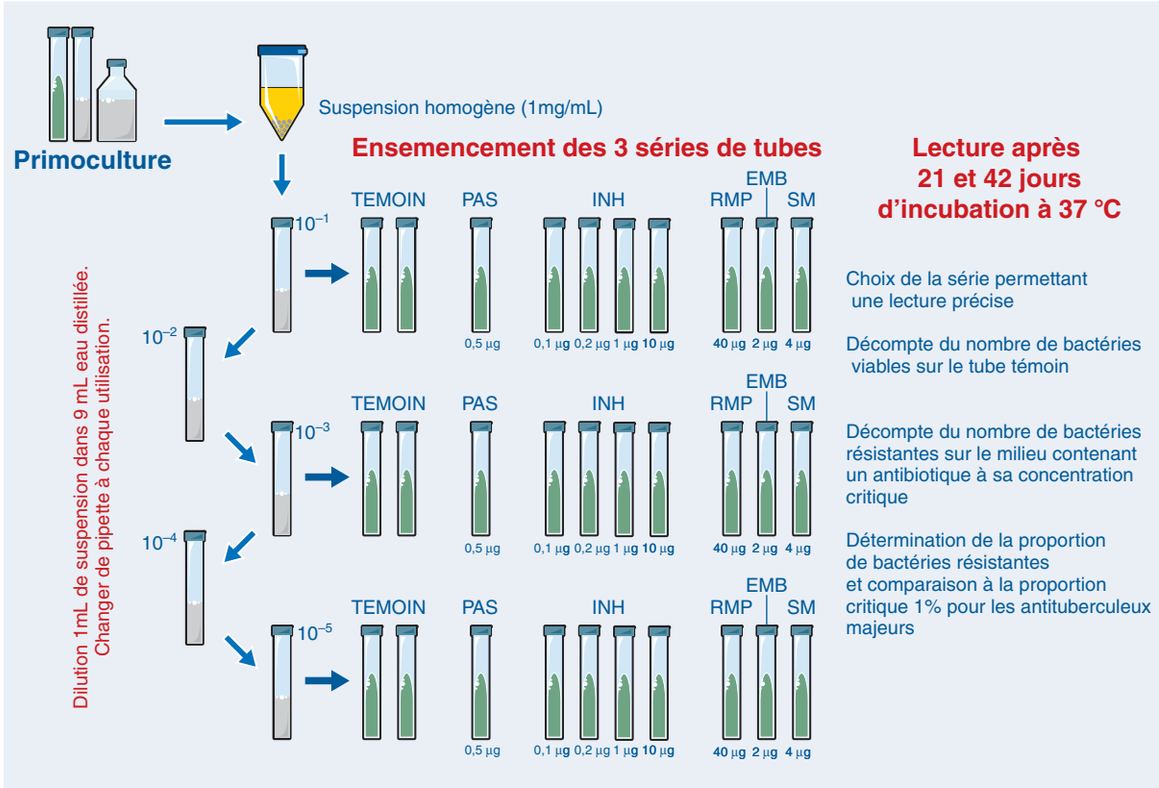



**Fig. 38.8.** – *Étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries de la tuberculose sur milieux solides (Löwenstein-Jensen) par la méthode des proportions (Canetti, Rist, Grosset).*

puis l'ADNc est transcrit en ARN à l'aide d'une ARN polymérase. Ce processus aboutit en quelques cycles à une amplification d'environ 100 fois la quantité d'ARN présente dans l'échantillon. Cette technique est utilisée dans le coffret GenoType Direct Mycobacteria® (Hain Diagnostika).

Le test GenoQuick MTB® (Hain Diagnostika) repose sur une amplification générée par PCR spécifique et détectée qualitativement sur bandelette. En premier lieu, les amplicons simple brin s'hybrident avec les sondes spécifiques contenues dans le mélange amorces–nucléotides. Ces complexes se fixent ensuite sélectivement à la bande test et sont visualisé en 15 minutes grâce à un marquage à l'or.

Un nouveau système permettant l'automatisation complète de l'analyse (extraction ADN, préparation des mélanges réactionnels, amplification et détection des séquences cibles par PCR temps réel), du prélèvement du patient au résultat final, a été récemment développé (Test Xpert® MTB/RIF, Cepheid). Cette méthode permet de détecter simultanément la présence du génome des mycobactéries de la tuberculose et la résistance à la rifampicine (tableau 38.11). Les amorces amplifient une portion du gène *rpoB* de 81 paires de base, et l'hybridation sélective des 5 sondes permet d'identifier les mycobactéries du complexe *tuberculosis* et de différencier la séquence sauvage des mutations associées à la rifampicine. Les performances de ce test ont montré une sensibilité variant de 100 % (prélèvement microscopie et culture positives) à 71,7 % (prélèvement microscopie négative et culture positive).

Dans le cas de prélèvements pulmonaires à examen direct positif, les techniques d'amplification géniques qui présentent une bonne sensibilité et une bonne spécificité sont recommandées pour distinguer les mycobactéries atypiques des mycobactéries de la tuberculose. L'utilisation des techniques d'amplification dans la surveillance d'un traitement antituberculeux n'est pas recommandée. En effet, des résultats positifs, dus à la présence de fragments de génome de bacilles morts, ont été observés alors même que les cultures et les examens directs étaient négatifs. En pratique, les techniques de détection rapide par amplification ne remplacent pas actuellement les étapes classiques et doivent être réservées aux prélèvements présentant un examen direct ou provenant d'un patient fortement suspect de tuberculose.

## Étude de la sensibilité aux antibiotiques

### *Mycobactéries de la tuberculose*

Les bacilles de la tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) constituent la majorité des souches isolées

dans un laboratoire de routine. L'étude de la sensibilité aux antituberculeux de première intention, méthode bien standardisée et corrélée aux résultats des études cliniques, sera détaillée dans ce paragraphe. En revanche, la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries atypiques n'est pas standardisée et la corrélation avec les données in vivo n'est pas bonne.

Les bacilles de la tuberculose sont naturellement résistants aux antibiotiques actifs sur la plupart des espèces rencontrées en microbiologie médicale, à l'exception des aminosides (streptomycine, amikacine), des rifamycines (rifampicine) et des fluoroquinolones. Ils sont naturellement sensibles à un certain nombre d'antibiotiques dits antituberculeux : isoniazide, pyrazinamide, éthambutol, thioamides (éthionamide et protionamide). L'activité de ces antibiotiques est inégale, certains étant bactéricides et d'autres bactériostatiques. *M. bovis* est naturellement résistant au pyrazinamide.

La résistance acquise aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* est toujours liée à des mutations de gènes chromosomiques. Dans une population bactérienne, il existe spontanément des bactéries mutantes résistantes à chacun des antituberculeux. Cette proportion de mutants résistants pour les souches dites « sauvages » varie de $1/10^5$ pour l'isoniazide à $1/10^8$ pour la rifampicine. Au sein d'une caverne tuberculeuse qui contient $10^8$ bacilles, il y a, naturellement avant traitement, 100 à 1000 bacilles résistants à l'isoniazide et 1 résistant à la rifampicine. La survenue de chaque mutation étant indépendante, l'association de deux antibiotiques, comme l'isoniazide et la rifampicine, empêche la sélection des mutants résistants. La proportion de mutants résistants présents dans une culture est comparée à une proportion critique (1 ou 10 % selon les antibiotiques), définie par l'étude des échecs cliniques. La réalisation d'un antibiogramme doit donc être systématique pour toute souche de mycobactéries de la tuberculose isolée initialement chez un patient et également pour toute souche isolée après 3 mois de traitement. Les antibiotiques à éprouver d'emblée sont : isoniazide, rifampicine et éthambutol. En cas de rechute ou lorsqu'il existe un risque de multirésistance, il est nécessaire d'adresser la souche à un centre de référence afin de déterminer la sensibilité aux antituberculeux de seconde ligne (thioamides, fluoroquinolones, aminosides, PAS, etc.).

## Méthodes phénotypiques

### Méthode des proportions en milieu solide (Canetti, Rist, Grosset) (fig 38.8)

La méthode de référence dite « des proportions » détermine la proportion de mutants résistants aux antibiotiques. La méthode des proportions est effectuée sur milieu de Löwenstein-Jensen ou sur milieux 7H9, 7H10. Des coffrets prêts à l'emploi (Biorad) sont disponibles. Des dilutions de la souche à étudier sont ensemencées sur des milieux témoins (sans antibiotique) et sur des milieux contenant des antibiotiques afin d'obtenir des cultures dont le nombre de colonies est comptable (fig. 38.9). Les antituberculeux sont incorporés à des concentrations critiques (tableau 38.8) déterminées et corrélées aux concentrations sériques obtenues chez les patients à des posologies usuelles. Pour la streptomycine, l'éthambutol et la rifampicine, une seule concentration critique existe. En ce qui concerne l'isoniazide, quatre concentrations (0,1, 0,2, 1 et 2 µg/ml) permettent de distinguer les résistances à très bas niveau (sensible à 0,2 et résistante à 0,1 µg/ml) qui doivent être considérées comme cliniquement sensibles. Les souches résistantes à 10 µg/ml ont un pouvoir infectieux diminué et une croissance plus difficile.

Une suspension est obtenue en prélevant 5 à 10 colonies, sur un milieu solide non contaminé, puis homogénéisée plusieurs fois dans un tube contenant des billes de verre et 0,5 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension est ensuite ajustée avec de l'eau stérile à 1 mg/ml par opacimétrie à l'aide d'un étalon BCG. Trois dilutions ($10^{-1}$, $10^{-3}$ et $10^{-5}$) sont réalisées à partir de cette suspension calibrée, et les tubes des trois séries sont ensemencés avec 0,2 ml (fig. 38.9). Cette méthode indirecte, réalisée à partir d'une culture, peut être également effectuée directement à partir d'un prélèvement si celui-ci présente un examen direct positif (au moins 1 BAAR/champ, × 250). Les tubes sont incubés 48 heures à 37 °C avant d'être bouchés hermétiquement. Une lecture précoce est réalisée au 21e jour et la lecture définitive au 42e jour. La lecture précoce permet notamment, avec la dilution $10^{-1}$, de détecter les résistances franches en comparant la culture obtenue sur les tubes témoins et les tubes contenant les antibiotiques, et inversement les souches sensibles (absence de culture sur les tubes test contrastant avec la nappe visible sur les témoins sans antibiotique). Le nombre de colonies apparues sur les différents tubes est compté et permet de déduire la proportion de bacilles résistants présents dans la souche. Celle-ci est déclarée résistante lorsque la proportion des colonies résistantes est égale ou supérieure à une proportion critique (1 % pour les antituberculeux majeurs, streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol).

Bien que considéré comme un antituberculeux de première ligne, le pyrazinamide est souvent testé en seconde intention (multirésistance, rechute) en raison des performances médiocres des milieux acides utilisés : à pH acide, la croissance des mycobactéries est diminuée et peut être négative sur le témoin sans antibiotique, et inversement un milieu insuffisamment acide peut permettre à tort la croissance en présence du pyrazinamide (faux positif). La proportion critique est pour cet antituberculeux de 10 %. Le recours à une méthode moléculaire est souvent indispensable pour détecter et caractériser cette résistance qui demeure rare chez *M. tuberculosis*.

### Méthode des proportions en milieu liquide

La méthode des proportions en milieu liquide est analogue à celle réalisée en milieu solide (fig. 38.9), mais permet de raccourcir le délai de réponse. La mesure automatisée de la croissance se fait par fluorescence (MGIT 960®) ou par diminution de pression (versaTREK®). En

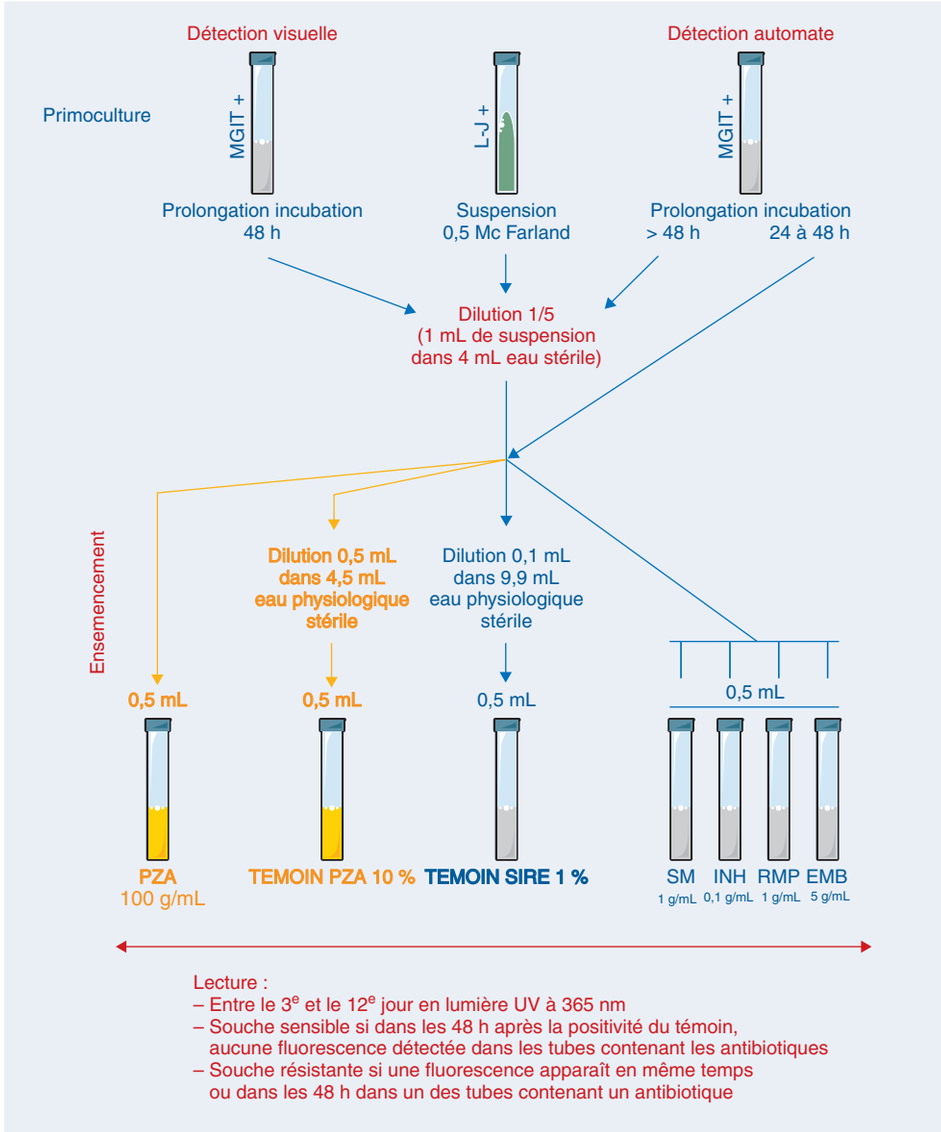



**Fig. 38.9.** – *Étude de la sensibilité aux antituberculeux en milieux liquides par la méthode MGIT® (Bactec).*

cas de résultats douteux, il est recommandé de déterminer la proportion exacte de mutants résistants sur milieu solide.

Par la méthode MGIT, 0,5 ml de la souche à étudier est inoculée dans les tubes contenant les antibiotiques et 0,5 ml de supplément OADC. Le tube témoin est inoculé avec 0,5 ml d'une suspension diluée au 1/100 par rapport aux tubes contenant la streptomycine (2 µg/ml), l'isoniazide (0,1 µg/ml), la rifampicine (1 µg/ml), l'éthambutol (5 µg/ml). Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 12 jours au maximum. La lecture est réalisée entre le 3e et le 12e jour en lumière UV à 365 nm. Une souche est déclarée sensible si dans les 48 heures qui suivent la positivité (dilué au 1/100e) du témoin, aucune fluorescence n'est détectée dans les tubes contenant les antibiotiques. Si une fluorescence apparaît en même temps ou dans les 48 heures dans un des tubes contenant un antibiotique, cette souche sera considérée résistante à cet antibiotique. En ce qui concerne l'isoniazide, la détermination du niveau de résistance peut être réalisée en utilisant une concentration de 0,4 µg/ml.

## Méthodes moléculaires

La résistance acquise aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* est toujours liée à des mutations des gènes chromosomiques et n'est pas transférable d'une souche à l'autre. Il n'a pas été décrit de plasmides ou de transposons de résistance.

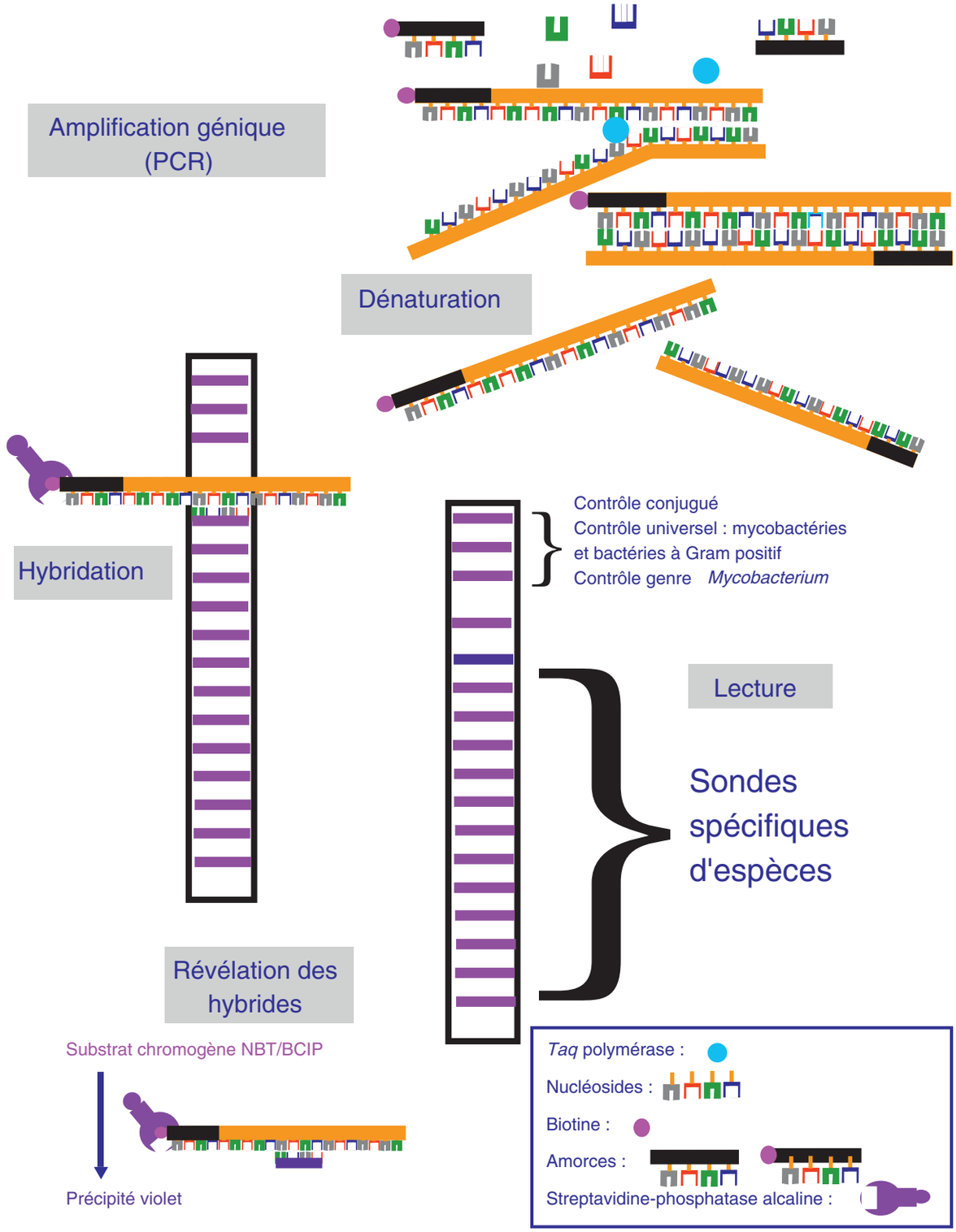



**Fig. 38.10.** – *Principe des méthodes d'identification et de détection de la résistance aux anti-tuberculeux par PCR et hybridation sur support solide.*

Les mutations responsables de la résistance aux antibiotiques peuvent être identifiées après amplification des gènes (ou fragments de gènes) sur lesquels elles sont localisées. Les mutations peuvent aussi être identifiées par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques comme dans la technique LiPA ou *line probe assay*. Cette méthode consiste à hybrider les fragments amplifiés avec des sondes préfixées sur une bandelette, principe analogue aux coffrets d'identification GenoTypeMycobacterium®, INNO-LiPA Mycobacteria®. La révélation des hybrides se traduit par une réaction colorée (fig. 38.10). Les sondes correspondent, pour 5, à la séquence de l'allèle sauvage (sans mutation) et, pour les 4 autres, à la séquence des allèles résistants correspondant aux mutations les plus souvent décrites chez les souches résistantes. Actuellement, cette technique est commercialisée pour la détection de la résistance à la rifampicine, sous la forme de réactifs prêts à l'emploi (INNO-LiPARifTB®, InnoGenetics). Elle permet de détecter rapidement une résistance à la rifampicine, ou de confirmer une résistance à la rifampicine observée au cours de l'antibiogramme. De plus, il est possible d'appliquer la technique directement aux prélèvements très riches en bacilles présentant une microscopie positive (tableau 38.11). Plus récemment, deux coffrets permettent respectivement la détection des mutants résistants les plus fréquents à la rifampicine (gène *rpoB*) et à l'isoniazide (gène *katG* et *inhA*) (GenoType MTBDR*plus*®, Hain Diagnostika) et à l'éthambutol, aux aminosides et aux fluoroquinolones (GenoType MTBDR*sl*®) (tableau 38.11). Ces tests sont fondés sur le même principe que le test INNO-LiPARifTB®. La sensibilité des tests détectant la résistance à la rifampicine est excellente (95 % des mutations sont situées sur un fragment limité du gène *rpoB*). La sensibilité du test (GenoType MTBDR*plus*®) pour la détection de la résistance à l'INH varie suivant les études de 79 à 92 %.

### *Mycobactéries atypiques*

L'antibiogramme des mycobactéries atypiques n'est pas standardisé, excepté pour les souches de *M. kansasii,* pour lesquelles la détermination aux antituberculeux peut être effectuée. La sensibilité des mycobactéries à croissance rapide peut être évaluée en testant des antibiotiques classiques par la méthode des disques E-Test® (AES laboratoire) sur des milieux 7H10 supplémentés en OADC, ou sur des milieux Mueller-Hinton. Après 48 à 72 heures d'incubation à 30 ou à 37 °C, la lecture est effectuée. Une technique de dilution en milieu gélosé 7H10 peut également être réalisée.

## Diagnostic immunologique rapide

### Méthode directe

La détection directe d'antigènes solubles par latex ou ELISA à partir de produits pathologiques (sérum, LCR, liquide pleural, prélèvement respiratoire, urine) a montré une sensibilité et une spécificité médiocres, et n'est pas utilisée en routine.

### Méthodes indirectes

### Sérologie

Les inconvénients du diagnostic bactériologique classique de la tuberculose (sensibilité et spécificité de l'examen direct, lenteur des cultures) ont conduit de très nombreux auteurs à tenter la mise au point d'un sérodiagnostic. Les intérêts majeurs du sérodiagnostic de la tuberculose seraient le diagnostic et le suivi thérapeutique des formes paucibacillaires (extrapulmonaires, infantiles), avec la possibilité de différencier un sujet faisant une tuberculose infection (contage) d'un sujet vacciné par le BCG, et de distinguer une tuberculose infection d'une tuberculose maladie.

Les tests sérologiques (mise en évidence d'anticorps) développés, le plus souvent à partir d'un antigène (Ag) protéique unique plus ou moins purifié, sont peu sensibles et peu spécifiques. L'utilisation d'Ag lipidiques pariétaux (sulfolipides, lipooligosaccharides, di-acyltréhaloses, phénolglycolipides) a permis d'augmenter la sensibilité des tests. L'utilisation de mélange d'Ag protéiques ou d'Ag lipidiques a permis également d'augmenter la sensibilité des tests sérologiques.

Différents obstacles rencontrés tenant à la faible spécificité (fréquence des contacts avec des mycobactéries commensales), à la sensibilité (manque de corrélation entre l'intensité de la réponse anticorps et le stade clinique) et à l'absence de standardisation ne laissent pas de place, actuellement, à l'utilisation en routine de la sérologie dans le diagnostic et la surveillance du traitement de la tuberculose.

### *Exploration de l'immunité à médiation cellulaire*

La génomique comparative des différentes espèces des mycobactéries de la tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG) a permis de déterminer des régions codant des protéines présentes uniquement chez *M. tuberculosis* qui permettent d'éviter des réactions croisées entre sujets vaccinés et sujets atteints de tuberculose. Parmi ces protéines, trois antigènes (ESAT6, CFP10, TB7.7) absents chez *M. bovis* BCG sont utilisés pour stimuler la production d'interféron γ (INFγ) par des cellules mononucléées du sang périphérique afin de détecter des sujets atteints de tuberculose infection. En effet, l'activation et l'expansion des lymphocytes T spécifiques d'un antigène peuvent être induites suite à une infection ou à une immunisation (vaccin). Lorsque les lymphocytes T CD8 et CD4 sont, une seconde fois, mis en présence des antigènes, ils sécrètent de l'INFγ. Ces protéines sont également absentes de la quasi-totalité des mycobactéries atypiques, excepté quelques souches de *M. marinum, M. szulgai* et *M. kansasii*.

Deux techniques sont commercialisés pour quantifier la réponse INFγ après stimulation par ESAT6, CFP10 et TB7.7. Le principe de la première technique (ELISPOT) est de mesurer les réponses cellulaires spécifiques à un antigène en quantifiant le nombre de cellules T produisant de l'INFγ. En pratique, les cellules mononucléées du sang sont séparées sur gradient de Ficoll, puis mises en présence de chaque antigène dans les cupules d'une micoplaque sensibilisées avec des anticorps anti-INFγ pendant 20 heures à 37 °C sous $CO_2$. Après lavage, on procède à une révélation à l'aide du système Biotine-Avidine. Les « spots » colorés sont détectés à l'aide d'un lecteur. La sensibilité du test ELISPOT permet de détecter une cellule spécifique à un antigène sur 10 000 lymphocytes. Le seuil de positivité est de 10 UFS (unité formant un spot).

La seconde technique (QuantiFERON-TB®, Cellestis) est réalisée sur sang total hépariné. Des aliquots de sang sont mis en présence de chaque antigène dans des plaques à culture cellulaire. Après incubation à 37 °C 16–24 h, le plasma est transféré dans une plaque de microtitration recouverte avec des anticorps anti-INFγ. Lors de cette seconde étape, une réaction ELISA classique quantifie la production d'INFγ en se référant à une courbe étalon réalisée à l'aide de solutions titrées. Une réponse est considérée comme positive si l'échantillon contient au moins 0,35 UI/ml. Ces techniques sont utilisées principalement dans le diagnostic des infections tuberculeuses latente (ITL), mais également comme aide dans celui de la tuberculose maladie. En France, la Haute autorité de santé a reconnu en 2006 quatre indications :

- dans les enquêtes autour d'un cas, uniquement chez les adultes (de plus de 15 ans) ;
- lors de leur embauche, pour les professionnels de santé ;
- aide au diagnostic des formes extrapulmonaires de la tuberculose maladie difficiles à diagnostiquer ;
- avant la mise en route d'un traitement par anti-TNFα.

Le principal avantage de ces nouvelles méthodes concerne le dépistage des populations déjà vaccinées par le BCG. L'actualisation de ces recommandations est attendue prochainement.

## Recherche du bacille de la lèpre

Bien que la mise en route d'un traitement contre la lèpre soit décidée sur des arguments cliniques, un laboratoire métropolitain peut être amené à réaliser une confirmation de diagnostic de lèpre.

La mise en évidence du bacille de Hansen (*M. leprae*) repose sur la visualisation de la bactérie par l'examen direct (Ziehl-Neelsen) ou sur la recherche de génome par amplification génique, cette bactérie n'étant pas cultivable. La présence de BAAR regroupés en amas (globi) est observée à partir de frottis réalisés après recueil d'un raclage doux de la cloison nasale à l'aide d'un écouvillon ou d'une curette ophtalmique, d'une sérosité d'un léprome ulcéré ou d'un prélèvement de sang capillaire réalisé au lobe de l'oreille à l'aide d'un vaccinostyle.

Nous ne développerons pas le diagnostic qui sort de la routine.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Azay Mycobactéries : groupe d'étude sur les mycobactéries créé en 1994 par B. Carbonnelle et J. Grosset http : //azaymycobacteries.free.fr/.

Cambau E, Veziris N, Truffot-Pernot C. Bases microbiologiques des traitements antituberculeux – Rôle du laboratoire dans l'instauration et la surveillance du traitement. In : Denis F, Perronne C, editors. *Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques. Paris : Elsevier ; 2004. p. 203–34.

Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Rev Tuberc Pneumol 1963 ; 27 : 291–8.

Carbonnelle B, Dailloux M, Lebrun L, Maugein J, Pernot C. Mycobactéries. Mycobactérioses. Cahier de Formation Biologie Médicale 2003 ; 29.

Cattoir V. Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. Ann Biol Clin 2004 ; 62 : 405–13.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis bacteriology. Organisation and practice. 2nd ed. Oxford–Boston–Johannesburg–Melbourne–New Delhi–Singapore : Butterwort-Heinemann ; 1997.

David H, Levy-Frebault V, Thorel MF. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Paris : Institut Pasteur ; 1989.

Devulder G, Perriere G, Baty F, Flandrois JP. BIBI, a Bioinformatics Bacterial Identification Tool. (http : //pbil.univ-lyon1.fr/bibi/.) J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 1785–7.

Dostal S, Richter E, Harmsen D. Concise guide to mycobacteria and their molecular differenciation. Würzburg : RIDOM Press ; 2004.

Euzeby. http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html.

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. On behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee. An Official ATS/IDSA Statement : diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am Resp J Crit Care Med 2007 ; 175 : 367–416.

Grosset J, Boisvert H, Truffot-Pernot C. Mycobactéries. In : Le Minor L, Véron M, editors. Bactériologie médicale. Paris : Flammarion Médecines-sciences ; 1989. p. 965–1017.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Leclerc MC, Thomas F, Guégan JF. Evidence for phylogenetic inheritance in pathogenicity of *Mycobacterium*. Antonie Van Leeuwenhoek 2003 ; 83 : 265–74.

Martin C, Vincent V, Denis F. Diagnostic des infections à mycobactéries. In : Denis F, Perronne C, editors. *Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques. Paris : Elsevier ; 2004. p. 139–87.

Parrish NM, Carroll KC. The role of the clinical mycobacteriology laboratory in the diagnosis and management of tuberculosis in low prevalence settings. J Clin Microbiol 2010 ; [Epub ahead of print].

Pfyffer GE. *Mycobacterium* : general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC : ASM Press ; 2009. p. 543–72.

Vincent V, Gutierrez C. *Mycobacterium* : Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC : ASM Press ; 2009. p. 573–88.

CHAPITRE
39

# Mycoplasmes

C. Bébéar, C.M. Bébéar

## Généralités

Micro-organismes ubiquitaires, les mycoplasmes appartiennent à la classe des *Mollicutes* (de *mollis cutis* : peau molle). Ils sont dépourvus de paroi, d'où un aspect polymorphe et une insensibilité totale aux β-lactamines. Ce sont les plus petits procaryotes capables de multiplication autonome.

La classe des *Mollicutes,* comprend quatre ordres, les *Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, Acholeplasmatales* et *Anaeroplasmatales*, séparés d'après leur habitat naturel, leur exigence en stérols et un certain nombre d'autres propriétés. Parmi les 18 espèces rencontrées chez l'homme (tableau 39.1), 14 appartiennent au genre *Mycoplasma*, 2 au genre *Ureaplasma* (*Ureaplasma urealyticum* et *U. parvum* regroupés sous le terme *Ureaplasma* spp.) et 2 au genre *Acholeplasma*. Le terme mycoplasmes continue à être utilisé pour désigner l'ensemble des *Mollicutes.*

Les mycoplasmes seraient sur le plan phylogénétique des formes très évoluées, dérivées de bactéries à Gram positif à faible teneur en guanine et cytosine, ayant des ancêtres communs avec certains *Clostridia (Clostridium innocuum* et *C. ramosum*) et ayant perdu la capacité de synthétiser une paroi.

Ce sont des contaminants fréquents de cultures cellulaires.

## Pouvoir pathogène et habitat

Largement répandus dans la nature, les mycoplasmes colonisent chez l'homme les muqueuses respiratoires et les muqueuses génitales. Seules certaines espèces sont

**TABLEAU 39-1**

**Mycoplasmes isolés chez l'homme.**

| | *Site primaire d'isolement* | *Pouvoir pathogène* | *Fermentation glucose* | *Hydrolyse arginine* | *Hydrolyse urée* |
|---|---|---|---|---|---|
| *M. pneumoniae* | Respiratoire | + | + | – | – |
| *M. hominis* | Génital | + | – | + | – |
| *M. genitalium* | Génital | + | + | – | – |
| *M. amphoriforme* | Respiratoire | ? | + | – | – |
| *M. fermentans* | Génital | ? | + | + | – |
| *M. penetrans* | Génital | ? | + | + | – |
| *M. salivarium* | Respiratoire | – | – | + | – |
| *M. orale* | Respiratoire | – | – | + | – |
| *M. buccale* | Respiratoire | – | – | + | – |
| *M. faucium* | Respiratoire | – | – | + | – |
| *M. lipophilum* | Respiratoire | – | – | + | – |
| *M. primatum* | Respiratoire | – | – | + | – |
| *M. spermatophilum* | Génital | ? | – | – | – |
| *M. pirum* | ? | ? | + | + | – |
| *Ureaplasma spp.*[1] | Génital | + | – | – | + |
| *A. laidlawii* | Respiratoire | – | + | – | – |
| *A. oculi* | ? | – | + | – | – |

[1]Renferme deux espèces, *U. urealyticum* (ancien biovar 2) et *U. parvum* (ancien biovar 1).

pathogènes. Présentant une forte affinité pour les cellules, ce sont des intracellulaires facultatifs.

### Infections respiratoires

Seul *Mycoplasma pneumoniae* a un pouvoir pathogène certain et n'appartient pas à la flore commensale des voies respiratoires. Le rôle de *M. amphoriforme*, espèce nouvelle trouvée dans les voies respiratoires basses de sujets immunodéprimés atteints de bronchite chronique, est à préciser.

*M. pneumoniae* atteint l'ensemble des voies respiratoires, dans tous les groupes d'âge, de manière endémique et épidémique. Le plus souvent responsable de trachéobronchites, il est la deuxième cause de pneumonies communautaires derrière *Streptococcus pneumoniae*. Il serait responsable de 30 % des pneumonies communautaires pédiatriques, taux atteignant plus de 50 % chez l'enfant de plus de 5 ans. La présence d'atteintes associées, en particulier cutanées, est évocatrice. C'est une cause émergente d'encéphalite aiguë, plus spécialement chez l'enfant de moins de 10 ans. Propriétés d'adhésion, production d'une toxine cytotoxique et impliquée dans la réponse inflammatoire de l'hôte, la toxine CARDS (*community acquired respiratory distress syndrome*), et mécanismes immunopathologiques interviennent dans son pouvoir pathogène.

*M. pneumoniae* joue probablement un rôle dans l'asthme (exacerbations aiguës chez l'enfant et chez l'adulte, asthme chronique stable).

### Infections génitales

Trois espèces sont concernées, *M. genitalium, M. hominis* et *Ureaplasma* spp. La présence de *M. hominis* et surtout d'*Ureaplasma* spp. à l'état commensal dans les voies génitales basses rend délicate l'appréciation de leur pouvoir pathogène. La fréquence de colonisation varie avec l'âge, les facteurs hormonaux, la race, le niveau socioéconomique et l'activité sexuelle. Elle peut atteindre près de 50 % au niveau vaginal pour *Ureaplasma* spp. mais reste inférieure à 10 % pour *M. hominis*. *M. genitalium* semble rarement présent à l'état commensal.

*M. genitalium* et *Ureaplasma* spp. sont des agents d'urétrites non gonococciques (UNG) non chlamydiennes, aiguës et chroniques. *M. genitalium* serait le deuxième agent d'UNG (environ 25 % des cas), derrière *Chlamydia trachomatis*. Ils provoquent des arthrites réactionnelles.

Chez la femme, le rôle des mycoplasmes est plus complexe (tableau 39.2) et peut se manifester à différents niveaux du tractus génital. *M. genitalium* est le seul mycoplasme responsable de cervicites. Les trois espèces sont des agents d'endométrites, mais seuls *M. hominis* et *M. genitalium* sont impliqués dans les salpingites.

*M. hominis* et *Ureaplasma* spp. sont mis en cause dans des troubles de la reproduction (fièvre postpartum, chorioamniotites), prématurité pour *Ureaplasma* spp. Des atteintes néonatales à types de pneumonies, de bactériémies et de méningites sont associées à ces deux espèces.

### Infections systémiques

Les mycoplasmes, surtout *M. hominis* et *Ureaplasma* spp., doivent être recherchés lors d'infections chez des immunodéprimés (arthrites septiques chez les hypogammaglobulinémiques, plaies sternales avec médiastinites après chirurgie thoracique, bactériémies, ostéomyélites, abcès rétropéritonéaux, surinfections d'hématomes). Habituellement de découverte fortuite, l'espèce en cause est le plus souvent, en dehors des arthrites, *M. hominis* qui pousse sur gélose au sang.

## Caractères généraux

De très petite taille, 300–850 nm, les mycoplasmes rencontrés chez l'homme sont polymorphes, coccoïdes ou filamenteux et ne sont pas colorables par le Gram.

Anaérobies facultatifs, ils exigent des milieux complexes, renfermant des stérols (à l'exception des *Acholeplasma*). Ils utilisent comme source principale d'énergie le métabolisme du glucose ou de l'arginine (genre *Mycoplasma* et *Acholeplasma*) ou de l'urée (genre *Ureaplasma*).

Leur croissance, relativement aisée pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* (environ 48 heures), est difficile et lente pour *M. pneumoniae* (6 à 20 jours) et encore davantage pour *M. genitalium*, espèce extrêmement fastidieuse et très rarement cultivée à partir d'échantillons cliniques. Leur croissance en milieu liquide se traduit par le virage d'un indicateur coloré. Sur gélose, ils donnent de petites colonies (50 à 300 µm) visibles à la loupe binoculaire, prenant pour certains un aspect en œuf sur le plat, en raison de la pénétration des mycoplasmes dans la gélose.

La séquence du génome est connue pour toutes les espèces pathogènes pour l'homme. *M. genitalium* a le plus petit génome bactérien connu (580 kpb).

*M. pneumoniae* et *M. genitalium* ont des communautés antigéniques. Il existe deux groupes de *M. pneumoniae* en fonction de la structure du gène de l'adhésine P1 et 14 sérovars chez *Ureaplasma* spp. L'hétérogénéité des souches de *M. hominis* n'a pas été étudiée.

## Diagnostic bactériologique direct

Le diagnostic direct est utilisable pour toutes les espèces mais avec des méthodes différentes. Culture et identification métabolique sont recommandées pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* à partir de prélèvements génitaux. Pour ces espèces, les méthodes moléculaires n'ont d'intérêt qu'à partir d'autres échantillons où ils sont difficiles à mettre en évidence.

La culture est plus rarement réalisée pour *M. pneumoniae* en raison des délais nécessaires. Elle est avantageusement remplacée par l'amplification génique.

**TABLEAU 39-2**

**Importance de l'association des mycoplasmes génitaux à différents tableaux cliniques (d'après Bébéar C, Bébéar CM. Infections humaines à mycoplasmes. *Revue Francophone des Laboratoires* 2007 ; 391 : 63–9).**

| *Pathologie* | *M. hominis* | *Ureaplasma spp.*[1] | *M. genitalium* |
|---|---|---|---|
| Infections génitales masculines | | | |
| – Urétrites non gonococciques | – | + | + |
| – Épididymites, prostatites | – | ± | ± |
| – Infertilité | – | ± | – |
| Infections gynécologiques | | | |
| – Vaginose bactérienne | ± | – | – |
| – Cervicites | – | – | + |
| – Endométrites | + | + | + |
| – Salpingites | + | – | + |
| Troubles de la reproduction | | | |
| – Chorioamniotites | + | + | – |
| – Fièvres, endométrites postpartum | + | + | – |
| – Avortement spontané | ± | ± | – |
| – Retard de croissance intra-utérin | – | ± | – |
| Atteintes néonatales | | | |
| – Prématurité – Faible poids de naissance | – | + | – |
| – Infections respiratoires, neurologiques, bactériémies, abcès | + | + | – |
| – Maladie pulmonaire chronique | – | ± | – |
| Infections extragénitales | | | |
| – Arthrites septiques | + | + | + |
| – Arthrites réactionnelles | – | + | + |
| – Pyélonéphrites | + | – | – |
| Autres localisations (surinfection de plaies sternales, abcès rétropéritonéaux, abcès du cerveau, septicémies, etc.) | + | + | – |

+ : Association certaine, rôle causal démontré ; ± : association significative mais rôle causal non démontré ; – : pas d'association.

[1] Comprend deux espèces, *U. urealyticum* et *U. parvum.*

Cette dernière est la seule utilisable en pratique pour *M. genitalium.*

## Prélèvements

Prélèvements de gorge et aspirations nasopharyngées chez le jeune enfant sont à préférer pour la recherche de *M. pneumoniae* en raison du caractère diffus de l'infection. Brossage bronchique et lavage bronchoalvéolaire sont également adaptés, contrairement aux expectorations, trop contaminées. Pour la culture, les prélèvements sur écouvillon seront mis en milieu de transport (milieu de culture pour mycoplasmes ou milieu 2SP, saccharose phosphate, contenant 5 % de sérum de veau fœtal mais

pas d'antibiotique, ou milieu de transport pour bactéries fragiles). Les prélèvements liquidiens sont ensemencés sans centrifugation. Les milieux peuvent être conservés à +4 °C pendant 48 heures et au-delà à –70 °C.

Les mycoplasmes génitaux peuvent être recherchés à partir de prélèvements urétraux, premier jet d'urine, plus rarement sperme et sécrétions prostatiques, prélèvements cervicovaginaux, endométriaux, biopsies, brossage tubaires, liquides amniotiques, placenta, prélèvements endotrachéaux chez le nouveau-né. Ces prélèvements sont mis dans des milieux de transport spécifiquement adaptés à la recherche d'*Ureaplasma* spp. ou de *M. hominis*, ou en milieu 2SP, et conservés à +4 °C ou à –70 °C comme précédemment.

En cas de PCR pour *M. pneumoniae* et *M. genitalium*, il n'est pas nécessaire d'utiliser des milieux de transport.

D'autres échantillons peuvent être étudiés. Les milieux pour hémocultures sont peu adaptés à la recherche de mycoplasmes en raison de la présence d'anticoagulants.

## Milieux de culture

Les milieux utilisés sont complexes. Ils renferment 20 % de sérum, de l'extrait de levure et sont rendus sélectifs par addition d'une β-lactamine et éventuellement d'autres inhibiteurs (annexe 39.1). Il faut utiliser des milieux liquides et gélosés. Les milieux liquides sont ensemencés en faisant des dilutions ($10^{-1}$ à $10^{-4}$) pour éliminer des inhibiteurs tissulaires et éventuellement faire une étude quantitative. Les milieux gélosés sont ensemencés en touche. L'incubation a lieu à 37 °C, de préférence sous $CO_2$.

Pour *M. pneumoniae*, milieu de Hayflick modifié et milieu SP-4 peuvent être utilisés. Les milieux liquides renferment glucose et rouge de phénol. La croissance se traduit par une acidification du milieu après 6 à 20 jours. Sur milieu gélosé, les colonies sont petites, granulaires.

*Ureaplasma* spp. et *M. hominis* poussent sur milieu de Shepard à pH 6. Le milieu renferme de l'urée utilisée par *Ureaplasma* spp. et du rouge de phénol. Milieu de Hayflick modifié et milieu SP-4 contenant de l'arginine conviennent à *M. hominis* mais pas à *Ureaplasma* spp. La croissance d'*Ureaplasma* spp. sur milieu liquide renfermant de l'urée se traduit par une alcalinisation en 18 à 24 heures. La croissance de *M. hominis* se traduit par une alcalinisation des milieux à l'arginine, en 48 heures. Une appréciation quantitative de la croissance permet de déterminer un nombre d'unités de changement de couleur (UCC)/ml. Sur milieu gélosé, les colonies d'*Ureaplasma* spp. sont irrégulières, très petites, d'où leur ancien nom de souche T (*tiny* : minuscule), brunes en présence de sulfate de manganèse, à ne pas confondre avec des cristallisations dans la gélose, et elles apparaissent en 2 à 4 jours. *M. hominis* donne en 2 à 4 jours des colonies en œuf sur le plat (fig. 39.1 à 39.3).

La croissance en milieu liquide doit toujours être contrôlée sur milieu gélosé pour éviter une confusion avec un virage d'indicateur coloré dû à la présence d'autres bactéries ou de cellules.

**ANNEXE 39.1**

### Composition des milieux de culture pour mycoplasmes

**Milieu sP-4**

- Base
  - Base bouillon *Mycoplasma* : 3,5 g
  - Tryptone : 10 g
  - Peptone : 5,3 g
  - Glucose : 5 g
- Suppléments stériles
  - Milieu CMRL 1066 sans (10 ×) sans glutamine sans $NaHCO_3$ : 50 ml
  - Glutamine (100 ×) : 5 ml
  - $NaHCO_3$ : 2,2 g
  - Extrait de levure : 5 g
  - Extrait aqueux de levure (solution 2 %) : 100 ml
  - Sérum de veau fœtal : 170 ml
  - Ampicilline : 0,5 g
  - Colimycine : 250 000 UI
  - Amphotéricine B : 5 mg
  - Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
  - pH : 7,6

**Milieu de Hayflick modifié**

- Bouillon d'infusion de cœur : 17,5 g
- Extrait de levure : 5 g
- Sérum de poulain : 200 ml
- Arginine ou glucose : 5 g
- Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
- Ampicilline : 0,5 g
- Colimycine : 250 000 UI
- Amphotéricine B : 5 mg
- Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
- pH : 7,4 pour milieux glucosés, 7,0 pour milieux avec arginine.

La composition du milieu gélosé est la même, sauf : absence d'arginine, glucose, rouge de phénol et présence d'agar purifié (10 g).

**Milieu de Shepard**

- Trypticase soja : 24 g
- Extrait de levure : 5 g
- Sérum de poulain : 200 ml
- Cystéine : 100 mg
- Urée : 600 mg
- Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
- Ampicilline : 0,5 g
- Colimycine : 250 000 UI
- Amphotéricine B : 5 mg
- Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
- pH : 6

La composition du milieu gélosé est la même sauf : absence de rouge de phénol, présence de sulfate de manganèse (150 mg), de putrescine (1,5 g) et d'agar purifié (10 g).

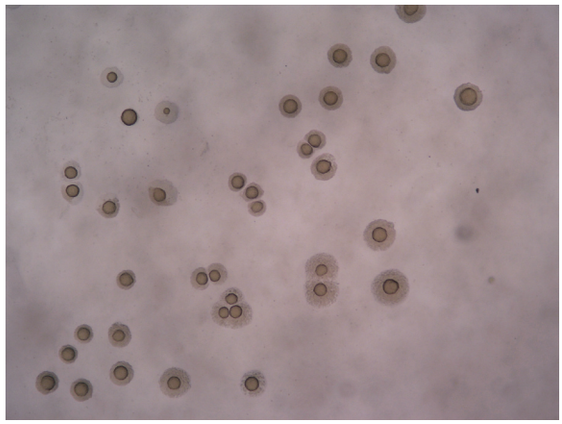


**Fig. 39.1.** – *Colonies de* M. hominis.

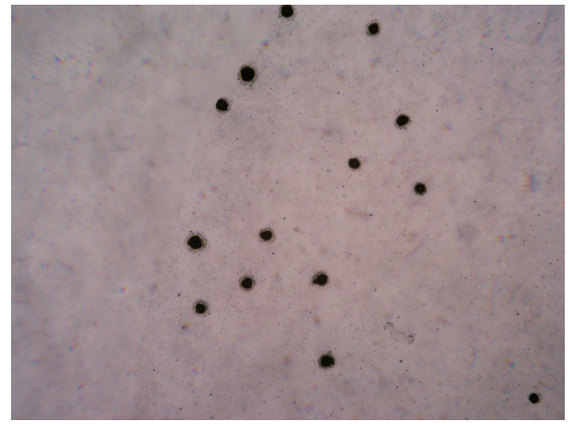


**Fig. 39.2.** – *Colonies d'*Ureaplasma *spp.*

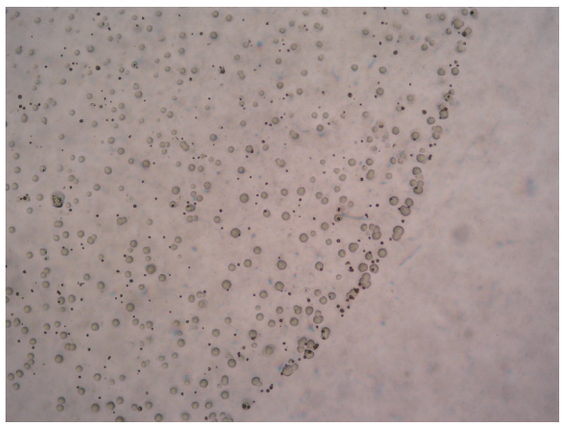


**Fig. 39.3.** – *Mélange* M. hominis *et* Ureaplasma spp. *(ensemencement en touche).*

Pour les espèces très fastidieuses, *M. genitalium* et *M. amphoriforme*, le milieu SP-4 enrichi en glucose est le plus adapté. Un passage en culture de cellules peut aider à la croissance de *M. genitalium*. Celle-ci reste exceptionnelle.

## Identification d'espèce

Selon les cas, l'identification d'espèce se fait sur les propriétés métaboliques, l'aspect des colonies ou l'amplification génique.

Pour *M. pneumoniae*, les propriétés métaboliques et les propriétés d'hémadsorption ou d'hémagglutination sont peu utilisées. La PCR permet de l'identifier et de le séparer de *M. genitalium* et de *M. amphoriforme.*

L'identification d'*Ureaplasma* spp. (hydrolyse de l'urée) et de *M. hominis* (hydrolyse de l'arginine) est simple. La séparation des deux espèces, *U. urealyticum* et *U. parvum*, réalisable par PCR, n'est pas faite en pratique courante.

## Kits

Différents kits destinés à la détection et à l'appréciation quantitative d'*Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* à partir de prélèvements génitaux sont disponibles.

Ces systèmes correspondent en général à des microplaques unitaires avec des cupules contenant des substrats lyophilisés et des inhibiteurs spécifiques des deux espèces. Les échantillons sont placés dans un milieu de suspension qui sert lui-même à ensemencer les cupules. La détection, l'identification et la numération des mycoplasmes sont fondées sur le changement de couleur des cupules témoignant de la croissance du mycoplasme en présence de substrat ou d'inhibiteur spécifiques. Certains systèmes permettent de déterminer, dans un même temps, la sensibilité de la souche de mycoplasme détectée aux antibiotiques.

Ces kits donnent globalement des résultats comparables aux méthodes standard de culture en milieu liquide ou gélosé, les rendant attractifs pour les laboratoires ne réalisant qu'occasionnellement le diagnostic des mycoplasmes urogénitaux. Des faux positifs sont décrits en cas de contamination du prélèvement par d'autres bactéries, conduisant à recommander, en cas de doute, la vérification de l'identification du mycoplasme par culture en milieu gélosé.

## Amplification génique

L'amplification génique remplace de plus en plus la culture pour *M. pneumoniae*. Plusieurs protocoles de PCR utilisant le gène de l'adhésine P1, de l'ARNr 16S, de la toxine CARDS sont disponibles. De nombreux kits de PCR en temps réel, multiplex ou non, sont commercialisés. La PCR peut être réalisée sur les différents prélèvements déjà cités, en particulier les prélèvements de gorge et les aspirations nasopharyngées. En cas d'épidémies, il est possible de typer *M. pneumoniae* par PCR-RFLP qui sépare deux groupes, ou d'utiliser la MLVA.

La PCR est la seule méthode permettant en pratique la détection de *M. genitalium*. Un kit multiplex de PCR en temps réel est depuis peu commercialisé.

Pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, la PCR n'a d'intérêt que pour les échantillons à partir desquels ils sont difficiles à cultiver, liquides ou biopsies articulaires par exemple.

### Interprétation

*M. pneumoniae* n'appartenant pas à la flore commensale, sa présence dans un échantillon respiratoire ou une autre localisation est un élément significatif.

La mise en évidence dans les voies génitales basses d'*Ureaplasma* spp. surtout, et à un moindre degré de *M. hominis*, est plus difficile à interpréter en raison de leur existence possible à l'état commensal. Une appréciation quantitative est proposée. Pour *Ureaplasma* spp. au cours d'une UNG, un chiffre $\geq 10^4$ UCC/ml dans un prélèvement urétral et $\geq 10^3$ UCC/ml pour un premier jet d'urines est significatif. La présence d'*Ureaplasma* spp. dans un prélèvement cervicovaginal est très difficile à interpréter. Celle de *M. hominis* en quantité $\geq 10^4$ UCC/ml est plus significative, évocatrice de vaginose ou d'une infection haute. Leur isolement dans un échantillon normalement stérile doit les faire considérer comme pathogènes. Chez le nouveau-né, la présence dans un prélèvement endotrachéal à un taux $\geq 10^4$ UCC/ml est plus significative que dans un prélèvement périphérique.

La mise en évidence de *M. genitalium* dans les UNG, cervicites ou prélèvements des voies génitales hautes doit le faire considérer comme pathogène et amener à le traiter.

La recherche de mycoplasmes ne doit pas être faite de façon isolée, mais être associée à la recherche d'autres pathogènes tels que *C. trachomatis* pour les infections génitales.

## Étude de la sensibilité aux antibiotiques

### Antibiotiques actifs, résistance naturelle

En raison de leur structure particulière, tous les mycoplasmes résistent aux β-lactamines et à tous les antibiotiques agissant sur la biosynthèse du peptidoglycane. Ils résistent également aux polymyxines, sulfamides, triméthoprime, acide nalidixique, rifampicine et linézolide.

Les antibiotiques actifs, utilisables en thérapeutique humaine, sont les tétracyclines, les macrolides-lincosamides-streptogramines-kétolides (MLSK) et les fluoroquinolones (tableau 39.3). Mis à part fluoroquinolones et les kétolides, les antibiotiques ont seulement un effet bactériostatique sur les mycoplasmes.

Il existe cependant une résistance naturelle aux MLSK, spécifique à certaines espèces. *M. pneumoniae* et *M. genitalium* sont sensibles aux MLSK, excepté à la lincomycine. *Ureaplasma* spp. est sensible aux MSK mais résiste aux lincosamides. À l'inverse, *M. hominis* résiste aux macrolides ayant un cycle à 14 et 15 chaînons et à la télithromycine, mais il est sensible aux lincosamides et à certains macrolides à 16 chaînons (josamycine et midécamycine) mais non à la spiramycine.

### Résistance acquise

La résistance acquise est due à l'existence de mutations ou à la présence de transposons, et est associée à des modifications de la cible des antibiotiques.

Surtout fréquente chez les mycoplasmes génitaux, *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, elle concerne en premier lieu les tétracyclines et est due à la présence du déterminant *tet(M)*. Elle concerne à Bordeaux près de 20 % des souches cliniques de *M. hominis* et 3 % d'*Ureaplasma* spp. Les résistances acquises aux fluoroquinolones et aux macrolides sont beaucoup plus rares chez ces espèces et sont observées chez des sujets immunodéprimés ayant reçu de nombreux traitements antibiotiques.

Très peu de souches cliniques de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides ont été décrites avant 2000. Une augmentation significative a été rapportée au Japon (40 % de souches résistantes publiées en 2008) et en Chine (90 % en 2009). Cette résistance atteint l'Amérique du Nord et l'Europe. Dix pour cent des souches étudiées en France entre 2005 et 2008 étaient résistantes aux macrolides. Liée à des mutations de la cible ribosomique ARNr 23S, il s'agit d'une résistance de type $MLS_B$ avec une augmentation des CMI variable selon la mutation en cause. Les résistances s'accompagnent d'échecs thérapeutiques.

La résistance acquise aux macrolides est en augmentation chez *M. genitalium*, entraînant des échecs thérapeutiques sous azithromycine (15 % des cas).

### Méthodes d'étude

La sensibilité des mycoplasmes génitaux, *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, doit être étudiée chaque fois qu'ils sont en situation pathogène ou dès qu'ils sont isolés de sites extra-génitaux, a fortiori chez des sujets immunodéprimés.

Les CMI peuvent être déterminées par dilution en milieu liquide ou gélosé adapté à l'espèce. L'antibiogramme par diffusion par la méthode des disques n'est pas utilisable mais l'E-test® a été adapté aux deux espèces.

Des recommandations concernant les méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes humains viennent d'être publiées par le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

Plusieurs kits étudiant la sensibilité aux antibiotiques de *M. hominis* et d'*Ureaplasma* spp. sont disponibles seuls ou complétant un kit de détection et d'identification de ces espèces. Leur principe repose sur l'inhibition métabolique de la croissance des mycoplasmes. Ils consistent en des rangées de puits contenant des antibiotiques lyophilisés à une ou deux concentrations, correspondant aux concentrations critiques utilisées pour classer les bactéries en sensibles, intermédiaires ou résistantes à l'antibiotique testé. Les résultats obtenus sont satisfaisants à la condition d'utiliser un inoculum contrôlé, le plus souvent après une primoculture.

**TABLEAU 39-3**

**CMI (mg/l) des principaux antibiotiques potentiellement actifs vis-à-vis des mycoplasmes pathogènes pour l'homme (adapté d'après Bébéar CM. Mycoplasma et Ureaplasma. In : *L'Antibiogramme*, 3e ed. Paris : ESKA, sous presse).**

| *Antibiotique* | *M. pneumoniae* | *M. genitalium* | *M. hominis* | *Ureaplasma* spp. |
|---|---|---|---|---|
| Tétracycline | 0,63–0,25 | 0,06–0,12 | 0,2–2 | 0,05–2 |
| Doxycycline | 0,02–0,5 | ≤ 0,01–0,3 | 0,03–2 | 0,02–1 |
| Érythromycine | ≤ 0,004–0,06 | ≤ 0,01 | 32 – >1000 | 0,02–4 |
| Azithromycine | ≤ 0,004–0,01 | ≤ 0,01–0,03 | 4–> 64 | 0,06–0,5 |
| Josamycine | ≤ 0,01–0,02 | 0,01–0,02 | 0,05–2 | 0,03–4 |
| Spiramycine | ≤ 0,01–0,25 | 0,12–1 | 32–> 64 | 4–32 |
| Clindamycine | ≤ 0,008–2 | 0,2–1 | ≤ 0,008–2 | 0,2–64 |
| Lincomycine | 4–8 | 1–8 | 0,2–4 | 8–256 |
| Pristinamycine | 0,02–0,05 | ND | 0,1–0,5 | 0,1–1 |
| Télithromycine | 0,0002–0,06 | ≤ 0,015 | 2–32 | ≤ 0,015–0,25 |
| Ciprofloxacine | 0,5–2 | 2 | 0,5–4 | 0,1–4 |
| Ofloxacine | 0,05–2 | 1–2 | 0,5–4 | 0,2–4 |
| Lévofloxacine | 0,5–1 | 0,5–1 | ≤ 0,008–0,5 | 0,12–2 |
| Moxifloxacine | 0,06–0,3 | 0,03 | 0,06 | 0,12–0,5 |
| Chloramphénicol | 2–10 | 0,5–25 | 4–25 | 0,4–8 |
| Gentamicine | 4 | ND | 2–16 | 0,1–13 |
| Linézolide | 64–256 | ND | 2–8 | > 64 |

ND : non déterminé.

Devant l'augmentation de fréquence de la résistance aux macrolides chez *M. pneumoniae*, une surveillance épidémiologique est nécessaire. Elle peut se faire par PCR en temps réel directement à partir de prélèvements respiratoires.

## Sérologies

Ce sont les méthodes les plus utilisées pour le diagnostic d'infection à *M. pneumoniae*. La présence d'agglutinines froides (≥ 64) n'est ni constante ni spécifique.

La réaction de fixation du complément détecte IgG et IgM. Bien que peu sensible, c'est un critère d'appréciation toujours valable, à condition d'avoir une séroconversion ou un taux minimal présomptif de 64.

Parmi les autres techniques disponibles, les techniques ELISA sont les plus employées. Elles permettent de détecter séparément IgM, IgG et IgA. La recherche d'IgM est très utile chez l'enfant et l'adolescent. Le titre seuil des IgG est variable selon les trousses et difficile à déterminer. Compte tenu de leur présence à l'état commensal, aucun test sérologique n'a pu montrer, en pratique courante, de résultat satisfaisant dans le diagnostic des infections génitales à *Ureaplasma* spp. ou *M. hominis*. Aucun test n'est commercialisé pour *M. genitalium*.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Bébéar CM. *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. In : L'Antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; sous presse.

Bébéar C, Bébéar CM. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires 2007 ; 391 : 63–9.

REMIC. Référentiel en microbiologie médicale. Société française de microbiologie. 4e éd. 2010. p. 255–60 [chapter 41, *Mycoplasma* spp].

Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE. Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. In : Nolte FS, editor. Cumitech 34 of American Society for Microbiology. Washington : ASM Press ; 2001. p. 1–30.

Waites KB, Talkington D. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 2004 ; 17 : 697–728.

Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev 2005 ; 18 : 757–89.

Waites KB, Bade DJ, Bébéar C, et al. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas : Approved guideline. Wayne (PA) : Clinical and Laboratory Standards Institute ; In press. Document M43-P.

**ADRESSE UTILE**

Il n'existe pas de Centre national de référence pour les mycoplasmes. L'USC Infections humaines à mycoplasmes et à *Chlamydiae* INRA-Université Bordeaux Segalen du Pr Cécile Bébéar est un laboratoire expert dans le domaine

CHAPITRE

# 40 Bactéries cytoparasites obligatoires

## Chapitre 40.1

# *Chlamydia*

B. de Barbeyrac

## Introduction

Les *Chlamydia* sont des eubactéries à développement intracellulaire obligatoire formant une inclusion intracytoplasmique caractéristique. Deux espèces sont spécifiquement humaines, *C. trachomatis*, responsable d'infections oculaires et génitales, *C. pneumoniae,* responsable d'infections respiratoires. Certaines sont pathogènes chez l'animal mais peuvent, comme *C. psittaci,* occasionnellement provoquer des infections chez l'homme. *C. trachomatis* est en France le principal agent bactérien responsable d'infections sexuellement transmissibles (IST). Le caractère paucisymptomatique de l'infection urogénitale est à l'origine de la dissémination et des complications observées chez la femme jeune telles que les salpingites et les grossesses extra-utérines. Sa responsabilité dans le trachome et dans les IST en fait un agent prioritaire dans les problèmes de santé publique. *C. pneumoniae* est probablement un des principaux agents responsables de pneumopathie atypique communautaire le plus souvent bénigne. L'évolution souvent chronique de l'infection à *Chlamydia* soulève la question de la persistance du micro-organisme.

## Taxonomie

La famille des *Chlamydiaceae* comprend deux genres, *Chlamydia* et *Chlamydophila*, et 9 espèces (fig. 40.1.1). Le genre *Chlamydia* comprend trois espèces, l'une spécifiquement humaine *C. trachomatis*, et deux rencontrées chez l'animal, *C. muridarum* et *C. suis*. L'espèce *C. trachomatis* est divisée en deux biovars, trachoma et lymphogranuloma venereum (LGV) et 19 sérovars. Le biovar trachoma comprend 14 sérovars : A, B, Ba et C (impliqués dans le trachome), D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J et K (impliqués dans les infections oculaires et génitales), et le biovar LGV comprend 4 sérovars, L1, L2, L2a et L3. Ces sérovars ont été définis d'après la réactivité d'anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes portés par la protéine majeure de membrane externe appelée MOMP (*major outer membrane protein*).

Le genre *Chlamydophila* regroupe 6 espèces. *Chlamydophila pneumoniae* a été isolée chez l'homme, mais aussi le koala et le cheval. Suivant la spécificité d'hôte, les souches ont été regroupées en trois biovars, TWAR, spécifiquement humain, et Koala et Équine. Les

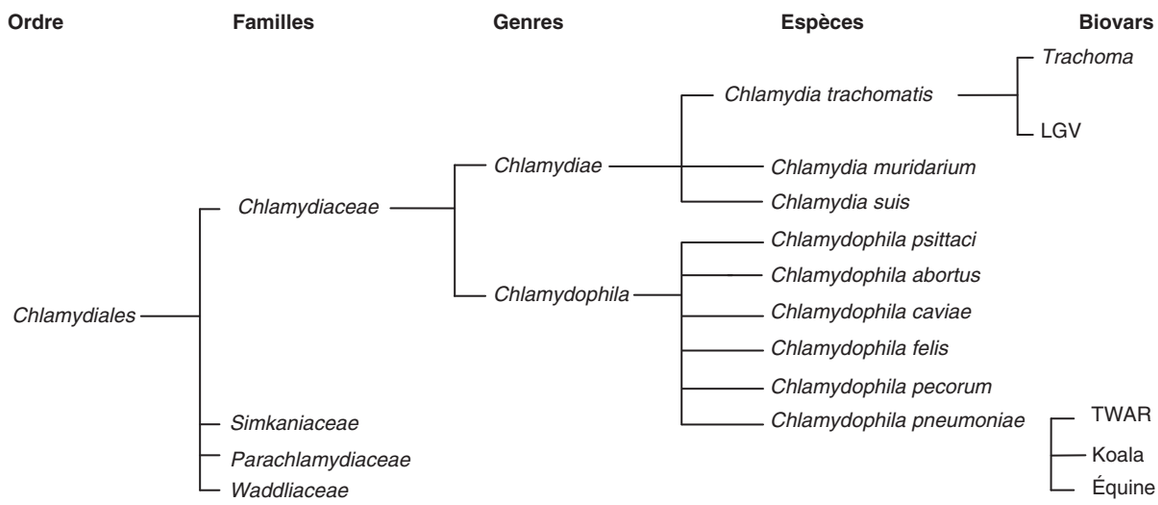



**Fig. 40.1.1.** – *Classification de la famille des* Chlamydiaceae.

autres espèces sont isolées chez l'animal. *C. pecorum* est isolée des mammifères sans spécificité d'hôte, ruminants, marsupiaux, et porc. *C. psittaci* regroupe les souches aviaires. *C. abortus*, *C. felis* et *C. caviae* regroupent des souches responsables d'avortement, les souches isolées du chat et du cochon d'Inde respectivement.

Cependant, cette classification est en cours de révision et le genre *Chlamydophila* devrait disparaître pour ne laisser qu'un seul genre, *Chlamydia.*

## Caractéristiques biologiques des *Chlamydia*

La bactérie existe essentiellement sous deux formes, le corps élémentaire (CE) et le corps réticulé (CR). Le CE adapté au transit extracellulaire est incapable de se multiplier et constitue la forme infectieuse. Le CR, adapté au milieu intracellulaire, est non infectieux et constitue la forme métaboliquement active de la bactérie.

### *Structure du corps élémentaire*

De forme sphérique, le CE est de petite taille (200 à 400 nm de diamètre), limité par une membrane cytoplasmique et par une paroi proche de celle des bactéries à Gram négatif, composée d'une membrane interne et d'une membrane externe contenant du LPS semblable à celui des bacilles à Gram négatif. Cependant, une caractéristique remarquable de la paroi du CE est l'absence de peptidoglycane.

La membrane externe comprend plusieurs protéines riches en résidus cystéine dont la MOMP de poids moléculaire de 40 kDa. Ces protéines assurent la rigidité de la membrane. Chez *C. trachomatis*, la MOMP est un puissant immunogène et elle porte les épitopes spécifiques de sérovars. Le séquençage du génome a permis d'identifier une nouvelle famille de protéines de membrane, appelée POMP (*polymorphic outer membrane protein*). Ces protéines seraient douées de variations antigéniques en réponse à une pression immunologique, variations jouant probablement un rôle dans le phénomène de persistance.

À côté de ces protéines riches en cystéine, il existe d'autres protéines désignées d'après leur masse moléculaire comme les protéines de stress hsp 60 et hsp 70.

### *Caractéristiques génomiques*

La séquence du génome de *C. trachomatis* (1045 kb) et celle de *C. pneumoniae* (1230 kb) sont disponibles. L'analyse de ces séquences remet en cause certaines notions bien établies comme l'absence de peptidoglycane et l'exigence obligatoire en ATP. La totalité des gènes nécessaires à la synthèse du peptidoglycane (PG) et plusieurs ATPases ont été identifiés. Le rôle des gènes du PG dans la biologie des *Chlamydia* n'est pas élucidé.

L'analyse des séquences a révélé d'autres points importants comme l'abondance des systèmes de transport, la présence d'une famille de protéines nommées POMP citée plus haut, et des gènes codant pour un système de sécrétion type III (SSTT). Ces gènes joueraient un rôle clé dans les échanges entre la cellule et la bactérie.

La présence d'un plasmide cryptique a été démontrée dans presque toutes les souches de *C. trachomatis* et certaines souches de *C. psittaci*, alors qu'aucun plasmide n'a pu être mis en évidence chez C. *pneumoniae*. L'identification de souches cliniques de *C. trachomatis* dépourvues de ce plasmide montre qu'il n'est pas nécessaire au développement et au caractère infectieux de la bactérie. Ce plasmide est séquencé et comprend 7493 pb. Une souche délétée de 377 pb sur le plasmide a été responsable d'une épidémie en Suède en 2006–2007 du fait qu'elle n'était pas détectée par les techniques moléculaires ciblant précisément cette zone. Cela montre l'instabilité des gènes sur les plasmides et le risque de les utiliser dans les techniques de détection. La leçon que les industriels ont retenu est qu'il est nécessaire d'utiliser deux cibles pour un même micro-organisme pour éviter ce genre d'incident.

### *Cycle de développement*

Le cycle de développement est identique quelle que soit l'espèce malgré quelques différences de morphologie entre les inclusions. Le cycle peut être divisé en plusieurs étapes (fig. 40.1.2) :

1. attachement initial du CE à la cellule hôte ;
2. entrée dans la cellule hôte ;
3. différenciation des CE en CR et multiplication des CR ;
4. différenciation des CR en CE ;
5. relargage des CE. Le mécanisme le plus important de relargage des CE infectieux est probablement la lyse de la cellule.

Deux caractéristiques sont à noter : premièrement, la cellule hôte de type épithélial n'est pas un phagocyte professionnel, et deuxièmement, l'internalisation s'achève par la formation d'une inclusion dans le cytoplasme de la cellule hôte (fig. 40.1.3).

### *Altération du cycle de développement : notion de persistance*

Dans certaines conditions, le cycle de développement est altéré, le CR ne se transforme pas en CE mais persiste dans une forme altérée, appelée corps aberrant. Le terme de persistance correspond à une association bactérie–hôte dans laquelle la bactérie est viable mais non cultivable.

In vitro, des facteurs induisant la persistance ont pu être identifiés. Il s'agit d'antibiotiques comme la pénicilline G, de facteurs d'ordre nutritionnel comme une déplétion en cystéine et immunitaire comme la présence d'interféron gamma (IFNγ) et le développement dans des cellules non permissives, monocytes, cellules synoviales.

In vivo, les implications sont importantes et contribueraient à l'immunopathogénicité de la maladie oculaire et génitale. Cette notion de persistance a des conséquences sur le diagnostic et le traitement. Les outils de diagnostic permettent généralement de mettre en évidence la

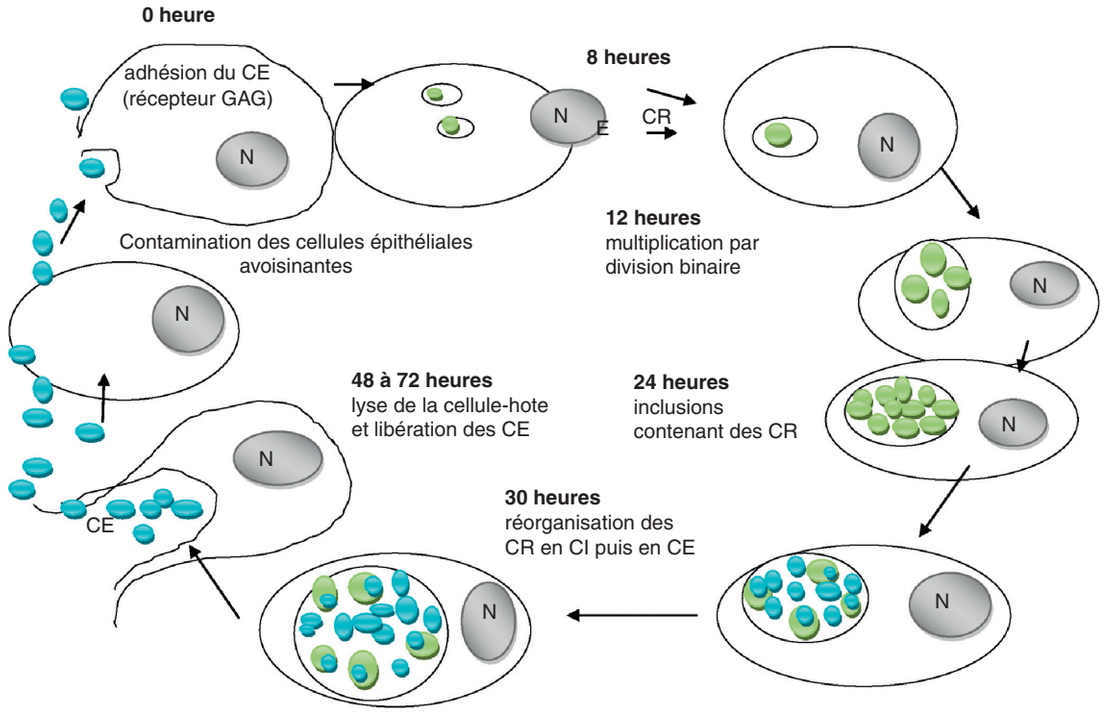



**Fig. 40.1.2.** – *Cycle de développement des* Chlamydia.
CE : corps élémentaires ; CI : corps intermédiaire ; CR : corps réticulé.

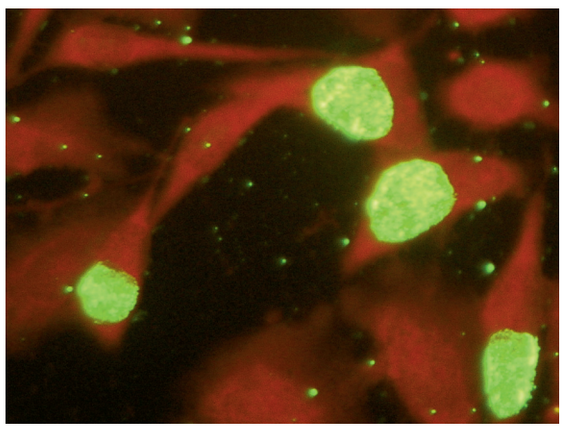


**Fig. 40.1.3.** – *Tapis cellulaire infecté par* C. trachomatis *après 48 heures d'incubation.*
Les inclusions apparaissent vertes fluorescentes après coloration par un anticorps monoclonal anti-MOMP fluorescent (objectif × 100). Les points verts fluorescents sont des CE extracellulaires.

bactérie dans sa forme normale et cultivable et non dans cette forme aberrante. Seules les techniques de biologie moléculaire permettent d'identifier la bactérie et de poser le diagnostic. Concernant le traitement, les formes persistantes ne répondent pas aussi bien aux antibiotiques que les formes normales. En effet, les formes persistantes contiennent des taux réduits de MOMP, d'où une diminution du transport des antibiotiques. De plus, la persistance est une réponse au stress et ces réponses sont connues pour induire une moindre sensibilité aux antibiotiques des bactéries.

## *Pouvoir pathogène* (tableau 40.1.1)

### C. trachomatis

#### Trachome

Le trachome est une maladie infectieuse des yeux qui peut provoquer une cécité après des réinfections répétées. Il s'agit de la principale cause de cécité évitable au niveau mondial, et la maladie survient là où les gens vivent dans des conditions de surpeuplement avec un accès limité à l'eau et aux soins de santé. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 6 millions de personnes dans le monde sont aveugles du fait du trachome et que plus de 150 millions de personnes ont besoin d'un traitement. Le trachome cécitant est répandu au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et subsaharienne, dans des parties du sous-continent indien, en Asie du Sud et en Chine. On trouve des poches de trachome cécitant en Amérique latine, aux Mexique, en Australie et dans les îles du Pacifique. Il est dû aux sérovars A, B, Ba et C. L'homme est le seul réservoir et la transmission se fait à partir du réservoir familial par les mains sales, les poussières véhiculées par le vent et les mouches.

TABLEAU 40-1-1

**Pouvoir pathogène de C. trachomatis.**

| *Sérovars* | *Spécialités* | *Pathologies* | *Transmission* |
|---|---|---|---|
| A, B, Ba, C | Ophtalmologie | Trachome | Indirecte |
| D, K | Ophtalmologie | Conjonctivite de l'adulte | Indirecte |
| | Pédiatrie | Pneumopathie<br>Conjonctivite | Relation mère–enfant |
| | Rhumatologie | Arthrite réactionnelle<br>Syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter | Relations sexuelles |
| | Gynécologie/urologie | Infection génitale basse et haute<br>F : cervicite, endométrite, salpingite, périhépatite<br>H : urétrite, épididymite | Relations sexuelles |
| | Gastro-entérologie | Rectite, ulcération génitale | Relations sexuelles |
| L1, L2, L3 | Gastro-entérologie | Lymphogranulomatose vénérienne<br>F et H : rectite, ulcération génitale | Relations sexuelles |

L'OMS a adopté la stratégie CHANCE pour combattre le trachome (*Ch*irurgie, *A*ntibiothérapie, *N*ettoyage du visage, *C*hanger l'*E*nvironnement).

Le trachome est une kératoconjonctivite chronique, contagieuse, caractérisée par la formation de follicules, puis les vaisseaux sanguins du limbe envahissent la cornée, réalisant le pannus. L'évolution peut se faire spontanément vers la guérison mais, en zone d'endémie, les réinfestations successives aggravent le pannus et l'évolution se fait vers un stade cicatriciel avec déformation du tarse et incurvation de la paupière (entropion), et vers la cécité par formation de travées fibreuses.

## Infections sexuellement transmissibles (IST)

### *Lymphogranulomatose vénérienne (LGV) ou maladie de Nicolas-Favre*

La LGV est une IST, très répandue dans les régions tropicales, plus rare dans les pays industrialisés où elle atteint essentiellement les homosexuels masculins, les prostituées ou les voyageurs de retour de zone d'endémie. Elle est due aux sérovars L1, L2, L2a et L3 de *C. trachomatis* qui possèdent un tropisme réticulo-endothélial et ganglionnaire.

Une recrudescence de l'infection anorectale chez les homosexuels est en cours en Europe et en France, notamment chez les patients séropositifs pour le VIH. Les souches circulantes sont de type L2. Entre 2002 et 2010, le Centre national de référence (CNR) a typé 1576 échantillons anorectaux, comptabilisé 1081 cas de LGV et 495 d'infections rectales à souche non L.

La symptomatologie de la LGV est assez riche, sensiblement différente selon le sexe et attribuable à l'atteinte lymphatique et ganglionnaire. La maladie débute par un chancre génital, 1 à 3 semaines après le contage, qui passe inaperçu dans plus de 50 % des cas. L'existence d'un chancre étant exceptionnellement un motif de consultation, la LGV est révélée par deux tableaux cliniques : l'adénite inguinale et la rectite aiguë. Dans le cas de la LGV rectale, les symptômes sont essentiellement des douleurs rectales, avec un écoulement anal et un ténesme.

### *Infections urogénitales (sérovars D à K)*

Les infections à *C. trachomatis* chez l'homme et la femme ont une répartition mondiale.

L'infection à *C. trachomatis* est la plus fréquente des IST bactériennes rapportées en Europe. En 2009, 343 958 cas ont été rapportés dans 23 pays de l'Union européenne, correspondant à 185 cas/100 000 habitants, plus fréquemment chez la femme (217 cas/100 000) que chez l'homme (152/100 000) (voir www.ecdc.europa.eu). Du fait du caractère paucisymptomatique de l'infection urogénitale, l'infection peut rester méconnue. Non traitée, elle peut être à l'origine de complications telles que stérilité et grossesse extra-utérine. Le coût annuel des infections à *C. trachomatis* et de leurs séquelles est estimé à plus de 2 milliards de dollars aux États-Unis.

L'incidence des infections génitales est variable suivant les populations, l'activité sexuelle et l'âge. Les facteurs de risque de l'acquisition d'une infection à *C. trachomatis* incluent l'âge inférieur à 25 ans chez la femme, 30 ans chez l'homme, la multiplicité des partenaires sexuels, un nouveau partenaire, le célibat, la non-utilisation de préservatifs et l'utilisation de contraceptifs oraux. En France, le réseau de surveillance des laboratoires RENACHLA donne des chiffres de l'ordre de 5 %. Le taux de prévalence en médecine préventive universitaire et en centre de planification est de 3 % et 7 à 10 % respectivement. En France, les résultats de l'enquête Natchla montrent que la prévalence chez les personnes âgées de 18 à 44 ans était de 1,4 % chez l'homme et de 1,6 % chez la femme. Cette prévalence est plus élevée chez les 18–29 ans (hommes : 2,5 % [IC 95 % : 1,2–5,0], femmes : 3,2 % [IC 95 % : 2,0–5,3]). Le facteur de risque commun à tous les 18–29 ans est le fait d'avoir eu récemment un partenaire occasionnel.

Chez l'homme, l'infection à *C. trachomatis* représente la cause principale des urétrites non gonococciques (UNG) et postgonococciques. Dans la majorité des cas, elle se présente comme une urétrite subaiguë avec un écoulement peu abondant, séreux, spontané ou provoqué à la pression du canal urétral, se limitant parfois à une simple goutte matinale. La période d'incubation peut aller de 48 heures à plus de 2 mois (12 à 16 jours en moyenne) après le contact infectant.

Chez la femme, l'infection réalise le plus souvent une cervicite, asymptomatique. L'infection est souvent de découverte fortuite lors d'un bilan gynécologique systématique ou à l'occasion d'une consultation motivée par l'apparition d'une urétrite chez le partenaire. La cervicite varie dans son intensité. Le col est souvent œdématié, congestif et friable. Cette localisation cervicale peut s'accompagner d'une localisation urétrale sans pour autant entraîner des symptômes à type d'urétrite ou dysurie. Une leucocyturie amicrobienne isolée doit faire évoquer une infection à *Chlamydia.*

Cette infection peut disséminer au haut appareil génital et donner une endométrite, une salpingite voire un syndrome de Fitz-Hugh-Curtis. Stérilité et grossesse extra-utérine sont les complications redoutées de ces infections hautes.

### *Infections à localisation extragénitale (sérovars D à K)*

Chez l'homme et la femme, *C. trachomatis* est responsable de conjonctivite par auto-inoculation à partir d'un foyer génital. L'infection peut disséminer et donner un tableau de Fiessenger-Leroy-Reiter associant urétrite, arthrite et conjonctivite.

Le nouveau-né acquiert *C. trachomatis* principalement lors du passage de la filière génitale à partir de l'infection cervicale maternelle. Le taux de contamination du nouveau-né à la naissance est élevé, de 50 à 70 %. Parmi les nouveau-nés contaminés, plus de 50 % présentent une conjonctivite, environ 20 % une pneumopathie et les autres restent asymptomatiques.

En cas de pneumopathie, les enfants présentent une toux persistante, sèche, devenant coqueluchoïde, sans fièvre, et une discrète altération de l'état général. Il peut s'installer une dyspnée de type polypnée avec cyanose, et parfois une tachycardie. La pneumonie peut être grave, avec détresse respiratoire, hypoxémie et apnées.

## C. pneumoniae

### *Infections respiratoires*

Le seul réservoir de *C. pneumoniae* biovar TWAR est humain et la transmission se fait de personne à personne par voie aérienne. L'infection se propage par les sujets infectés, mais aussi par les porteurs asymptomatiques. *C. pneumoniae* est un des agents infectieux les plus répandus ; la répartition de l'infection est mondiale. Le pic de séroconversion se situe entre 5 et 14 ans et la séroprévalence continue d'augmenter chez l'adulte pour atteindre 75 % chez les personnes âgées. Étant donné que la primo-infection induit une réponse immunitaire pendant un temps limité (3 à 5 ans), ce taux de prévalence élevé suggère que la plupart des gens sont réinfectés tout au long de leur vie. *C. pneumoniae* représenterait jusqu'à 10 % de l'étiologie des pneumopathies communautaires.

La maladie commence généralement par une pharyngite avant d'évoluer vers une bronchite ou une pneumonie, mais reste le plus souvent asymptomatique ou paucisymptomatique.

### *Maladie coronarienne*

Les mécanismes de l'athérosclérose sont encore débattus. La théorie dominante considère la plaque comme un foyer inflammatoire chronique. L'approche inflammatoire revient à poser la question de l'agresseur.

C'est en 1988 qu'une étude sérologique met en évidence une association entre *C. pneumoniae* et l'infarctus du myocarde. Depuis, *C. pneumoniae* a été détectée dans les lésions athéromateuses coronariennes par PCR, immunofluorescence directe et/ou microscopie électronique dans plus d'une trentaine d'études. L'isolement de *C. pneumoniae* est exceptionnel et cinq études rapportent des cultures positives (26 souches) à partir d'artères coronaires.

Les modèles cellulaires et expérimentaux apportent les arguments les plus convaincants. Cependant, les essais thérapeutiques n'ont pas donné les résultats bénéfiques escomptés. Les résultats négatifs de ces études ne permettent pas d'exclure totalement l'hypothèse infectieuse. Il est possible que les modalités de traitement, doses, rythme, durée, ne soient pas efficaces, d'autant plus que *C. pneumoniae* infectant les monocytes semble insensible aux antibiotiques. Dans l'état actuel des connaissances, les antibiotiques ne semblent pas avoir leur place dans le traitement de la maladie coronaire.

### *Asthme*

Les différentes études sur l'association entre l'infection à *C. pneumoniae* et l'exacerbation de l'asthme chez l'enfant et l'adulte donnent des résultats contradictoires, probablement liés aux difficultés diagnostiques de l'infection à *C. pneumoniae*.

## C. psittaci

Les infections humaines, appelées ornithose-psittacose, sont relativement rares et sont acquises par contact avec des oiseaux, plus rarement avec des mammifères. L'homme peut se contaminer auprès des oiseaux malades ou porteurs sains, le plus souvent par l'intermédiaire de poussières infectantes, exceptionnellement par morsure de chats infectés ou de brebis pendant la période d'agnelage, ou encore par manipulation de souches de *C. psittaci* dans les laboratoires.

Chez l'homme, la maladie débute brutalement après 1 à 2 semaines d'incubation et peut aller d'une forme pseudogrippale à une pneumopathie sévère voire mortelle. La fièvre est souvent présente, accompagnée d'une toux sèche non productive. La psittacose peut être une maladie professionnelle mais elle n'est pas à déclaration obligatoire.

Devant l'absence de données d'incidence de la psittacose en France et le peu de données actuellement disponibles chez l'animal, la gravité potentielle de la maladie chez l'homme et la persistance d'épisodes épidémiques dans divers contextes professionnels avicoles, une étude descriptive et prospective de la psittacose a été mise en place en 2008 et 2009 dans 16 départements du Sud-Ouest et de l'Ouest de la France de cinq régions : Bretagne (Ille-et-Vilaine, Côtes d'Armor, Finistère, Morbihan) ; Pays-de-la-Loire (Loire-Atlantique, Mayenne, Sarthe, Maine-et-Loire, Vendée) ; Poitou-Charentes (Deux-Sèvres) ; Aquitaine (Dordogne, Landes, Lot-et-Garonne, Pyrénées-Atlantiques) ; Midi-Pyrénées (Gers, Hautes-Pyrénées). Les principaux objectifs étaient d'estimer l'incidence des cas de psittacose humaine hospitalisés, de repérer les cas groupés, de décrire les expositions des cas et d'étudier la faisabilité d'un système de surveillance de la psittacose (www.invs.sante.fr/surveillance/psittacose/index.htm). Parmi les 115 cas suspects investigués, 54 (47 %) ont été classés psittacose dont 29 en psittacose confirmée, 8 en psittacose probable, et 17 en psittacose possible. Suite aux investigations conduites autour des cas groupés en milieux professionnels et amateurs, des recommandations ont été proposées au niveau individuel (information, protection par le port de masque, de gants, de blouse de travail, hygiène des mains, etc.) et collectif (campagne de sensibilisations des professionnels de santé, investigations vétérinaires, aménagement des locaux, etc.).

## Diagnostic bactériologique direct

Les méthodes de diagnostic direct des infections à *Chlamydia* varient en fonction de l'espèce. L'isolement par culture cellulaire, qui exige un équipement particulier, reste la méthode de référence, mais son manque de sensibilité n'en fait pas une bonne méthode de routine. Pour *C. trachomatis*, il existe un grand nombre de tests commercialisés autres que la culture. Pour *C. pneumoniae*, comme pour *C. psittaci*, il n'existe pas de techniques simples de détection directe et la sérologie reste l'élément clé du diagnostic.

### Prélèvements

Dans le cadre de l'infection génitale, *C. trachomatis* peut être recherchée à partir de prélèvements urétraux, premier jet d'urine ou rectaux chez l'homme, prélèvements endocervicaux, vaginaux (autoprélèvements) ou prélèvements de la sphère génitale haute chez la femme, ulcérations génitales ou biopsies ganglionnaires chez l'homme et la femme.

Chez le nouveau-né, *C. trachomatis* peut être recherchée dans les prélèvements conjonctivaux et respiratoires.

Dans le cadre du trachome, le prélèvement est fait par grattage de la conjonctive supérieure au niveau des follicules.

Dans le cadre de l'infection respiratoire, *C. pneumoniae* et *C. psittaci* peuvent être recherchées dans les prélèvements de gorge, expectorations, mais aussi lavage bronchoalvéolaire et liquide pleural.

### Milieux de transport

Seule la culture exige des conditions strictes de transport, délai et température, de manière à ne pas affecter la viabilité de la bactérie. *C. pneumoniae* est l'organisme le plus fragile, *C. trachomatis* est moins fragile et *C. psittaci* est très stable puisqu'il peut même persister dans les poussières contaminées pendant des mois sans perdre sa vitalité.

Les milieux de transport et les conditions de transport du prélèvement sont adaptés à la technique de détection. Pour la recherche par culture, le milieu le plus utilisé est le milieu saccharose-phosphate (2SP). La détection par les méthodes d'amplification peut être réalisée sur écouvillon sec sans milieu de transport, conservé à température ordinaire.

### Techniques de diagnostic

Les tests de biologie moléculaire avec amplification génique ont nettement amélioré la qualité des résultats en termes de sensibilité et de spécificité, et doivent remplacer toutes les autres techniques (culture cellulaire, tests antigéniques, hybridation moléculaire sans amplification). La nomenclature des actes de biologie médicale vient d'être modifiée en ce sens et n'autorise le remboursement de la détection de *C. trachomatis* que par la recherche d'ADN ou d'ARN par amplification génique in vitro sur tout type d'échantillons à partir de sites possiblement infectés. De nombreux systèmes de détection de *C. trachomatis* par amplification génique sont disponibles sur le marché français. La plateforme Cobas 4800® (Roche) présente d'excellentes performances, notamment sur les urines. Des essais comparatifs avec le système Abbott m2000® montrent un taux de concordance de 99,7 %, avec les systèmes Gen-Probe AC2® et BD ProbeTec Viper®, des taux de concordance de 98 et 98,3 % respectivement sur les urines masculines, et de 98,8 et 99,2 % respectivement sur les écouvillons endocervicaux. Tous ces automates sont équipés d'un extracteur et d'un amplificateur permettant de réaliser des séries plus ou moins importantes avec une parfaite robustesse et traçabilité. Ils présentent tous l'avantage de détecter simultanément *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. La société Bio-Rad vient de commercialiser un système de PCR en temps réel triplex permettant de détecter simultanément, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*, et dont les performances se sont révélées excellentes. Ce système ne dispose pas d'extracteur. L'utilisation croissante de ces outils devrait permettre un meilleur dépistage des IST bactériennes et donc une meilleure prise en charge des personnes infectées, et rompre la chaîne de transmission.

La détection directe de *C. pneumoniae* est difficile. Des systèmes de PCR en temps réel sont publiés, mais il n'existe aucun consensus sur le choix des amorces et des mises au point sont encore nécessaires. Un résultat de PCR positif à *C. pneumoniae* doit être interprété avec prudence et confronté aux données cliniques et biologiques, notamment sérologiques, étant donné la possibilité de portage asymptomatique et de persistance de la bactérie.

Dans le cas de *C. psittaci*, il n'existe pas de système commercialisé et le diagnostic par amplification génique est limité aux laboratoires utilisant un système maison. C'est pourquoi le moyen diagnostique le plus couramment utilisé demeure le sérodiagnostic.

## Sérodiagnostic

Le sérodiagnostic consiste en la mise en évidence des anticorps circulants. Au cours d'une infection à *Chlamydia*, la réponse anticorps est complexe et fait intervenir des anticorps spécifiques de genres, d'espèces et de sérovars.

La technique de référence reste la micro-immunofluorescence (MIF) utilisant des suspensions de CE et de CR cultivés sur œuf de chacun des sérovars de *C. trachomatis* et des souches de *C. psittaci* et *C. pneumoniae.* Cette technique différencie et titre toutes les classes d'immunoglobulines humaines ou spécifiquement les anticorps de la classe IgG, IgA ou IgM (fig. 40.1.4).

Les techniques immuno-enzymatiques utilisent pour *C. trachomatis* soit des peptides spécifiques de MOMP, soit une fraction de LPS sous forme recombinante ; et pour *C. pneumoniae*, un broyat de bactéries fixé sur les puits d'une microplaque. Ces techniques ont l'avantage d'être rapides, automatisées et de lecture objective. Cependant, l'appréciation quantitative n'est pas bien codifiée.

D'une manière générale, la recherche d'anticorps anti-*Chlamydia* n'a pas la même valeur diagnostique que la mise en évidence de la bactérie. D'une part, en raison des communautés antigéniques qui existent entre les trois espèces, et d'autre part, en raison de la persistance des anticorps des mois voire des années après l'infection, il est souvent difficile de distinguer une cicatrice sérologique d'une réelle infection en évolution.

### *Infection à* C. trachomatis

Dans les infections génitales basses ainsi que dans le trachome, le sérodiagnostic a peu d'intérêt car, l'infection restant superficielle, le taux d'anticorps est faible. En revanche, dans les infections profondes à *C. trachomatis*, le sérodiagnostic prend tout son intérêt étant donné l'accessibilité difficile du site infectieux chez l'homme comme chez la femme. Un taux élevé d'IgG ou d'Ig totales (≥ 1/64) est significatif d'une infection passée ou en cours. Après une infection à *C. trachomatis*, les anticorps persistent à un taux élevé pendant plusieurs mois et la sérologie ne permet pas de surveiller l'évolution de la maladie. Récemment a été proposée la recherche d'anticorps anti-hsp60 spécifiques de *Chlamydia* (Chsp60). La présence d'anticorps dirigés contre les hsp60 de *C. trachomatis* pourrait être un marqueur de passage à la chronicité et serait donc utile à la prise en charge thérapeutique.

La nomenclature a limité les indications du sérodiagnostic de *C. trachomatis* aux infections hautes, à la LGV, au bilan d'hypofertilité et d'arthrite réactionnelle en utilisant des trousses ELISA spécifiques d'espèce. La recherche des IgA a été supprimée.

### *Infection à* C. pneumoniae

En primo-infection, les IgM apparaissent 2 à 3 semaines après le début de la maladie et disparaissent en 2 à 6 mois. Les IgG atteignent des taux élevés en 6 à 8 semaines. L'infection à *C. pneumoniae* n'induisant pas une bonne protection immune, les réinfections sont possibles. En cas

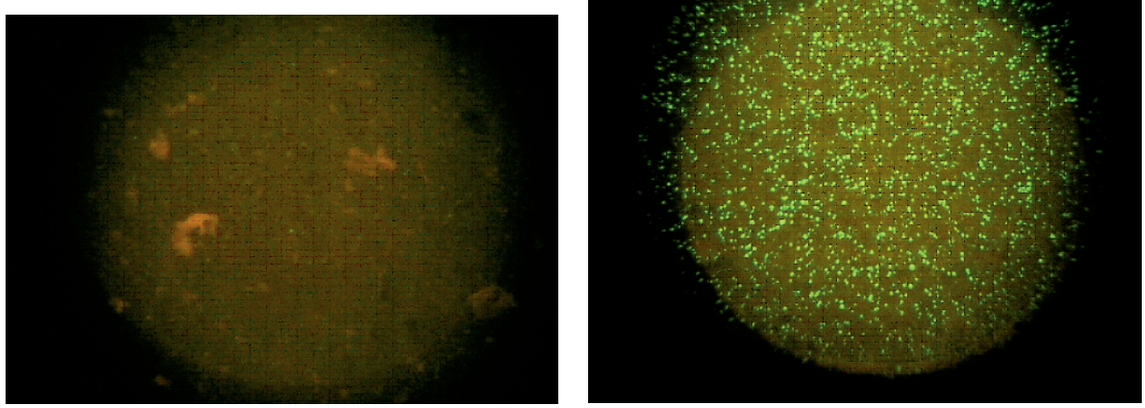


**Fig. 40.1.4.** – *Spot de sérologie par MIF.*
À gauche : présence d'anticorps. À droite : absence d'anticorps.

de réinfection, les IgM n'apparaissent pas et le taux d'IgG augmente rapidement en 1 à 2 semaines. En l'absence d'IgM, le diagnostic ne peut qu'être rétrospectif puisqu'un deuxième sérum est nécessaire pour observer l'augmentation par 4 du taux d'anticorps. Le diagnostic d'infection aiguë est porté sur une séroconversion ou une augmentation de titre entre deux sérums (au moins deux dilutions) ou la présence d'IgM. Un titre isolé d'IgG ≥ 512 n'est significatif qu'associé à une recherche directe positive.

### *Infection à* C. psittaci

La psittacose s'accompagne souvent de titres élevés d'anticorps (> 1/256), mais des réactions croisées avec les deux autres antigènes gênent souvent l'interprétation. Cependant, une augmentation significative du taux d'anticorps anti-*C. psittaci* est caractéristique. Un cas est certain si la recherche directe (culture ou PCR) est positive et/ou si une séroconversion ou une augmentation significative du taux des anticorps (× 4) sur deux échantillons prélevés à 2 semaines d'intervalle ou la présence d'IgM (≥ 16) est observée. Un cas est probable devant un tableau clinique compatible avec le diagnostic et lié épidémiologiquement à un cas confirmé avec un titre d'IgG ≥ 32 dans un sérum.

## Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des souches ne se fait pas en routine étant donné la lourdeur des techniques. La méthode usuelle de détermination de la sensibilité de *Chlamydia* aux antibiotiques comporte une étape de culture de la bactérie sur lignées cellulaires en présence de concentrations croissantes d'antibiotique, suivie d'une détection au microscope des inclusions chlamydiennes colorées le plus souvent par un anticorps fluorescent.

Des techniques de biologie moléculaire ont été développées pour des bactéries de croissance difficile. Elles consistent à mesurer l'inhibition de croissance bactérienne par quantification soit de l'ADN, soit des transcrits par PCR en temps réel.

### *Antibiotiques actifs*

Peu d'antibiotiques sont naturellement actifs sur *Chlamydia*. Parmi les antibiotiques potentiellement actifs, on trouve, dans un ordre d'activité décroissante in vitro, la rifampicine avec les CMI les plus basses, les tétracyclines, notamment la minocycline et la doxycycline, les fluoroquinolones les plus récentes (sparfloxacine, moxifloxacine, gémifloxacine et gatifloxacine), les macrolides vrais (érythromycine, roxithromycine, azithromycine) et certaines fluoroquinolones moins récentes (ofloxacine, ciprofloxacine). L'activité de ces antibiotiques sur *C. pneumoniae* et *C. trachomatis* est comparable (tableau 40.1.2).

Les *Chlamydia* présentent une résistance naturelle aux aminosides, à la vancomycine, aux quinolones de première génération, au métronidazole et à la colimycine. Parmi les β-lactamines, seules la pénicilline G et l'amoxicilline présentent une certaine activité, qualifiée de paradoxale puisque la bactérie est dépourvue de peptidoglycane.

In vivo, la résistance acquise aux antibiotiques chez *C. trachomatis* est peu documentée. In vitro, il a été possible de sélectionner des mutants résistants.

**TABLEAU 40-1-2**

**Activité des antibiotiques vis-à-vis de *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* (écart de CMI mg/l).**

| | *C. trachomatis* | *C. pneumoniae* |
|---|---|---|
| Rifampicine | 0,005–0,2 | 0,00125–0,0025 |
| *Tétracyclines* | | |
| Minocycline | 0,001–0,2 | 0,015–0,03 |
| Doxycycline | 0,01–0,2 | 0,03–0,5 |
| *Macrolides vrais et apparentés* | | |
| Erythromycine | 0,1–1 | 0,063–0,25 |
| Roxithromycine | 0,125–0,25 | 0,06–0,2 |
| Azithromycine | 0,03–1 | 0,125–0,5 |
| Josamycine<br>Clarithromycine<br>Télithromycine | 0,01–1<br>ND<br>ND | 0,25<br>0,016–0,063<br>0,031–0,25 |
| *Fluoroquinolones* | | |
| Ofloxacine<br>Lévofloxacine<br>Moxifloxacine | 0,5–4<br>0,5–2<br>0,03–0,06 | 0,5–2<br>0,5–1<br>0,125–1 |
| Gatifloxacine | 0,25 | 0,125–0,25 |
| Gémifloxacine | 0,015–0,03 | 0,015–0,03 |

ND : non déterminé.

## *Conséquences thérapeutiques*

### Infections à *C. trachomatis*

Étant donné les possibilités de transmission sexuelle et de dissémination de l'infection aux voies génitales hautes, il est important de traiter spécifiquement l'infection à *C. trachomatis*.

Suivant les recommandations récentes de l'Afssaps, le traitement de première intention des infections urogénitales non compliquées fait appel à l'azythromycine en « traitement minute » à la dose de 1 g per os en une seule prise ou à la doxycycline 100 mg per os, 2 fois par jour, pendant 7 jours. Les alternatives thérapeutiques reposent sur l'érythromycine ou l'ofloxacine.

Il est indispensable de traiter parallèlement le(s) partenaire(s) et d'avoir des relations sexuelles protégées pendant le traitement.

Les infections génitales hautes se traitent plus longtemps que les infections basses, pendant 14 à 21 jours.

La possibilité de persistance de l'infection après traitement justifie la mise en place d'un contrôle post-thérapeutique par recherche directe de la bactérie à distance du traitement.

### Infections à *C. pneumoniae*

In vitro, érythromycine et cyclines sont actives et constituent les traitements recommandés en première intention. Une durée prolongée (14 jours) est nécessaire. En cas de récidive, une deuxième cure d'antibiotique est indiquée. Les nouveaux macrolides apparaissent aussi efficaces et mieux tolérés (roxithromycine, clarithromycine, azithromycine, dirithromycine). L'azithromycine autoriserait un raccourcissement de la durée du traitement. Les fluoroquinolones apparaissent actives in vitro (lévofloxacine, moxifloxacine).

**POUR EN SAVOIR PLUS**

De Barbeyrac B, Juguet F, Bébéar C. Maladie de Nicolas et Favre, *Lymphogranuloma venereum*. EMC : (Elsevier Masson SAS, Paris) Maladies Infectieuses, 8-076-A-10 2009.

De Barbeyrac B, Clerc M, Peuchant O, Bébéar C. *Chlamydia trachomatis*. In : Abrégé Masson Dermatologie. Les maladies sexuellement transmissibles. Paris : Elsevier Masson ; 2009. p. 46–56.

De Barbeyrac B. Chlamydia. In : Courvalin P, Leclercq R, Rice LB, editors. Antibiogram. ESKA Publishing–ASM Press ; 2010. p. 531–9.

De Barbeyrac B. *Chlamydia*. In : REMIC (Référentiel en microbiologie médicale). 4e éd. Société Française de Microbiologie ; 2010.

www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html.

## Chapitre 40.2

# *Coxiella burnetii*

S. Ranger-Rogez

## Généralités

*Coxiella burnetii* est une bactérie intracellulaire obligatoire, seule espèce du genre *Coxiella*, qui est classée dans la sous-division γ des Protéobactéries. Elle est phyogénétiquement proche de *Legionella.* C'est un petit bacille ne pouvant pas être mis en évidence par la coloration de Gram, qui vit et se multiplie dans le phagolysosome des macrophages. *C. burnetii* présente une forme pseudosporulée responsable de sa très grande résistance en milieu extérieur et de son caractère très infectieux. Enfin, cette bactérie est sujette à une variation de phases : la forme présente dans l'environnement et hautement infectieuse est la phase I, alors qu'après culture, la bactérie modifie son lipopolysaccharide de paroi par délétion chromosomique et se présente sous une phase II antigéniquement différente et avirulente. *C. burnetii* est responsable de la fièvre Q, ainsi dénommée pour *query fever* (fièvre d'origine inconnue). Cette maladie est une zoonose présente dans le monde entier, sauf la Nouvelle-Zélande. Elle survient souvent mais non exclusivement chez des personnes au contact d'animaux, et peut se présenter sous une forme aiguë, généralement bénigne, ou sous une forme chronique, plus rare mais de pronostic médiocre.

## Habitat et pouvoir pathogène

*C. burnetii* infecte de nombreux mammifères, ovins et caprins principalement, mais aussi bovins, lapins, chats et, dans une moindre mesure, chiens. Elle est peu pathogène chez ces animaux, mais, étant localisée au niveau du placenta, elle occasionne une prématurité, un faible poids de naissance, des avortements. La bactérie, excrétée dans les matières fécales, l'urine, le lait, est surtout présente en très grande quantité dans les produits de parturition qui, en se desséchant, laissent des bactéries toujours virulentes dans les fumiers, les litières, les poussières, etc. Elles sont ensuite répandues par le vent et contaminent de manière intense et durable l'environnement. *C. burnetii* est aussi trouvée chez des oiseaux ainsi que chez certaines espèces de tiques.

L'homme se contamine principalement par inhalation de particules infectieuses, beaucoup plus rarement par ingestion de produits à base de lait cru. L'incubation dure de 1 à 3 semaines selon la voie d'inoculation et la charge bactérienne. **La fièvre Q aiguë** est asymptomatique dans 60 % des cas ; sinon, elle se manifeste par une fièvre prolongée, un syndrome pseudogrippal, une pneumopathie interstitielle, ou une hépatite granulomateuse. Plus rarement, *C. burnetii* est associée à une atteinte cardiaque

(myocardite, péricardite), une glomérulonéphrite aiguë, une méningo-encéphalite ou une méningite, une éruption fébrile. L'infection est en général spontanément résolutive chez un sujet immunocompétent. Chez la femme enceinte, elle peut provoquer une placentite conduisant à une prématurité, un avortement, une mort fœtale in utero ; l'infection devient très souvent chronique dans ce contexte.

**La fièvre Q chronique**, définie comme la persistance de l'infection pendant une période de plus de 6 mois, survient dans 5 % des cas d'infection aiguë, et principalement en cas d'immunodépression ou sur un terrain favorable. Elle est essentiellement responsable d'endocardites chez les valvulopathes (60 % des cas), d'infections vasculaires sur prothèses ou sur anévrisme, plus rarement d'ostéomyélite, d'hépatite, d'infection pulmonaire chronique, de fibrose pulmonaire. Le pronostic en est médiocre (mortalité dans 15 % des cas). Chez les femmes enceintes, la fièvre Q chronique est fréquemment responsable de prématurité, de mortinatalité et de fausses couches à répétition.

### *Caractères généraux d'orientation et de différenciation du genre*

*C. burnetii* est une bactérie pléomorphe de 0,2 à 1 µm, intracellulaire stricte. Sa structure est proche de celle des bactéries à Gram négatif et elle prend bien la coloration de Gimenez. Elle est pseudosporulée dans le milieu extérieur et est très résistante : 1 heure à 60 °C, 4 jours en formaldéhyde à 0,5 %, plusieurs mois dans le lait ou le sol.

## Diagnostic bactériologique

Le diagnostic est le plus souvent réalisé de manière indirecte par mise en évidence des anticorps. Il est parfois nécessaire d'y adjoindre des méthodes directes, notamment chez des sujets immunodéprimés ou en fonction de la symptomatologie.

### *Diagnostic direct*

Le diagnostic direct est rarement réalisé, du fait du caractère hautement infectieux de la bactérie qui est classée dans le groupe 3 des agents infectieux, et qui doit donc être manipulée en laboratoire de sécurité de niveau 3 sous PSM. Il est essentiellement pratiqué dans des laboratoires spécialisés.

#### Prélèvements

Il peut s'agir de biopsies (hépatiques, pulmonaires), de prélèvements chirurgicaux (valves, prothèses), de placenta, de sang, de lait.

#### Examen direct

La bactérie est difficilement observable après coloration de Gram. La coloration la plus intéressante pour visualiser *C. burnetii* dans un produit pathologique est la coloration de Gimenez, utilisant la fuchsine basique (annexes 40.2.1). Les bactéries apparaissent sous forme de cocco-bacilles rouges situés dans des vacuoles intracytoplasmiques. Les colorations de Stamp ou de Macchiavello peuvent aussi être utilisées (annexes 40.2.2 et 40.2.3).

Ces diverses colorations sont cependant peu sensibles et non spécifiques (elles permettent aussi de visualiser des *Chlamydiae* ou des *Brucellae*), et il est préférable de mettre en évidence *C. burnetii* sur des tissus après apposition ou sur des coupes histologiques par immunohistochimie (immunofluorescence ou immunoperoxydase) à l'aide d'anticorps spécifiques. Cependant, il n'existe actuellement pas d'anticorps commerciaux ; c'est pourquoi cette technique n'est réalisée que dans les centres de référence.

#### Culture

La culture de *C. burnetii* est rarement réalisée car elle est peu sensible, ne peut pas être réalisée sur des milieux

**ANNEXE 40.2.1**

**Coloration de Gimenez (d'après A. Stein)**

**Matériel** :
• lame porte-objete ;
• pipettes ;
• eau ;
**Réactifs :**
• Carbol fuchsine :
– fuchsine à 10 % en éthanol à 95 % ;
– phénol à 4,5 % en eau à 37 °C ;
– eau q.s.p. 1 litre.
Stabilité : 1 an à température ambiante
S'utilise dilué à 30 % en tampon phosphate, puis filtré : stabilité 48 h
• Vert malachite :
– malachite oxalate à 0,8 %
Stabilité : 4 mois à température ambiante
• Tampon phosphate :
– $NaH_2PO_4$ 0,02 M
– $Na_2HPO_4$ 0,08 M
**Procédure :**
• Déposer la préparation à observer sur la lame porte-objet et fixer à la chaleur.
• Recouvrir la lame de carbol fuchsine dilué et filtré ; laisser 2 minutes.
• Rincer abondamment à l'eau.
• Recouvrir la lame de vert malachite ; laisser 9 secondes.
• Rincer abondamment à l'eau.
• Recouvrir à nouveau de vert malachite ; laisser 9 secondes.
• Rincer abondamment à l'eau.
• Laisser sécher.
• *Coxiella burnetii* apparaît en rouge sur un fond vert au microscope.

**ANNEXE 40.2.2**

### Coloration de Stamp (d'après H.R. Olivier)

Procédure
- Déposer la préparation à observer sur la lame porte-objet et fixer à la chaleur.
- Recouvrir la lame d'une préparation extemporanée de fuchsine phéniquée de Ziehl diluée au 1/5e en eau distillée ; laisser 10 minutes.
- Laver à l'eau.
- Recouvrir d'une solution aqueuse d'acide acétique à 3 ‰ et laisser 2 secondes.
- Laver à l'eau.
- Recouvrir d'une solution aqueuse à 1 % de bleu de méthylène : laisser 2 à 3 secondes.
- Rincer à l'eau.
- *Coxiella burnetii* apparaît en rouge sur un fond bleu.

**ANNEXE 40.2.3**

### Coloration de Macchiavello (d'après H.R. Olivier)

- Déposer la préparation à observer sur la lame porte-objet et fixer à la chaleur.
- Recouvrir de fuchsine basique à 0,25 % ; laisser 5 minutes.
- Laver à l'eau distillée neutre.
- Recouvrir d'acide citrique à 0,50 % afin que la teinte de la préparation soit rose, ne laissant que quelques fragments rouges.
- Rincer à l'eau.
- Recouvrir de bleu de méthylène à 1 %.
- Rincer à l'eau. Le frottis présente une teinte lilas.
- *Coxiella burnetii* apparaît en rouge sur un fond bleu.

synthétiques, et fait encourir des risques pour le personnel. Cette bactérie intracellulaire stricte est cultivée selon des techniques qui s'apparentent à celles utilisées pour la culture des virus. Elle peut s'effectuer sur des œufs embryonnés, ce qui est actuellement abandonné pour le diagnostic, mais le plus souvent la culture est réalisée sur des lignées cellulaires, l'une des plus utilisées étant les cellules diploïdes HEL 299 dérivées de tissu pulmonaire embryonnaire humain. La culture consiste à inoculer par centrifugation à 700 g/minute pendant 1 heure à 20 °C, une nappe confluente de cellules cultivées sur des lamelles déposées au fond de puits de plaques stériles ou de tubes bijoux. Cette étape vise à favoriser l'attachement et la pénétration des bactéries dans les cellules. Après centrifugation, le milieu est retiré et remplacé par du milieu de culture cellulaire et l'incubation est poursuivie à 37 °C

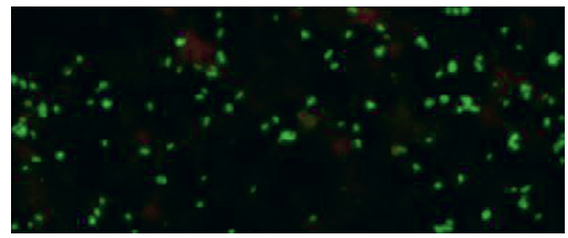


**Fig. 40.2.1.** – *Aspect de* Coxiella burnetii *à l'examen direct d'un produit pathologique en immunofluorescence.*

sous 5 % de $CO_2$. La détection de la croissance bactérienne est réalisée après 5 à 7 jours, directement sur la lamelle ou après grattage et recueil des cellules qui sont alors déposées sur lame. Cette détection est effectuée par coloration de Gimenez ou par immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques, plus rarement par PCR (fig. 40.2.1).

La culture n'est pas utilisée à des fins diagnostiques, mais a pour but d'obtenir des souches qui seront ensuite étudiées sur un plan épidémiologique, quant à leur virulence ou leur sensibilité aux antibiotiques.

## Amplification génique (PCR)

C'est la technique la plus spécifique pour poser le diagnostic d'infection à *C. burnetii*, mais sa sensibilité est encore controversée. Elle peut être réalisée sur tout type de prélèvement et est très utile lorsqu'elle est appliquée à une valve cardiaque en cas d'endocardite. Chez les patients atteints d'endocardite ou d'infection vasculaire, la PCR sérique est aussi positive pendant une longue période.

Récemment, il a été montré que la PCR sérique peut être positive durant les premiers jours d'une infection aiguë (jusqu'au 17e jour au plus tard) et qu'elle se négative progressivement avec l'apparition séquentielle des anticorps (tableau 40.2.1).

Il n'existe pas de réactifs commerciaux pour détecter la présence du génome de *C. burnetii* dans un prélèvement et diverses techniques ont été publiées, les plus récentes permettant la quantification (PCR en temps réel). Divers gènes peuvent servir de matrice, mais il est important de vérifier la spécificité de l'amplification par une hybridation ou par séquençage du produit amplifié. Les gènes utilisés comme cibles peuvent être plasmidiques (*QpH1*, *QpRS*) ou chromosomiques, comme le gène de l'isocitrate déshydrogénase, ou comme l'élément d'insertion *IS1111a*, cible la plus utilisée. L'intérêt de choisir comme cible un élément d'insertion est qu'il en existe plusieurs copies par génome bactérien (7 à 120 copies pour *IS1111a* selon les souches, 20 copies pour la souche de référence Nine Mile), ce qui permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la détection. Cependant, les amorces et sondes doivent être choisies avec soin, car la comparaison des séquences d'*IS1111a* chez diverses souches a montré un important polymorphisme.

TABLEAU 40-2-1

**Présence de *C. burnetii* dans le sérum (détection par PCR) en fonction de la sérologie au cours d'une infection aiguë (d'après P.M. Schneeberger et al., *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17 : 286–90).**

| *Ig et phases* | *Sérologie* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| IgM phase II | – | + | + | + | + |
| IgG phase II | – | – | + | + | + |
| IgM phase I | – | – | – | + | + |
| IgG phase I | – | – | – | – | + |
| Taux de positivité de la PCR | 49/50 (98 %) | 9/10 (90 %) | 3/13 (23 %) | 2/41 (5 %) | 0/1 (0 %) |

## Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Comme *C. burnetii* n'est pas cultivable sur des milieux inertes, la recherche de la sensibilité aux antibiotiques n'est pas réalisée couramment. Elle est seulement pratiquée par quelques laboratoires spécialisés qui travaillent sur des cultures cellulaires infectées. Très récemment, la recherche par PCR puis séquençage de mutations associées à des résistances a été décrite, mais cette technique n'en est pour l'instant qu'à ses débuts.

## *Diagnostic indirect : sérodiagnostic*

C'est la méthode la plus couramment utilisée pour poser le diagnostic d'infection à *C. burnetii*. Trois techniques sont principalement utilisées : la réaction d'immunofluorescence indirecte (IF) qui est la technique de référence, la réaction de fixation du complément et la technique ELISA.

L'IF utilise comme antigène *C. burnetii* souche Nine Mile qui présente des antigènes de phase II lorsqu'elle est cultivée sur cellules, et des antigènes de phase I lorsqu'elle est prélevée sur des rates de souris infectées. Lors de l'infection aiguë, la réponse humorale est dirigée principalement contre les antigènes de phase II, alors qu'une infection établie se manifeste par la présence d'anticorps de titre élevé dirigés contre la phase I. Pour un simple dépistage, il est inutile de rechercher la réponse vis-à-vis des antigènes de phase. Le dépistage peut donc être effectué sur des lames présentant une seule phase de *C. burnetii* (phase II en l'occurrence). La présence d'IgM ou d'IgA sera recherchée après élimination du facteur rhumatoïde. Une réaction positive se manifestera, à l'observation au microscope en lumière ultraviolette, par la présence de très nombreuses bactéries fluorescentes réparties sur la totalité du puits et sur les lambeaux de tissus. Chaque fabricant conseille des dilutions de dépistage et donne une valeur seuil significative. Cependant, il a été montré que les résultats obtenus varient grandement selon les populations étudiées et l'environnement. C'est pourquoi il est conseillé pour chaque laboratoire d'établir son propre seuil de significativité en testant des sérums de sujets sains, des sérums de patients ayant fait une fièvre Q avérée et des sérums de sujets ayant une infection connue pour donner des réactions sérologiques croisées avec *C. burnetii* (*Leptospira, Legionella*). La valeur seuil sera choisie une dilution au-dessus du titre obtenu pour 98 % des sérums des sujets sains. Récemment, plusieurs auteurs préconisent de définir une zone grise située 2 dilutions en dessous de la valeur seuil. Les patients dont les sérums donnent un titre dans cette zone grise devraient être prélevés 2 semaines plus tard pour contrôle. À titre d'exemple, le tableau 40.2.2 donne les résultats obtenus par un laboratoire danois utilisant des lames commerciales.

TABLEAU 40-2-2

**Exemple de choix d'une valeur seuil et d'une zone grise pour le test sérologique par immunofluorescence Focus Diagnostics® sur une population danoise (d'après S. Villumsen et al., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009; 65 : 93–8).**

| | *Négatif* | *Zone grise* | *Positif* |
|---|---|---|---|
| IgM phase I | < 64 | 64 | ≥ 128 |
| IgM phase II | < 64 | 64–128 | ≥ 256 |
| IgG phase I | < 128 | 128–256 | ≥ 512 |
| IgG phase II | ≤ 128 | 256–512 | ≥ 1024 |

Lorsque le test de dépistage est positif, le sérum doit ensuite être étudié pour les deux phases antigéniques (phases I et II). Des lames commerciales existent qui présentent la particularité d'avoir sur chaque puits deux petits dépôts, l'un correspondant à la bactérie en phase I et l'autre à la bactérie en phase II. Les IgG, IgM et dans certains cas les IgA sont recherchées et quantifiées pour ces phases. En cas de positivité, l'aspect observé au microscope est le même que précédemment décrit. La lecture est parfois rendue difficile du fait de la petite taille des dépôts antigéniques.

La réaction de fixation du complément est une technique très spécifique mais moins sensible et de réalisation longue. Elle est de moins en moins utilisée.

Il existe aussi des tests commerciaux utilisant la technique ELISA. Ces tests semblent avoir une sensibilité plus

faible que l'IF. La difficulté d'établir une valeur seuil avec ces techniques explique aussi la présence de faux positifs. La plupart des auteurs s'accordent pour recommander ces tests pour des études séroépidémiologiques plutôt que dans un but diagnostique.

## Interprétation du diagnostic sérologique de la fièvre Q (IF)

### *Fièvre Q aiguë*

Le diagnostic de fièvre Q aiguë est préférentiellement posé devant l'augmentation du titre des IgG de plus de 2 dilutions sur 2 sérums prélevés à 15 jours d'intervalle ou sur une séroconversion des IgG. Celle-ci s'observe classiquement 7 à 15 jours après le début des symptômes ; 90 % des patients présentent des IgG 3 semaines après le début des manifestations cliniques (fig. 40.2.2 et 40.2.3).

Les IgM apparaissent vers 2 semaines et disparaissent en général au cours des 4 mois suivant l'infection. Elles peuvent cependant rester positives longtemps (jusqu'à 17 semaines).

Mais le plus souvent le biologiste dispose d'un seul sérum pour effectuer le diagnostic de l'infection aiguë. Dans ce cas, le diagnostic de fièvre Q aiguë est posé devant la présence d'un titre élevé des IgG dirigées contre la bactérie en phase II avec des IgG de phase I faibles, en présence d'IgM de phase I et/ou II.

### *Fièvre Q chronique*

Le diagnostic de fièvre Q chronique est posé devant la présence d'IgG anti-phase I de titre élevé (≥ 512 ou 640 ou plus), quelle que soit la valeur des IgG de phase II (fig. 40.2.4). Les valeurs observées sont souvent très élevées. Le titre retenu comme significatif d'infection chronique pourra varier avec la technique utilisée et selon le contexte épidémiologique régional. Des IgM anti-phase I sont en général présentes et assez fréquemment des IgM de phase II sont détectées. Des IgA anti-phase I de titre élevé sont souvent présentes. Leur suivi peut être intéressant, car elles disparaissent beaucoup plus rapidement que les IgG au cours de la guérison.

La surveillance sérologique des patients atteints de fièvre Q chronique et traités doit être mensuelle au début, puis tous les 4 à 6 mois. Sous traitement efficace, le taux des anticorps diminue lentement et la surveillance doit être effectuée pendant toute la durée du traitement, soit 18 mois à 3 ans en général, puis un contrôle annuel sera mis en place. Ces patients présentent le plus souvent des valeurs élevées résiduelles des IgG anti-phase I.

## Conclusion

Le diagnostic de l'infection par *C. burnetii* repose encore actuellement essentiellement sur la sérologie qui reste parfois d'interprétation délicate. Les nombreuses réactions croisées décrites n'interfèrent pas avec le diagnostic dès lors que celui-ci utilise le titrage des anticorps dirigés contre les différentes phases de la bactérie.

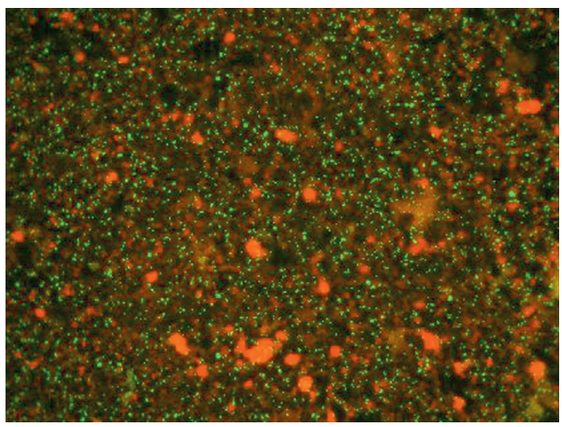


**Fig. 40.2.2.** – *Aspect obtenu pour une sérologie fièvre Q positive par immunofluorescence indirecte. Les bactéries apparaissent fluorescentes et les lambeaux cellulaires sont colorés en rouge.*

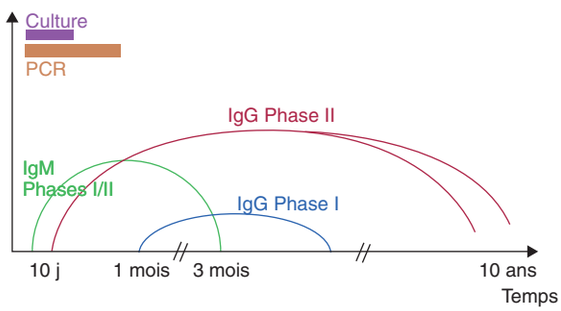



**Fig. 40.2.3.** – *Évolution des différents marqueurs au cours de la fièvre Q aiguë.*

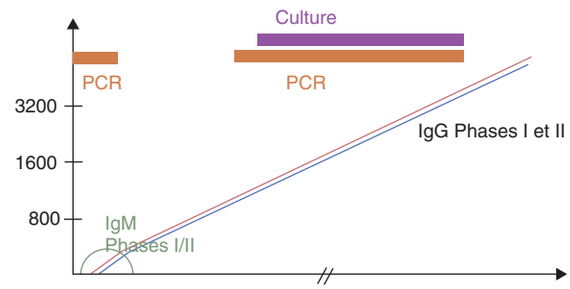



**Fig. 40.2.4.** – *Évolution des différents marqueurs au cours de la fièvre Q chronique.*
(D'après le Centre national de référence des rickettsies, Pr Raoult.)

**POUR EN SAVOIR PLUS**

De Silva T, Chapman A, Kudesia G, McKendrick M. Ongoing queries : interpretation of serology in asymptomatic or atypical chronic Q fever. J Infect 2006 ; 52 : e113–6.

Kazar J. *Coxiella burnetii* infection. Ann N Y Acad Sci 2005 ; 1063 : 105–14.

Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev 1999 ; 12 : 518–53.

Olivier HR. Traité de biologie appliquée. II. Les diagnostics microbiologiques (1re partie). Paris : Librairie Maloine ; 1963.

Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. Lancet 2006 ; 367 : 679–88.

Stein A. *Coxiella burnetii*. In : Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2000. p. 1625–34.

**ADRESSE UTILE**

**Unité des Rickettsies, centre national de référence**
Faculté de Médecine,
27, boulevard Jean-Moulin,
13385 Marseille cedex 5
Tél. : 04 91 32 43 75 – Fax : 04 91 38 77 72

## Chapitre 40.3

# Rickettsies – *Rickettsia conorii*

S. Ranger-Rogez

## Généralités

Les rickettsies sont de petites bactéries à développement intracellulaire obligatoire, transmises à l'homme par des vecteurs ; les rickettsioses sont des zoonoses. Ces bactéries sont classées dans la famille des *Rickettsiaceae*, tribu des *Rickettsiae*, et leur classification qui était initialement fondée sur des caractères essentiellement phénotypiques a été modifiée à la lumière des résultats obtenus par séquençage, notamment du gène de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S. Il existe deux genres bactériens : *Rickettsia* et *Orientia*.

Les *Rickettsiae* sont classées en deux grands groupes :

- le groupe du typhus épidémique comprenant :
  - *R. prowazeckii*, agent du typhus exanthématique ;
  - *R. typhi*, agent du typhus murin.
- le groupe des fièvres boutonneuses comprenant plus de 20 espèces dont :
  - *R. rickettsii*, responsable de la fièvre pourprée des montagnes Rocheuses ;
  - *R. conorii*, responsable de la fièvre boutonneuse méditerranéenne, et comprenant maintenant quatre sous-espèces, sévissant dans des régions différentes et pouvant donner des pathologies différentes : *R. conorii conorii, R. conorii caspia, R. conorii israelensis, R. conorii indica.*

Par ailleurs, *R. canadensis* et *R. bellii* sont considérées comme un groupe « ancêtre », et *R. akari, R. australis* et *R. felis* constituent un groupe de transition.

Le genre *Orientia* comprend une seule espèce : *O. tsutsugamushi*.

Ces dernières années ont vu la découverte de nouvelles espèces de rickettsies, certaines ayant un potentiel pathogène pour l'homme. Les rickettsies sont ainsi considérées comme « pathogènes émergents ». La grande résistance dans le milieu extérieur de ces germes pathogènes pour l'homme les fait considérer comme agents potentiels de bioterrorisme.

Toutes les rickettsies sont transmises par des vecteurs et sont capables d'infecter l'homme. Si les bactéries du groupe typhus, transmises par le pou de corps (*R. prowazekii*) ou par la puce du rat (*R. typhi*), ont joué un rôle historique très important, notamment en période de guerre, elles ne sont actuellement trouvées que dans les pays de faible niveau socioéconomique. Cependant, *R. typhi* serait la rickettsie la plus fréquemment acquise par les voyageurs. Elle se manifeste le plus souvent comme une fièvre indifférenciée et le diagnostic est rarement effectué. Les bactéries du groupe des fièvres boutonneuses sont transmises par des tiques et leur répartition géographique est le reflet de celle de leur vecteur. La seule rickettsie trouvée régulièrement en France est *R. conorii* qui est

responsable de la fièvre boutonneuse méditerranéenne. Quant à *O. tsutsugamushi*, elle occasionne le typhus des broussailles, maladie endémique dans l'est du continent asiatique et l'ouest du Pacifique.

La suite de ce chapitre se focalisera donc plus spécialement sur *R. conorii* et précisément sur *R. conorii conorii*, seule rickettsie autochtone.

## Habitat et pouvoir pathogène

Les rickettsies sont cosmopolites et infectent de nombreux animaux qui constituent un réservoir naturel. Elles infectent aussi de nombreux arthropodes qui peuvent être vecteurs, réservoirs (et dans certains cas amplificateurs). La plupart du temps, l'homme n'est qu'un hôte accidentel. Les arthropodes interviennent dans la transmission interanimale, de l'animal à l'homme, ou interhumaine. Il n'existe pas de transmission interhumaine directe.

*R. conorii* est répartie dans le pourtour méditerranéen, en Europe centrale et en Afrique. En France, on trouve *R. conorii conorii* dans les régions méridionales, le couloir rhodanien, en Bourgogne, Franche-Comté, Lorraine. Le réservoir et vecteur est la tique du chien, *Rhipicephalus sanguineus*. Les rongeurs sauvages (lapins, hérissons) pourraient constituer un deuxième réservoir, mais cette hypothèse est controversée. L'homme comme le chien sont des hôtes accidentels. La maladie sévit essentiellement à la fin du printemps, en été et au début de l'automne. D'importantes variations dans l'incidence de cette maladie sont observées selon les années, probablement en relation avec les variations climatiques et donc l'activité des tiques. Une augmentation du nombre de cas cette dernière décennie et une augmentation du nombre de pays rapportant cette infection sont peut-être à corréler à un meilleur diagnostic, en particulier par utilisation de la biologie moléculaire.

Les rickettsies sont transmises par voie cutanée ou conjonctivale et pénètrent dans la circulation sanguine. Elles infectent les cellules endothéliales des vaisseaux et s'y multiplient, l'infection débutant au site d'inoculation. Les cellules infectées desquament, altérant les propriétés antithrombotiques de l'endothélium vasculaire et favorisant l'adhérence des plaquettes, l'ensemble étant à l'origine de lésions de vascularite.

Les manifestations cliniques associées aux rickettsies sont des tableaux fébriles généralement exanthématiques. La fièvre boutonneuse méditerranéenne se manifeste après une incubation de 6 jours en moyenne par un syndrome pseudogrippal d'installation brutale, puis, après quelques jours, une éruption cutanée maculopapuleuse survient très fréquemment au niveau du tronc ou des membres, se généralisant en épargnant la face, et s'accompagnant d'une thrombocytopénie et d'une élévation des transaminases. Une escarre au site d'inoculation est retrouvée dans 70 % des cas. Il est possible d'observer plusieurs escarres. L'évolution est spontanément favorable. Les lésions de vascularite sont à l'origine des formes sévères survenant sur des terrains particuliers. La mortalité rapportée initialement était de 1 à 3 %. Cependant, il semble que la maladie devienne plus sévère, et des variations sont observées selon les années et selon les régions, le taux de mortalité maximal rapporté étant de 32,3 % au Portugal, chez des patients hospitalisés. Les facteurs de risque de faire une forme grave sont : l'âge, l'immunodépression, l'alcoolisme chronique, un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, un retard à la mise en route d'un traitement approprié, le diabète.

## Caractères généraux d'orientation et de différenciation du genre

Les rickettsies sont de petits bacilles intracellulaires, de 0,3 à 2,5 µm de longueur, prenant mal la coloration de Gram, bien que la composition de leur paroi soit proche de celle des bactéries à Gram négatif. Elles sont entourées d'un glycocalyx. Elles sont colorées par la coloration de Gimenez (annexe 40.3.1) ou par la coloration de Giemsa. Leur multiplication intracellulaire stricte s'effectue par scissiparité. Les rickettsies du groupe boutonneux s'individualisent par le fait qu'elles peuvent être observées dans

**ANNEXE 40.3.1**

### Coloration de Gimenez (d'après A. Stein)

**Matériel :**
- lame porte-objet ;
- pipettes ;
- eau.

**Réactifs :**
- Carbol fuchsine :
  – fuschine à 10 % en éthanol à 95 % ;
  – phénol à 4,5 % en eau à 37 °C ;
  – eau q.s.p. 1 litre.

Stabilité : 1 an à température ambiante.
S'utilise dilué à 30 % en tampon phosphate, puis filtré : stabilité 48 heures.
- Vert malachite : malachite oxalate à 0,8 %.

Stabilité : 4 mois à température ambiante.
- Tampon phosphate :
  – $NaH_2PO_4$ 0,02 M ;
  – $Na_2HPO_4$ 0,08 M.

**Procédure :**
- Déposer la préparation à observer sur la lame porte-objet et fixer à la chaleur.
- Recouvrir la lame de carbol fuchsine dilué et filtré ; laisser 2 minutes.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Recouvrir la lame de vert malachite ; laisser 9 secondes.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Recouvrir à nouveau de vert malachite ; laisser 9 secondes.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Laisser sécher.
- Les rickettsies apparaissent en rouge sur un fond vert au microscope.

le noyau et le cytoplasme des cellules et que leur température optimale de croissance est de 32 °C. Les autres rickettsies sont de localisation exclusivement cytoplasmique et leur température de croissance est de 35 °C.

## Diagnostic bactériologique

Le diagnostic est en général un diagnostic indirect qui ne permet pas de connaître précisément l'espèce en cause. La positivité du diagnostic direct pose le diagnostic.

### *Diagnostic direct*

Les rickettsies sont classées dans le groupe 3 des agents infectieux et doivent être manipulées en laboratoire de sécurité de niveau 3 sous PSM. Ce diagnostic est essentiellement pratiqué dans des laboratoires spécialisés.

#### Prélèvements

Le meilleur prélèvement pour porter un diagnostic direct d'infection par une rickettsie du groupe boutonneux est une biopsie cutanée au niveau de l'escarre d'inoculation ou d'une éruption. Le diagnostic peut aussi être réalisé, mais avec une moindre sensibilité, sur un prélèvement sanguin ou à partir d'une tique.

#### Examen direct

Les rickettsies sont difficilement observables par les colorations classiques utilisées en bactériologie. Le meilleur moyen de les mettre en évidence est d'utiliser une technique immunohistochimique (par exemple sur le prélèvement d'escarre pour une rickettsie du groupe boutonneux), à condition de posséder des anticorps spécifiques du germe. Comme il n'existe actuellement pas d'anticorps commercialisés, cette technique est réalisée uniquement dans les centres de référence.

#### Culture

La culture des rickettsies, qui constitue la technique de référence, ne peut pas être réalisée sur des milieux synthétiques. Ces bactéries sont cultivées sur œuf embryonné ou sur culture de cellules eucaryotes (HEL, cellules endothéliales, cellules Vero, etc.). La sensibilité de la technique peut être augmentée par centrifugation du prélèvement sur la culture des cellules en microplaques. En culture cellulaire, ces bactéries produisent rapidement (en 3 à 5 jours) un effet cytopathique se manifestant par de larges plages de lyse. Elles sont ensuite mises en évidence par coloration de Gimenez, en immunofluorescence ou, le plus souvent, après amplification génique. La sensibilité de la technique est de l'ordre de 60 % dans les premiers jours de la maladie et seulement de 10 % lorsque les anticorps sont apparus (fig. 40.3.1).

#### Amplification génique (PCR)

Cette technique a une sensibilité d'environ 70 %. Elle peut être réalisée sur tout type de prélèvement. Il n'existe pas de réactifs commerciaux et les techniques publiées utilisent un nombre restreint de gènes cibles comme les gènes codant la sous-unité 16S de l'ARNr, la protéine de 17 kDa, la citrate synthase, rOmpA, rOmpB, Sca4. Il existe des PCR spécifiques du genre *Rickettsia* et d'autres spécifiques d'espèces. L'identification précise de l'espèce, en particulier pour des espèces génétiquement proches, peut aussi être réalisée après séquençage.

#### Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Cette étude n'est pas réalisée en pratique courante car ces bactéries ne cultivent pas sur milieux synthétiques. Le traitement repose sur une antibiothérapie utilisant des molécules à pénétration intracellulaire (cyclines, rifampicine, érythromycine, ciprofloxacine).

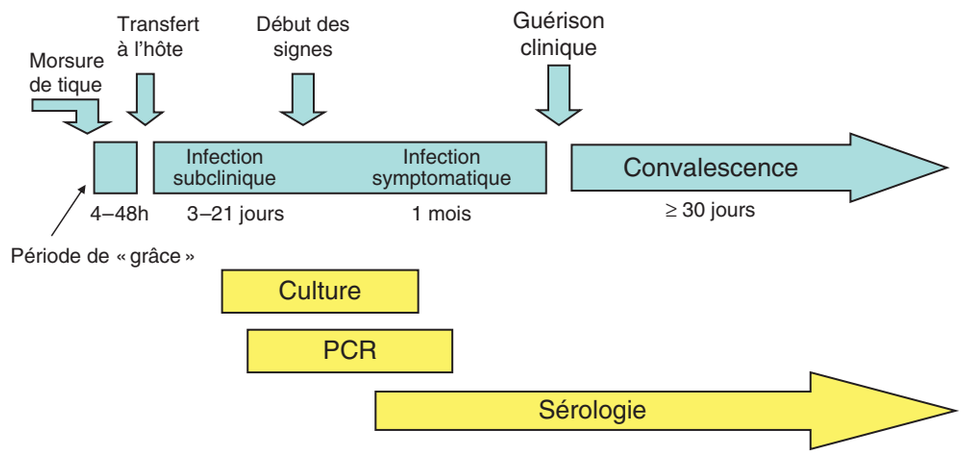



**Fig. 40.3.1.** – *Diagnostic d'infection par une rickettsie.*
Les différentes techniques microbiologiques utilisables pour faire en fonction de l'évolution des signes cliniques.
D'après Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Trends in Parasitology 2010; 26 : 205–12.

### *Diagnostic indirect : sérodiagnostic*

C'est la méthode la plus utilisée pour effectuer un diagnostic d'infection par une rickettsie. La technique historique de Weil et Félix était une technique d'agglutination utilisant une communauté antigénique existant entre les antigènes rickettsiens et les antigènes OX2, OX19 et OXK de trois souches de *Proteus*. Cette technique n'est plus utilisée actuellement et c'est la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI), très sensible (> 97 %) et spécifique (> 99 %), qui fait référence. Il est à noter qu'il existe des communautés antigéniques importantes entre les différentes rickettsies d'un même groupe, entraînant des réactions croisées. Les tests ELISA commerciaux ont de faibles sensibilité et spécificité. Pour différencier les anticorps entre les différents membres du groupe des fièvres boutonneuses, un immunotransfert (*Western-blot*) peut être réalisé avec préabsorption des anticorps.

Il est actuellement possible d'utiliser des lames du commerce pour la recherche d'anticorps anti-*Rickettsia conorii* (bioMérieux). *Rickettsia conorii* cultivée sur cellules Vero et inactivée constitue l'antigène. Le dépistage des IgG est effectué après dilution du sérum au 1/40e. La présence d'IgM est recherchée après élimination du facteur rhumatoïde. La réaction est considérée comme étant positive lorsqu'on observe au microscope en lumière ultraviolette la présence de nombreuses bactéries fluorescentes intra- et extracellulaires. Il est possible de titrer les IgG par dilutions successives du sérum, le titre retenu étant l'inverse de la plus forte dilution donnant encore une réaction positive. Des titres ≥ 80 en IgG associés à la présence d'IgM, ou une multiplication par 4 du titre des IgG entre deux sérums consécutifs distants d'au moins 15 jours, sont considérés comme significatifs d'infection récente par *R. conorii* ou une autre rickettsie du groupe boutonneux, car il existe de nombreuses réactions croisées. Les anticorps apparaissent en moyenne respectivement en une quinzaine de jours pour les IgM et environ 3 semaines pour les IgG après l'infection. En cas de sérologie de dépistage négative, un deuxième sérum sera prélevé 15 jours plus tard afin de rechercher une séroconversion IgG. Ces lames ne seront plus commercialisées fin 2011, mais il sera possible de s'approvisionner chez Vircell.

Afin de connaître plus précisément quelle rickettsie du groupe boutonneux est en cause, il est possible d'envoyer le sérum au centre de référence où est pratiquée une technique d'IFI vis-à-vis des rickettsies suivantes :

- *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*, de manière systématique ;
- *R. mongolotimonae*, *R. massiliae*, *R. israeli* si le patient a subi une morsure de tique en Europe ;
- *R. africae, R. akari, R. aeschlimanii* et *R. massiliae* seront en outre testées si la morsure de tique est survenue en Afrique.

La rickettsie incriminée sera celle donnant le plus fort taux d'anticorps en IFI ou pour laquelle la présence d'anticorps spécifiques aura été mise en évidence par immunotransfert, qui permet en outre de porter un diagnostic plus précoce. Enfin, le plus fort taux d'anticorps obtenu après adsorption croisée permet aussi d'effectuer le diagnostic.

Une technique d'IFI peut également être réalisée sur des lames sensibilisées par *R. typhi* (non commercialisées), et l'interprétation est similaire, permettant de conduire au diagnostic d'infection par cette bactérie ou par une autre bactérie du groupe typhus.

## Conclusion

Le diagnostic d'infection par une rickettsie reste, le plus souvent, un diagnostic sérologique. Il n'est pas de réalisation courante dans notre pays, d'autant plus qu'il n'existe qu'une rickettsie autochtone (*R. conorii*) de répartition limitée aux régions méridionales.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Hechemy KE, Oteo JA, Raoult DA, Silverman DJ, Blanco JR. Rickettsioses : from genome to proteome, pathobiology, and rickettsiae as an international threat. In : Annals of the New-York Academy of Sciences, 1063. New York ; 2005.

Hechemy KE, Raoult DA, Silverman DJ, Bianco JR. Century of rickettsiology : emerging, reemerging, rickettsioses, molecular diagnostics, and emerging veterinary rickettsioses. In : Annals of the New-York Academy of Sciences, 1078. New York ; 2006.

Rovery C, Brouqui P, Raoult D. Questions on mediterranean spotted fever a century after its discovery. Emerg Infect Dis 2008 ; 14 (9) : 1360–7.

Stein A. *Coxiella burnetii*. In : Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2000. p. 1625–34.


**ADRESSE UTILE**


Centre national de référence, Unité des Rickettsies
Faculté de Médecine
27, boulevard Jean-Moulin
13385 Marseille cedex 5
Tél. : 04 91 32 43 75 – Fax : 04 91 38 77 72

Chapitre 40.4

# *Ehrlichia*

S. Ranger-Rogez

## Généralités

L'étude de l'analyse des séquences géniques et plus particulièrement celle de la fraction 16S de l'ARN ribosomique des bactéries a profondément modifié la classification de certaines espèces bactériennes. Le groupe des *Ehrlichia* est actuellement classé dans la famille des *Anaplasmataceae*, ordre des *Rickettsiales* (α-protéobactéries) et divisé en quatre genres : *Ehrlichia* et *Anaplasma* associés aux tiques, *Neorickettsia* associé aux helminthes et *Wolbachia* associé aux arthropodes et aux helminthes. Ces bactéries intracellulaires strictes occasionnent des maladies animales, notamment chez le chien, et humaines, dues à l'infection de cellules sanguines. Les deux maladies les plus connues chez l'homme sont :

- l'ehrlichiose monocytaire humaine (*human monocytosis Erhlichiosis* [HME]) ;
- l'anaplasmose granulocytaire humaine (*human granulocytic anaplasmosis* [HGA]).

Les infections humaines par les bactéries de cette famille ont été décrites initialement en 1953 avec l'espèce *Neorickettsia sennetsu*, puis en 1986 avec l'espèce *Ehrlichia chaffeensis*, et finalement en 1990 pour *Anaplasma*. Les principales espèces pathogènes pour l'homme sont répertoriées dans le tableau 40.4.1. Depuis leur découverte et depuis le développement d'outils diagnostiques performants, les *Ehrlichia* ont été montrées comme jouant un rôle émergent en pathologie humaine.

## Habitat et pouvoir pathogène chez l'homme

Les ehrlichioses sont transmises d'un réservoir animal à l'homme par morsure d'une tique « dure » et leur répartition géographique est celle de leur vecteur. Les infections surviennent en période printanière et estivale. La médiane d'âge est d'environ 50 ans et 60 % des patients sont des hommes. Certaines de ces infections ne sont décrites qu'aux États-Unis (infections provoquées par *E. chaffeensis, E. ewingii, E. canis*). De rares infections à *E. chaffeensis* auraient été documentées sérologiquement en Amérique du Sud, en Europe (bien que l'espèce de tique transmettant cette bactérie n'y soit pas présente) et dans certains pays d'Asie, mais les tests utilisés manquaient de spécificité.

En revanche, *A. phagocytophilum* est trouvée aussi bien aux États-Unis qu'en Europe ou en Asie (Chine, Sibérie, Corée). Des infections provoquées par *A. phagocytophilum* ont été décrites en Europe du Nord (Scandinavie, Allemagne, Suisse, Slovénie, Grande-Bretagne), dans le pourtour méditerranéen (Espagne, Italie) et en France. En régions endémiques (États-Unis), l'incidence est supérieure à 50 cas pour 100 000 habitants. *A. phagocytophilum* peut être transmise par une espèce de tique transmettant aussi la maladie de Lyme ; les deux maladies peuvent d'ailleurs survenir conjointement. Par ailleurs, il a été montré récemment que la bactérie peut être transmise par transfusion sanguine, de façon nosocomiale ou périnatale.

L'ehrlichiose japonaise a été décrite en Asie, mais semble avoir actuellement disparu. Son réservoir est un

**TABLEAU 40-4-1**

**Principales caractéristiques des *Ehrlichia* pathogènes pour l'homme.**

| *Genre* | *Espèce* | *Réservoirs* | *Vecteurs* | *Cellules cibles* | *Distribution géographique* | *Pathologie humaine* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ehrlichia* | *E. chaffeensis* | Cervidés | *Amblyomma americanum* | Monocytes/ macrophages | États-Unis (Sud-Est, Centre-Est) | Ehrlichiose monocytaire humaine |
| | *E. ewingii* | Cervidés, chiens | *Amblyomma, Dermacentor* | Polynucléaires neutrophiles | États-Unis (Sud-Est, Centre-Est) | Ehrlichiose *ewingii* humaine |
| | *E. canis* | Chiens | *Rhipicephalus-sanguineus* | Monocytes/ macrophages | États-Unis (Sud-Est, Centre-Est) | Ehrlichiose monocytaire humaine |
| *Anaplasma* | *A. phagocytophilum* | Rongeurs, mammifères | *Ixodes persulcatus* complexe | Polynucléaires neutrophiles | États-Unis, Europe | Anaplasmose granulocytaire humaine |
| *Neorickettsia* | *N. sennetsu* | Helminthe | *Boophilus, Ripicephalus*, etc. | Monocytes/ macrophages | Inconnue | Ehrlichiose japonaise |

helminthe parasitant les mulets gris, poissons consommés crus par ces populations qui s'infectent alors.

La fréquence des ehrlichioses est globalement mal connue puisque seule une minorité de cas est diagnostiquée.

Les infections par ces bactéries sont assez souvent asymptomatiques ou paucisymptomatiques chez l'homme. Après une incubation de 5 à 21 jours en moyenne, l'infection symptomatique, quelle que soit la bactérie en cause, peut se traduire par un syndrome pseudogrippal s'accompagnant de leucopénie, de thrombopénie, d'élévation des enzymes hépatiques, d'infection pulmonaire. L'infection est spontanément résolutive dans les 30 jours suivant le début des signes. Des formes sévères, rares, peuvent survenir soit très rapidement, soit à distance. L'HME peut s'accompagner d'un syndrome de choc toxique fulminant, particulièrement chez les sujets immunodéprimés. Elle peut occasionner un syndrome de détresse respiratoire ou une hépatite. Une atteinte neurologique est trouvée chez 20 % des patients (méningo-encéphalite). L'HGA se complique plutôt de neuropathies périphériques pouvant aller jusqu'à une paralysie faciale isolée, ces atteintes persistant des semaines ou des mois. Elle peut aussi se compliquer d'infections opportunistes, conséquences de la leucopénie. La mortalité est de 3 % pour l'HME et de 0,7 % pour l'HGA. L'ehrlichiose à *E. ewingii* ressemble à l'HME mais entraîne moins de complications. L'ehrlichiose japonaise se manifeste par des polyadénopathies et un syndrome mononucléosique. L'ehrlichiose à *E. canis* est mal décrite.

## Caractères généraux d'orientation et de différenciation du genre

Ces bactéries de petite taille (0,4 à 1,5 µm) possèdent la structure des bactéries à Gram négatif, mais prennent mal cette coloration. Leur développement est obligatoirement intracellulaire et leurs cellules cibles sont différentes selon l'espèce considérée (tableau 40.4.1). Elles répliquent dans des vacuoles de la cellule-hôte en formant des microcolonies ou morulae. Leur cycle de multiplication est complexe et évoque celui des *Chlamydiae*.

## Diagnostic bactériologique

### *Diagnostic direct*

#### Prélèvements

Il s'agit de prélèvements sanguins sur anticoagulant.

#### Examen direct

L'examen direct consiste à observer les morulae dans les cellules leucocytaires sur un frottis sanguin coloré par la technique de May-Grünwald-Giemsa. L'aspect est suffisamment évocateur pour poser le diagnostic, mais cette technique est peu sensible. Elle doit être pratiquée dans la première semaine suivant l'apparition des signes cliniques, et avant tout traitement antibiotique ; elle est alors positive chez seulement environ 10 % des patients atteints d'HME et 25 à 75 % des patients avec HGA. La lecture doit être prolongée et attentive, car les morulae peuvent être présentes dans seulement 0,1 % des neutrophiles au cours de l'HGA.

#### Culture

C'est la méthode de référence pour confirmer un diagnostic d'ehrlichiose. L'isolement de cette bactérie nécessite un niveau de confinement P2 et n'est pratiquée que dans des laboratoires spécialisés. L'isolement est réalisé sur cultures cellulaires dépourvues d'antibiotique. *A. phagocytophylum* cultive en quelques jours à plus de 2 semaines sur cellules HL-60, alors qu'*E. chaffeensis* pousse en 2 à 6 semaines sur cellules DH82. Les morulae sont recherchées après coloration au Giemsa.

#### Amplification génique (PCR)

C'est la technique de choix, du fait de sa grande spécificité (60 à 85 %), de sa sensibilité (60 à 85 % pour *E. chaffeensis* ; 67 à 90 % pour *A. phagocytophylum*), et de la rapidité du résultat. Elle permet de détecter aisément la présence des bactéries dans le sang des patients à la phase aiguë de la maladie et pendant plusieurs semaines après l'infection, en l'absence de traitement. Il est aussi possible de rechercher les bactéries dans le LCR, mais la technique est ici moins sensible. Des PCR multiplex permettant la détection simultanée de ces différentes expèces sont décrites dans la littérature.

#### Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Cette étude est réalisée sur culture cellulaire en laboratoire de référence. Aucune résistance n'a été décrite pour les antibiotiques habituellement utilisés (tétracyclines).

### *Diagnostic indirect : sérodiagnostic*

L'immunofluorescence indirecte est la technique sérologique de référence. Le diagnostic est préférentiellement posé sur l'augmentation significative du titre des anticorps entre deux sérums prélevés à 3 semaines d'intervalle. En effet, il n'est possible de détecter des IgM puis des IgG, dans le meilleur des cas, qu'au cours de la 2e semaine postinfection, et l'analyse d'un seul sérum en phase aiguë ne permet le diagnostic que chez 3 % des patients. Le pic d'IgG est obtenu vers la 8e semaine, et les anticorps persistent ensuite des années. Les nombreuses réactions croisées entre les différentes espèces, et avec les rickettsies, ne permettent pas de poser un diagnostic précis de l'espèce en cause. L'infection de cellules jouant un rôle dans l'immunité permettrait d'expliquer une absence de séroconversion chez certains patients. Par ailleurs, l'absence de réactif commercial ne permet pas de réaliser couramment ce sérodiagnostic.

## Conclusion

Les ehrlichioses humaines, de découverte récente, sont de plus en plus reconnues comme des infections émergentes. La distribution étendue de leurs réservoirs et de leurs vecteurs et l'absence de diagnostic aisé répandu laissent penser que ces infections sont sous-estimées. Il est probable que, dans les années à venir, ces infections occupent une place plus importante.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

Dumler JS. Anaplasma and Ehrlichia infection. In : Hechemy KE, Oteo JA, Raoult DA, Silverman DJ, Blanco JR, editors. Rickettsioses : from genome to proteome, pathobiology, and rickettsiae as an international threat. Annals of the New-York Academy of Sciences vol 1063. New York ; 2005. p. 361–73.

Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin Lab Med 2010 ; 30 (1) : 261–92.

Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2009 ; 7(6) : 709–22.

**ADRESSE UTILE**

**Centre national de référence**
Unité des Rickettsies
Faculté de Médecine
27, boulevard Jean-Moulin
13385 Marseille cedex 5
Tél. : 04 91 32 43 75 – Fax : 04 91 38 77 72

CHAPITRE

41

# Bactéries anaérobies strictes

L. Dubreuil

## Avant-propos

Avant d'entreprendre la culture des anaérobies stricts, il faut absolument comprendre que l'ennemi provient de l'oxygène de l'air. Cette lapalissade n'est pas inutile dans la mesure où le faible taux d'isolement, en routine au laboratoire, de ces bactéries est la conjonction de plusieurs éléments. La plupart du temps, le délai ou les mauvaises conditions de transport font que les anaérobies sont morts avant de franchir la porte du laboratoire. Lorsque ceux-ci arrivent dans des conditions acceptables, il faudra les manipuler en respectant les conditions techniques liées à la technique anaérobie. Cela passe par l'emploi de milieux enrichis de divers suppléments (extrait de levure, vitamine K, etc.), qui ont été préparés extemporanément ou stockés dans une atmosphère anaérobie.

Parmi les anaérobies stricts, on distingue les bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène qui nécessitent une anaérobiose continue, par exemple en réalisant toutes les opérations dans une chambre anaérobie, des bactéries aérotolérantes cultivant mieux en anaérobiose (*Clostridium tertium*). Cependant, la plupart des anaérobies isolés en bactériologie médicale supportent une courte exposition à l'air permettant de techniquer à la paillasse avant d'incuber en anaérobiose, par exemple dans des jarres avec sachet générateur d'anaérobiose si l'on ne dispose pas de chambre anaérobie.

Si le temps de manipulation à l'air libre doit être le plus court possible, cela ne constitue pas le point crucial. Il faut être vigilant sur la qualité du prélèvement, son transport, l'utilisation de milieux bien réduits, l'obtention d'une bonne anaérobiose.

Une fois isolées, ces bactéries feront l'objet d'une identification présomptive à l'aide d'Anaérodiscs®, puis seront le plus souvent identifiées à l'aide de galeries commercialisées type API ID32A® ou rapid ANAII® ; enfin, un antibiogramme sera réalisé. La taxonomie est en perpétuelle évolution ; il est sans doute important de reconnaître les grands pathogènes comme *Clostridium perfringens, Bacteroides fragilis* ou *Fusobacterium necrophorum*. Les cocci à Gram positif sont presque toujours retrouvés en association ; leur identification précise n'a peut-être pas d'intérêt dans la majorité des cas. Lorsque l'identification ne peut être obtenue par les procédures classiques, c'est l'amplification de l'ARN 16S qui solutionnera les problèmes.

Isoler un anaérobie dans un prélèvement ne signifie pas que la bactérie est pathogène. Les anaérobies ne sont pathogènes que si on les retrouve dans un site où ils ne sont en principe pas présents ; cela signifie qu'il faut connaître la flore normale de la peau, de l'appareil digestif, des cavités buccales et vaginales. La relation avec le clinicien est également importante dans la mesure où l'isolement de *C. perfringens* dans une hémoculture peut être le signe d'une bactériémie très grave avec retentissement important sur l'état général du patient, mais peut aussi être le résultat d'une colonisation transitoire de la peau mal désinfectée lors de la réalisation d'hémocultures ; le patient est donc soit bien portant soit à l'article de la mort. Si l'on isole des anaérobies en culture pure de prélèvements pathologiques, la plupart du temps, on s'adresse à des infections mixtes où sont associées plusieurs bactéries aéro-anaérobies facultatives et anaérobies. Enfin, l'apparition de mécanismes de résistance aux antibiotiques rendra nécessaire une lecture interprétative de l'antibiogramme.

## Flores humaines anaérobies

Les anaérobies qui constituent la *flore cutanée* sont essentiellement les cocci à Gram positif (GPAC) et les propionibactéries dont *P. acnes*. Cette dernière peut être à la fois un témoin de contamination des prélèvements ou impliquée dans un abcès du cerveau ou une ostéite. En cas d'infection osseuse, l'implication de *P. acnes* sera liée à sa présence simultanée dans plusieurs biopsies ou à un délai de culture de plus de 72 heures. Il est à noter que la peau du malade, en particulier sur le pied du diabétique, peut être colonisée de façon transitoire par des bactéries fécales dont *Bacteroides fragilis* et divers *Clostridium*.

La *flore intestinale* renferme de très nombreuses espèces, dont principalement des *Clostridium*, *Eubacterium* ou bactéries apparentées et des *Bacteroides* du groupe *fragilis*.

La flore buccale est riche de plus de 500 espèces. On trouve, outre de nombreux cocci à Gram positif et négatif, des bacilles à Gram négatif appartenant aux espèces *Prevotella*, *Porphyromonas, Fusobacterium ;* en revanche, on n'isole pas de *Bacteroides* du groupe *fragilis*.

La flore vaginale est très proche de la flore buccale, même si elle peut renfermer quelques *Bacteroides* du groupe *fragilis* par contamination à partir de la flore intestinale.

## Habitat et pouvoir pathogène

Les anaérobies sont transmis à l'homme de trois façons :

- les *Clostridium* sont des bactéries telluriques rencontrées dans l'intestin de l'homme et des animaux, mais

surtout dans le sol et l'environnement. Ils pénètrent dans l'organisme le plus souvent par effraction : tétanos (*C. tetani*), *Clostridium* des plaies souillées par de la terre. Les infections provoquées sont dues aux toxines qu'ils produisent. Le botulisme est un cas particulier d' « intoxination » alimentaire ; le sujet consomme un aliment où, à la suite de la prolifération bactérienne, *C. botulinum* a produit sa toxine ;

- la plupart des infections à anaérobies sont d'origine endogène. Les bactéries qui colonisent une muqueuse vont se retrouver dans des sites inhabituels. Ainsi, les *Clostridium* de l'intestin et les *Bacteroides* du groupe *fragilis* vont migrer dans le péritoine du fait de perforations de l'intestin soit à la suite de plaie par arme blanche ou de chirurgie colorectale, soit lors de translocations bactériennes favorisées par les nécroses tissulaires d'un cancer. Le meilleur exemple de déplacement des flores après effraction de barrières naturelles est la morsure humaine ou animale ; on retrouve les anaérobies de la flore buccale dans la suppuration de la morsure ;
- enfin, la transmission nosocomiale est démontrée chez *C. difficile*, rendant possibles les épidémies de colites pseudomembraneuses comme on l'a observé en 2006 avec le sérotype O27.

## Conduite de l'analyse bactériologique

L'analyse bactériologique nécessite de respecter scrupuleusement les six conditions suivantes.

1. *Connaître les situations où l'on doit rechercher les anaérobies*
   - Quand faut-il rechercher les anaérobies ?
   - *Critères cliniques :*
     - mauvaise odeur de l'échantillon (souvent tardif) ;
     - présence de gaz dans une lésion ;
     - formation d'abcès, gangrène, nécrose de tissu ;
     - infections chroniques.
   - foyers proches des muqueuses :
     - dentaires ;
     - orofaciales ;
     - abdominales ;
     - gynécologiques (sauf MST).
   - infections secondaires à des morsures humaines ou animales ;
   - infections tumorales (bronchiques, coliques et utérins) ;
   - infections où les anaérobies sont toujours en cause :
     - dentaires, péritonites, infections postchirurgicales abdominales ;
     - pneumonies d'aspiration, otites et sinusites chroniques ;
     - infections des extrémités chez le diabétique ;
     - présence d'un pus avec grain de soufre (*Actinomyces*).
   - *Critères bactériologiques :*
     - coloration noire du pus ou fluorescence rouge du prélèvement ;
     - à l'examen direct, présence de leucocytes altérés et flore très abondante polymorphe de formes caractéristiques d'anaérobies *Fusobacterium, Clostridium ;*
     - culture stérile ou isolement d'un seul germe sans rapport avec l'aspect polymorphe de l'examen direct ;
     - selle stérile en aérobiose.
2. *Prévoir les bactéries qui seront probablement isolées* lors de la recherche d'anaérobies à partir de prélèvements pathologiques. Ainsi, en cas de péritonites, d'appendicites, abcès hépatiques, infections biliaires, ulcère de décubitus, abcès rectal, escarres, c'est la flore fécale anaérobie qui est isolée, dont principalement les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et *clostridies*. Lorsqu'il s'agit d'infections pulmonaires (pneumonies d'aspiration, abcès pulmonaires ou de sinusites et otites chroniques, de morsures humaines), ce sont les *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* et les GPAC de la flore buccale qui sont les pathogènes dominants. Il en est de même des infections gynécologiques, même si l'on isole parfois quelques *Bacteroides* ou *Clostridium*. Si les anaérobies sont toujours présents dans les prélèvements d'origine dentaire, en cas de parodontite, on recherchera principalement les paropathogènes *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia*, et *Tannerella forsythia.*
3. *Veiller à la qualité des prélèvements et prévoir des modes de transport adéquats* :
   - règles à appliquer aux prélèvements ;
   - éviter de prélever la flore normale de la muqueuse ;
   - préférer la ponction à l'aiguille après désinfection locale ;
   - préférer : aspirations, biopsies de tissus osseux, mous, sécrétions bronchiques profondes, liquides articulaires et péritonéaux ;
   - éviter de prélever : ulcères, plaies, escarres, abcès périrectaux, effluents de colostomie ou d'iléostomie, aspirations transtrachéales, selles (sauf *C. difficile*). Éviter les écouvillons et leur dessiccation ;
   - éviter l'oxygène ;
   - conserver le prélèvement en anaérobiose ;
   - acheminer le plus vite possible au laboratoire :
     - volume > 2 ml (pas de milieu de transport si acheminé au laboratoire < 6 heures) ;
     - volume < 2 ml (délai < 30 minutes ou milieu de transport obligatoire) ; dans tous les cas, le délai d'acheminement au laboratoire est inférieur à 24 heures.
   - conditions de transport :
     - récipient stérile, sachet plastique scellé avec mélange réducteur pour les biopsies (Génerbag®, Portagerm®), flacons d'hémocultures. Les biopsies peuvent être transportées en milieu de Rosenow ;
     - ne pas réfrigérer les prélèvements.
4. *Ensemencer des milieux de culture réduits* (annexe 41.1)
   - Les milieux liquides (*Brucella*, Rosenow, Schaedler) doivent être régénérés avant ensemencement par passage 15 minutes dans un bain-marie bouillant, puis la température est ramenée à 50 °C. Ils sont incubés en chambre anaérobie (à condition que les bouchons

**ANNEXE 41-1**

## Principaux milieux de culture

**Milieux liquides** (régénérer au bain-marie bouillant, 20 minutes)

**1. Bouillon Schaedler**

- Bouillon trypto-caséine-soja : 10 g
- Peptone spéciale : 5 g
- Glucose : 5 g
- Extrait de levure : 5 g
- Tampon Tris : 3 g
- Chlorhydrate de cystéine : 0,4 g
- Hémine : 0,01 g
- Eau distillée : qsp 1 l

**2. Milieu de Rosenow cystéiné**

- Peptone trypsique : 10 g
- Extrait de viande : 3 g
- Glucose : 2 g
- NaCl : 5 g
- Chlorhydrate de cystéine : 0,3 g
- Indicateur d'Andrade :

– (Fuchsine acide à 5 %) : 10 ml
– Eau distillée : qsp 1 l
– Marbre blanc : 1 morceau par tube
– Cervelle lyophilisée : 1 morceau par tube

**3. Bouillon *Brucella* anaérobie**

- Poudre pour bouillon *Brucella* : 28 g (voir infra)
- Solution d'hémine (5 mg/ml) : 1 ml
- Solution de vitamine K1 (1 mg/ml) : 1 ml
- Solution de bicarbonate (20 mg/ml) : 5 ml
- Eau : 900 ml

Faire bouillir jusqu'à dissolution. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.
Refroidir à 48 à 50 °C et ajouter 100 ml de sang de cheval lysé (mélange égal V/V de sang de cheval défibriné et d'eau distillée).
Stocker entre 4 et 8 °C.
La **poudre déshydratée pour milieux *Brucella* Difco** (bouillon ou gélose)

- Digestion pancréatique de caséine : 10 g
- Peptone de viande : 10 g
- Glucose : 1 g
- Extrait de levure : 2 g
- Chlorure de sodium : 5 g
- Bisulfite de sodium : 0,1 g

La **solution d'hémine** s'obtient par dissolution de 0,1 g d'hémine dans 2 ml de soude 1 N (40 g d'hydroxyde de sodium dans 1 litre d'eau distillée). Compléter à 20 ml par de l'eau distillée et autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Cette solution sera gardée à l'abri de la lumière à 4–8 °C pendant un maximum de 1 mois.
La **solution-mère de vitamine K1** se prépare par dissolution de 0,2 ml de vitamine K1 (3-phytylménadione) dans 20 ml d'éthanol à 95 %. Conservation possible au réfrigérateur pendant un an. Un millilitre de cette solution-mère sera placé dans 9 ml d'eau distillée pour obtenir une solution à 1 mg/ml qui sera ajoutée aux poudres déshydratées comme indiqué ci-dessus. Cette solution peut être conservée un mois au réfrigérateur.

**Milieux d'isolement non sélectifs**

**1. Milieu Columbia au sang pour anaérobies**

- Base Columbia : 42,5 g
- Eau distillée : qsp 1 litre

Autoclaver 15 minutes à 121 °C
Puis ajouter stérilement au milieu refroidi (45–50 °C)

- Sang de mouton : 50 ml
- Vitamine K : 1,5 mg
- Hémine : 10 mg

**2. Gélose Brucella anaérobie** d'isolement et pour l'antibiogramme

- Poudre pour gélose *Brucella* : 43 g
- Solution d'hémine (5 mg/ml) : 1 ml
- Solution de vitamine K1 (1 mg/ml) : 1 ml
- Eau distillée : 1000 ml

Faire bouillir jusqu'à dissolution.
Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.
Refroidir à 48 à 50 °C et ajouter 50 ml de sang laqué de mouton.
Stocker entre 4 et 8 °C.
Si le sang n'est pas ajouté, les milieux peuvent être conservés en tubes, flacons. Avant usage, fondre les milieux à 48 à 50 °C. Ajouter le sang de mouton à raison de 5 ml par flacon de 100 ml ou 1 ml par tube de 20 ml.
Le sang laqué est obtenu par congélation à –20 °C, puis décongélation lente, une nuit, entre 2 et 8 °C, ou rapide dans un bain-marie à 35 à 37 °C. Ramener la température du sang à 48 à 50 °C avant de l'ajouter aux milieux *Brucella*.

**3. Milieu de Wilkins-Chalgren** pour antibiogramme

- Trypticase : 10 g
- Peptone : 10 g
- Extrait de levure : 5 g
- Dextrose : 1 g
- NaCl : 5 g
- L-arginine : 1 g
- Pyruvate de sodium : 1 g
- Ménadione (vitamine K3) : 0,0005 g
- Hémine : 0,005 g
- Agar : 10 g
- Eau distillée : qsp 1 l

Autoclaver 15 minutes à 121 °C
Pour les bactéries exigeantes, ajouter le sang lorsque le milieu a refroidi (45 à 50 °C).

**Milieux gélosé sélectifs**

Il est nécessaire de préréduire les milieux en les plaçant en anaérobiose quelques heures avant utilisation.

**1. Gélose Columbia + ANC**

Il s'agit d'un milieu gélosé Columbia + 5 % de sang de mouton que l'on a rendu sélectif pour les bactéries à Gram positif en lui ajoutant des antibiotiques (acide nalidixique et colistine).

**2. Gélose Schaedler néomycine vancomycine + 5 % sang de mouton**

Ce milieu contient de la néomycine et de la vancomycine et permet la croissance de tous les bacilles

▶

anaérobies à Gram négatif et plus particulièrement *Bacteroides* et *Prevotella.*
Ces deux milieux sont commercialisés en boîtes de Petri prêtes à l'emploi.

**3. *Milieu Bacteroides Bile Esculine***

- Milieu spécifique des *Bacteroides* du groupe *fragilis*
- Trypticase soja : 40 g
- Bile de bœuf : 20 g
- Esculine : 1 g
- Citrate de fer ammoniacal : 0,5 g
- Hémine (solution 5 mg/ml) : 2 ml
- Gentamicine (solution 40 mg/ml) : 2,5 ml
- Eau distillée : qsp 1 l
- Ajuster à pH 7,0, faire dissoudre, autoclaver 15 minutes à 121 °C.

**Milieu LKV**

Gélose *Brucella* avec kanamycine et vancomycine qui permet la pousse des *Bacteroides* et des *Prevotella.*

- *Brucella agar* (BBL ou Difco) : 43 g
- Solution d'hémine à 5 mg/ml : 1 ml
- Solution de vitamine K1 à 10 mg/ml : 1 ml
- Solution de kanamycine (100 mg/ml) : 0,75 ml
- Eau distillée : qsp 1 l

Autoclaver 15 minutes à 121 °C
Ajouter :

- Solution de vancomycine (7,5 mg/ml) : 1 ml
- Sang laqué de mouton : 50 ml

**Milieu pour *Clostridium difficile* CCA**

Il s'agit d'un milieu gélosé Columbia + 5 % de sang de mouton supplémenté en cyclosérine (250 mg/l), céfoxitine (8 mg/l) et amphotéricine B (2 mg/l).
Milieux gélosés en tube pour déterminer le type respiratoire et vérifier la pureté des souches. Ces milieux permettent de faire la distinction entre une bactérie anaérobie stricte (croissance en profondeur), aérobie stricte (croissance en surface), aéro-anaérobie facultative (croissance sur toute la hauteur) ou microaérophile (croissance à partir de 3 à 5 mm en dessous de la surface).

- **Milieu Schaedler-vitamine K3 gélosé à 2 pour 1000**

Régénérer au bain-marie bouillant 20 minutes.
Ensemencer en profondeur à l'aide d'une pipette Pasteur.

- **Milieu à l'extrait de viande et de levure**

– Peptone : 10 g
– NaCl : 5 g
– Extrait de viande : 2 g
– Extrait de levure : 5 g
– Chlorhydrate de cystéine : 0,3 g
– Glucose : 2 g
– Eau distillée : qsp 1 l

Ajuster le pH à 7,4 à 7,5 et ajouter :

- Agar : 8 g

Porter à ébullition, répartir en tubes étroits (8 × 180 mm) et autoclaver 15 minutes à 121 °C.
Au moment de l'emploi :

- faire fondre au bain-marie ;
- plonger dans un bain-marie à 50 °C et laisser s'équilibrer la température ;
- ensemencer par quelques gouttes d'une culture en bouillon de la bactérie à étudier ;
- retourner le tube plusieurs fois ;
- plonger dans l'eau froide et laisser solidifier ;
- incuber à 36 °C.

Ce milieu peut être supplémenté par de la bile (20 %) ou du vert brillant et permet alors une orientation pour l'identification.

permettent les échanges gazeux) ou en aérobiose après avoir coulé une fine couche de paraffine.

- Les milieux gélosés doivent être coulés en boîtes de Petri le jour même ou être conservés en anaérobiose.
- Si l'examen direct montre une flore monomorphe, on peut se contenter d'un milieu solide non sélectif (gélose Columbia ou *Brucella* + 5 % de sang de mouton).
  – Si une flore polymorphe est présente, il est conseillé d'ensemencer en plus quelques milieux sélectifs ;
  – gélose Schaedler + sang de mouton + néomycine + vancomycine ou *Brucella* + vancomycine + kanamycine au sang laqué pour les bacilles à Gram négatif (*Bacteroides, Prevotella, Fusobacterium*) ;
  – gélose BBE : bile + esculine + gentamicine (*Bacteroides fragilis, Bilophila wadsworthia*).
- Il paraît souhaitable d'ensemencer *systématiquement* un milieu liquide (Schaedler + vitamine K3, *Brucella* anaérobie ou Rosenow cystéiné) ; certaines bactéries ne cultivent pas directement sur les milieux solides.
- Les géloses type cyclosérine, céfoxitine, fructose sont employées pour isoler *Clostridium difficile* à partir de selles diarrhéiques.
- Plusieurs milieux *Brucella* anaérobies sont commercialisés et n'ont pas la même composition ; il faut employer ceux qui contiennent de l'extrait de levure (Difco). Certaines bactéries exigeantes nécessitent l'addition de suppléments comme la ménadione (1 µg/ml), l'hémine (5 µg/ml).

5. *Respecter les conditions d'anaérobiose* et les délais d'incubation. Une fois ensemencés, les milieux de culture seront le plus rapidement possible placés en anaérobiose. La culture des bactéries anaérobies requiert la création rapide d'une atmosphère dont le taux d'oxygène ne doit pas être supérieur à 1 %. Il est souhaitable de travailler en anaérobiose continue en utilisant des enceintes anaérobies (Don Whitley, AES ou Ruskin, Jouan). En l'absence de chambre anaérobie, on utilisera soit des jarres avec des systèmes d'évacuation-remplacement du gaz type Anaxomat®, soit des jarres ou sachets plastiques individuels avec des systèmes générateurs d'anaérobiose. Les évolutions successives ont rendu l'obtention de l'atmosphère anaérobie

plus rapide et sans catalyseur. Il faut toutefois vérifier l'étanchéité des jarres et la qualité des barrettes de fermeture des sachets, par exemple avec les bandelettes témoin d'anaérobiose. S'il est possible d'observer à tout moment l'apparition de colonies en chambre anaérobie, dès que l'on utilise des jarres ou des sachets individuels, on s'astreindra à ne les ouvrir qu'après *48 heures d'incubation*. Il est souhaitable de garder les boîtes 7 jours en anaérobiose et jusqu'à 2 semaines pour les *Actinomyces*. Ne jamais ouvrir une jarre pour ajouter d'autres boîtes de Petri.

6. *Suspecter les anaérobies* en examinant les cultures sur boîtes. Comme les anaérobies sont souvent en culture mixte avec des aéro-anaérobies facultatifs, la présence d'anaérobie est envisagée si l'on a une mauvaise odeur à l'ouverture de la jarre, plus de colonies en anaérobiose que sur les milieux incubés sous $CO_2$, une culture sur milieu sélectif BBE, des colonies noires ou fluorescentes sous UV sur gélose *Brucella* ou gélose kanamycine-vancomycine. Il est conseillé de réaliser des subcultures pour vérifier la pureté des souches (penser à garder les boîtes de premier isolement au cas où la subculture ne se ferait pas), de vérifier l'anaérobiose soit en réalisant un type respiratoire, soit en incubant en aérobiose ou sous $CO_2$. Certains *Clostridium* et beaucoup d'*Actinomyces* et de propionibactéries sont aérotolérants. Dans tous les cas, ne pas laisser les boîtes plus de 15 minutes à l'air libre.

## Identification des anaérobies stricts

Dans bien des circonstances, il n'est pas nécessaire d'identifier tous les anaérobies isolés. Il faut connaître les grands pathogènes, à savoir les *Clostridium*, *Actinomyces* et les bacilles à Gram négatif.

L'*orientation présomptive* utilise des méthodes simples accessibles par tous les laboratoires :

- la coloration de Gram qui est déterminante pour la conduite de l'identification (fig. 41.1) ; elle est délicate à réaliser et à interpréter dans le cas des bactéries anaérobies. Certains *Clostridium* peuvent apparaître Gram négatifs tels les *Clostridium* du groupe RIC (*C. ramosum, C. innocuum, C. clostridioforme*) ;
- la recherche de l'oxydase et de la catalase ;
- la culture en présence d'antibiotiques (kanamycine, colistine, vancomycine) et d'inhibiteurs (bile et vert brillant).

L'*identification finale* nécessite l'étude de la fermentation des sucres, la production d'indole et quelques caractères enzymatiques. La galerie API 20® est très utile pour étudier la fermentation des sucres. Lorsque les bactéries ne sont pas glucidolytiques, on préférera les galeries Rapid ANA II® ou API Ana ID 32®. Parfois, ces galeries se trompent totalement ; aussi est-il toujours nécessaire de confronter les résultats avec l'identification présomptive, en particulier avec la sensibilité à la kanamycine, la colistine, la vancomycine et à la bile.

### Identification des bacilles à Gram positif sporulés ou *Clostridium*

Certaines espèces ne sporulent que très difficilement, comme *Clostridium ramosum*. Il est donc souhaitable de réaliser un test de sporulation après chauffage à 80 °C pendant 10 minutes.

Les *Clostridium* sont sensibles à la vancomycine et résistants à la colistine. Classiquement, on distingue trois grands groupes de *Clostridium* (tableau 41.1) :

- les souches glucidolytiques, non protéolytiques ;
- les souches glucidolytiques et protéolytiques ;
- les souches protéolytiques non glucidolytiques ou faiblement glucidolytiques.

La culture de *C. septicum* ou de *C. tetani* pose des problèmes. Leur croissance sur milieu gélosé se fait en nappe ; il est donc difficile de les isoler en culture pure. Il faut chauffer la culture à 80 °C pour éliminer les autres bactéries ou utiliser des milieux hypergélosés.

Le diagnostic du tétanos est essentiellement clinique ; la bactérie peut être recherchée à partir de la plaie. Au cours du botulisme, c'est dans le sang, le liquide gastrique ou l'aliment suspect que se fera la recherche de la toxine (annexe 41.2), maintenant par des techniques de biologie moléculaire. En cas de colite pseudomembraneuse ou de diarrhée suite à un traitement par les antibiotiques, on recherchera la production des toxines A et B à partir des selles fraîches (annexe 41.3) et l'on ensemencera un milieu sélectif de *C. difficile*. L'aspect des colonies et l'odeur de crottin de cheval permettent de s'orienter rapidement. À noter que l'épidémie de 2006 dans le nord de la France est due à un sérotype 027 dont la caractéristique est de cultiver au contact d'un disque de lévofloxacine et d'érythromycine.

Les colonies de *Clostridium perfringens* apparaissent plates, irrégulières, hémolytiques. Placées 1 heure à +4 °C après leur croissance, on peut noter deux halos d'hémolyse : une zone d'hémolyse complète au contact de la colonie et un halo trouble de lyse incomplète (α-hémolyse). Ce micro-organisme est fortement glucidolytique, protéolytique, très gazogène, coagule et digère le lait.

### Identification des bacilles à Gram positif non sporulés

L'identification est fondée sur les caractères culturaux, les caractères morphologiques, la fermentation des glucides et la production d'indole qui peuvent être recherchés à l'aide de galeries d'identification API 20A®, à condition d'utiliser un inoculum très riche (3 à 5 sur l'échelle de McFarland), la présence d'une catalase et des caractères enzymatiques recherchés à l'aide des galeries d'identification rapides.

Sur le plan morphologique, on distingue :

- des bacilles réguliers, plus ou moins allongés : *Eubacterium, Lactobacillus* ;

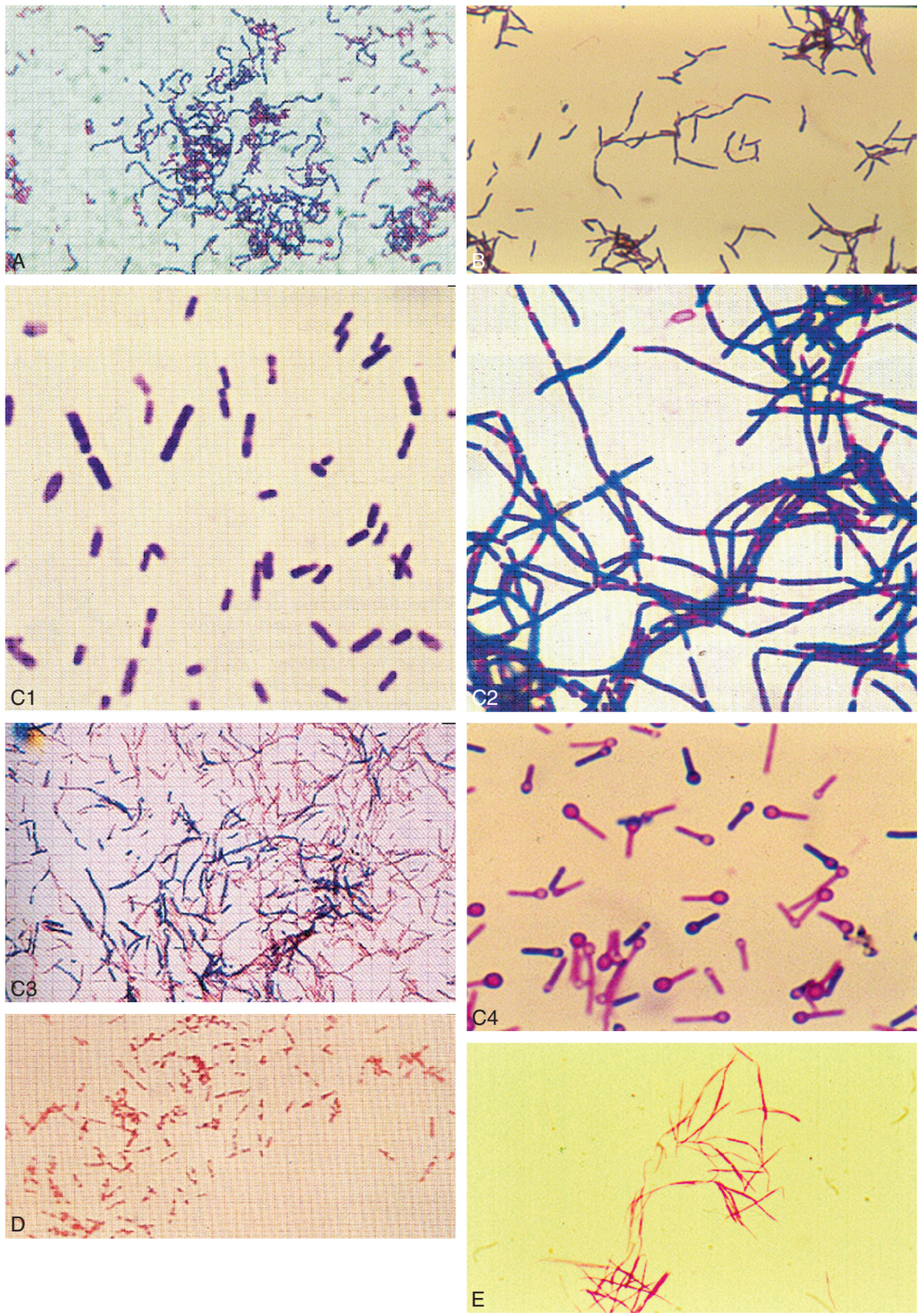



**Fig. 41.1.** – *Morphologie représentative des différentes espèces bactériennes.*
A) Peptostreptococcus ; B) Actinomyces israelii ; C) Clostridium perfringens (1) ; Clostridium septicum (2) ; Clostridium ramosum (3) ; Clostridium tetani (4) ; D) Bacteroides ; E) Fusobacterium nucleatum.

**TABLEAU 41-1**

**Identification des principaux *Clostridium* d'intérêt clinique.**

| | | | | | | | | | | Chromatographie en phase gazeuse |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Glucose* | *Lactose* | *Saccharose* | *Mannitol* | *Esculine* | *Gélatinase* | *Lécithinase* | *Indole* | *Lait* | *Type fermentaire* |
| **Souches saccharolytiques** | | | | | | | | | | |
| *C. baratii* | + | + | + | – | + | – | + | + | C | B, A, L (p, s) |
| *C. butyricum* | + | + | + | – | + | – | – | + | C | B, A |
| *C. clostridioforme* | + | V | + | – | + | – | – | – | v | A (l, s) |
| *C. innocuum* | + | – | + | + | + | – | – | + | – | B, L, a |
| *C. ramosum* | + | + | + | + | + | – | – | + | – | A, l (s) |
| **Souches saccharolytiques et protéolytiques** | | | | | | | | | | |
| *C. bifermentans* | + | – | – | – | + | + | + | + | D | A, (iv, ib, b, l, s) |
| *C. botulinum* | | | | | | | | | | |
| Types A, B, F | + | – | – | – | + | + | – | – | D | A, B, IV, ib |
| Types B, E, F | + | – | + | – | – | + | – | – | C | B, A |
| Types C, D | + | – | – | – | – | + | – | – | D | B, P, A |
| *C. difficile* | + | – | – | V | + | + | – | – | | B, A, ic, iv, ib |
| *C. perfringens* | + | + | + | – | V | + | + | – | C, D | A, B, L |
| *C. septicum* | + | + | – | – | + | + | – | – | C | B, A |
| *C. sporogenes* | + | – | – | – | + | + | – | – | D | A, B, IV, ib |
| *C. sordelii* | + | – | – | – | v | + | + | + | D | A, IC |
| **Souches protéolytiques** | | | | | | | | | | |
| *C. argentinense* | – | – | – | – | – | + | – | – | D | A, b, ib, iv |
| *C. histolyticum* | – | – | – | – | – | + | – | – | D | A, l |
| *C. limosum* | – | – | – | – | – | + | + | – | D | A, l |
| *C. subterminale* | – | – | – | – | – | + | – | – | D | A, B, IV, ib |
| *C. tetani* | – | – | – | – | – | + | – | – | D | A, B, p |

C : lait coagulé
D : lait digéré
A, a : acide acétique-B
B, b : acide butyrique-IB
IB, ib : acide isobutyrique-IV
IV, iv : acide isovalérique-IC
IC, ic : acide isocaproïque-L
L, l : acide lactique
s : acide succinique
V : variable
*C. sordelii* est uréase +; *C. septicum* et *C. histolyticum* poussent en aérobiose; *C. difficile* est L-proline-aminopeptidase +.

**ANNEXE 41.2**

## Recherche de la toxine botulique et toxinotypie

La recherche de la toxine botulique peut se faire sur l'aliment suspect quand il est disponible, mais aussi sur le sérum du malade.

### Échantillon à analyser

• Pour le sérum du malade, il faut prévoir 20 ml de sang afin de pouvoir disposer d'au moins 10 ml de sérum. Ce sérum sera utilisé tel quel sans aucune préparation ni adjonction d'additif. Il constitue l'échantillon.
• Si l'aliment suspect est liquide, il sera centrifugé et le surnageant sera recueilli. Un volume d'au moins 10 ml est nécessaire et, au besoin, on complétera par de l'eau physiologique. Ce surnageant sera additionné de 600 mg/ml de pénicilline G s'il n'est pas possible de le stériliser par filtration. Il constitue l'échantillon.
• Si l'aliment suspect est solide (jambon), il faudra préparer un extrait. On prélèvera dans une zone suspecte – souvent près de l'os – 10 à 15 g d'aliment que l'on broiera au mortier dans 20 ml d'eau physiologique. L'emploi d'un mixeur n'est pas recommandé, car il risque de se produire une oxydation du produit et une dégradation de la toxine. Ce broyat sera laissé à 20 °C pendant 15 minutes puis centrifugé à 4000 tours/min pendant 15 minutes. On ajoutera, comme pour l'aliment liquide, 600 mg/ml de pénicilline G au surnageant qui constitue l'échantillon.

### Détermination de la dose minimale mortelle pour la souris

À partir de 2 ml de l'échantillon, des dilutions de $10^{-1}$ à $10^{-5}$ seront réalisées en eau physiologique stérile. Chaque dilution est injectée par voie intrapéritonéale à la souris : 1 ml par souris, 2 souris par dilution. On peut injecter avec la même seringue en commençant par la dilution $10^{-5}$. Les souris sont observées pendant 48 heures. La dernière dilution tuant les deux souris injectées contient une dose minimale mortelle (DMM).

Cette étape n'est intéressante que lorsqu'on a des difficultés d'interprétation de la toxinotypie.

### Toxinotypie

La toxinotypie peut être tentée sur l'échantillon brut non dilué. À 2 ml de l'échantillon, on ajoutera 0,1 ml d'un des antisérums A, B, C, D ou E. Cette dose d'antisérum permet de neutraliser 100 DMM. Le contact échantillon–antisérum sera maintenu 30 minutes à 37 °C ou 2 heures à 22 °C si le titre toxique est faible. Chacun des mélanges échantillon–antisérum sera injecté à la souris : 1 ml par souris, 2 souris par mélange en changeant de seringue pour chaque mélange. Les souris sont observées pendant 48 heures :
• toutes les souris meurent sauf celles protégées par un des antisérums. Le type de la toxine est déterminé par la nature de l'antisérum ;
• aucune des souris ne meurt. Le diagnostic est négatif ou l'échantillon contient moins d'une DMM. La recherche sera répondue negative ;
• toutes les souris meurent. L'échantillon pouvait contenir plus de 100 DMM. Dans ce cas, on recommencera l'épreuve en diluant l'échantillon de façon qu'il contiennne 5 à 10 DMM. Si le titre toxique est faible – moins de 100 DMM –, il peut s'agir d'une association de deux toxines. Il faudra alors recommencer l'épreuve en mélangeant deux à deux les antisérums. Cette éventualité de deux toxines est rare mais non exceptionnelle.
Actuellement, les antisérums n'étant pas disponibles dans le commerce, la recherche de toxine botulique sur produits biologiques d'origine humaine est pratiquée sur matériel adressé au : CNR Bactéries anaérobies et Institut Pasteur, Dr Michel R. Popoff, Botulisme, Unité Bactéries anaérobies et toxines, 25–28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex.
Les aliments doivent être adressés pour analyse aux laboratoires vétérinaires.

• des bacilles diphtérimorphes présentant parfois des pseudoramifications : *Propionibacterium, Bifidobacterium* et *Actinomyces*.

Les évolutions de la taxonomie ont bouleversé les classifications. Ainsi, parmi les nombreuses espèces d'*Eubacterium* le genre *Eubacterium* ne retient que les souches glucidolytiques mais d'autres genres glucidolytiques ont été créés, *Atopobium, Coprobacillus, Corobacterium, Collinsella.* Les espèces non glucidolytiques ont été mises dans les genres *Eggerthella, Mogibacterium et Slackia* (tableau 41.2). Les bifides non pathogènes ne seront pas identifiés en routine.

Parmi les propionibactéries, *P. acnes* possède les caractères d'identification suivants : catalase +, indole +, réduction des nitrates +.

S'il est important de signaler la présence d'*Actinomyces* au clinicien, l'identification à l'espèce est parfois difficile, avec plus de 30 espèces dans ce genre et les genres apparentés *Actinobaculum, Arcanobacterium, Varibaculum.*

Les espèces du genre *Mobiluncus*, bactéries incurvées, mobiles, à flagelles subpolaires, sont des hôtes de la cavité vaginale de femme normale. Elles sont responsables des vaginoses bactériennes avec d'autres bactéries anaérobies (*Prevotella bivia, Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*) et *Gardnerella vaginalis*. Les souches de *Mobiluncus* apparaissent à Gram négatif ou Gram variable ; elles sont en fait à Gram positif. La culture peut être réalisée sur Columbia enrichi de 5 % de sang de mouton. On peut rendre le milieu sélectif en utilisant le mélange colistine (10 µg/ml) et acide nalidixique (15 µg/ml).

**ANNEXE 41.3**

## Recherche de la toxine de *Clostridium difficile*

La grande majorité des souches produisent simultanément les toxines A et B. Leur mise en évidence, directement à partir des selles, est un excellent marqueur de la présence d'une souche toxinogène de *C. difficile*.

La méthode de référence consiste à rechercher un effet cytopathogène (ECP) de la toxine B par culture cellulaire (lignées cellulaires MRC5, Vero, CHO, HeP2). Cette méthode présente une excellente sensibilité ; elle n'est pas standardisée et nécessite une infrastructure lourde avec un délai de réponse de plusieurs jours.

Des tests immuno-enzymatiques ou immunochromatographiques ont été développés. Ils détectent soit la toxine A seule, soit les toxines A et B au moyen d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Les tests unitaires rapides permettent de rendre un résultat en moins de 30 minutes.

Certaines souches ne produisant que la toxine B, on doit privilégier les tests qui recherchent simultanément les deux toxines.

Une autre approche recherche la toxine A et détecte en même temps une glutamate déshydrogénase (GDH), enzyme spécifique de *C. difficile* que les souches soient ou non toxinogènes (Triage *C. difficile* panel®, Biosite Diagnostics).

La sensibilité des trousses de détection de la toxine A est d'environ 80 % ; l'addition du test GDV permet d'accroître la valeur prédictive négative. La négativité des deux tests signifie que la présence d'une souche toxinogène peut être exclue avec une fiabilité de 99,6 %.

Les nouveaux tests immunochromatographiques (Immuno Card Toxines A & B® ICTAB ; Meridian, X-Pect®, Oxoid) ont des performances excellentes en termes de sensibilité (86 à 91 %) et de spécificité (96 à 97 %), supérieures à celles de la PCR en temps réel.

**TABLEAU 41-2**

**Modifications dans la classification des *Eubacterium*.**

| *Nouvelle dénomination* | *Ancienne dénomination* | *CPG** | *Lieu d'isolement* |
|---|---|---|---|
| **Souches glucidolytiques** | | | |
| *Pseudoramibacter alactolyticum* | *Eubacterium alactolyticum* | A.B.C. | Pulmonaire |
| *Collinsella aerofaciens* | *Eubacterium aerofaciens* | A. | Tube digestif |
| *Holdemia filiformis* | Nouvelle espèce | A. l. | Tube digestif |
| *Coprobacillus catenaformis* | Nouvelle espèce | a. b. l. | Tube digestif |
| *Catinabacterium mitsuokai* | *Lactobacillus catenaforme* | a. ib. b. l. | Tube digestif |
| *Coriobacterium glomerans* | Nouvelle espèce | a. B. | Tube digestif |
| **Souches non glucidolytiques** | | | |
| *Atopobium minutum* | *Eubacterium minutum* | a. b. | Buccodentaire |
| *Eggerthella lenta* | *Eubacterium lentum* | a. | Tube digestif |
| *Mogibacterium timidum* | *Eubacterium timidum* | a. pha | Buccodentaire |
| *Slackia exigua* | *Eubacterium exiguum* | a. | Buccodentaire |

A, a : acide acétique
B, b : acide butyrique
ib : acide isobutyrique
C, c : acide caproïque
l : acide lactique
pha : acide phényl acétique
* Chromatographie en phase gazeuse.

## Identification des bacilles à Gram négatif

Les bacilles plus fréquemment isolés sont les *Bacteroides* du groupe *fragilis*, les *Prevotella*, *Fusobacterium* et *Porphyromonas*.

L'identification présomptive (tableau 41.3) est très importante ; elle permet de s'orienter et de vérifier que les résultats obtenus avec les galeries commercialisées sont compatibles. Ainsi, un bacille à Gram négatif dont la culture est favorisée par la bile, résistant à kanamycine, vancomycine et colistine, est un *Bacteroides* du groupe *fragilis* avec deux genres, *Bacteroides* ou *Parabacteroides*. *B. eggerthii*, bien que saccharose négatif, est assimilé au groupe *fragilis* dans lequel de nouvelles espèces sont apparues (tableau 41.4). Il en est de même pour *Odoribacter splanchnicus*, ex-*B. splanchnicus*.

**TABLEAU 41-3**

**Identification des bacilles à Gram négatif : caractères d'orientation.**

| *Bacilles* | *Bile 5 mg* | *Vert brillant 100 mg* | *Colistine 10 µg* | *Kanamycine 1 mg* | *Vancomycine 5 µg* | *Fermentation du glucose* | *Pigment noir* | *Catalase* | *Uréase* | *Oxydase* | *Mobilité* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Groupe I | | | | | | | | | | | |
| *Bacteroides* du groupe *fragilis* | R | S | R | R | R | + | – | v | – | – | – |
| Groupe II *Prevotella* | | | | | | | | | | | |
| *Prevotella* non pigmentées | S | S | V | R | R | + | – | – | – | – | – |
| *Prevotella* pigmentées | S | S | V | R | R | + | + | – | – | – | – |
| Groupe III | | | | | | | | | | | |
| *Porphyromonas* | S | S | R | R | S | – | + | v | – | – | – |
| Groupe IV | | | | | | | | | | | |
| *Fusobacterium* | V | R | S | S | R | v | – | – | – | – | – |
| Groupe V (asaccharolytiques) | | | | | | | | | | | |
| *Bilophila wadsworthia* | R | | S | S/R | R | – | – | + | + | – | – |
| *B. ureolyticus* | S | S | S | S | R | – | – | – | | – | – |
| *Suterella wadsworthenisis* | R | | S | S | R | – | – | – | – | | – |
| *Bacteroides* spp. | V | | V | R | R | –/f | – | V | – | | – |
| *Desulfovibrio* | V | | R | S | R | – | – | V | –/+ | | – |
| *Dialister pneumosintes* | S | | R | S | R | – | – | – | – | | – |
| Groupe VI | | | | | | | | | | | |
| Saccharolytiques et mobiles | V | | S | S | R | + | – | – | – | – | + |
| *Selenomonas* spp. | S | | R/s | S | R | + | – | – | | | – |
| *Anaerorhabdus furcosus* | R | | | | | f | – | – | – | – | – |
| Autres | | | | | | | | | | | |
| *Anaerobiospirillum* | S/R | | S/R | S | R | | | – | – | | + |

S : sensible, R : résistant, V : variable, f : faible, s : parfois sensible.
La plupart des *Fusobacterium* sont nitrates réductase 0.
Bacilles Gram –; vancomycine R; kanamycine S.
– Colistine R avec $H_2S$ +++ :
*Desulfomonas* (immobile); *Desulfovibrio* (mobile)
*Selenomonas* (colistine peut être S [incurvé mobile])
– Colistine S :
Colonie large : *Fusobacterium* et *Leptotrichia* (colonie en aspect de cervelle)
Petite colonie : *Campylobacter*, *Bilophila* (catalase et urée ++)
*Suterella* (bile R, catalase et urée O, nitrates réductase +)
*B. ureolyticus* (uréase +, sensible au vert brillant).

**Caractères d'identification des *Bacteroides* du groupe *fragilis* (*Bacteroides*, *Odoribacter* et *Parabacteroides*) (bacilles dont la culture est favorisée par la bile et glucidolytiques).**

| *Souche indole +* | *Catalase* | *Fermentation des sucres* | | | | | | | *Hydrolyse de l'esculine* | *α fucosidase* | *Acides produits à partir du glucose* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Arabinose* | *Cellobiose* | *Rhamnose* | *Salicine* | *Saccharose* | *Tréhalose* | *Xylane* | | | *(CPG)* |
| *B. clarus* | – | – | + | + | f | + | f | | + | – | |
| *B. eggerthii* | – | + | – | + | – | – | – | + | + | – | A, p, S |
| *B. faecis** | – | + | + | + | – | + | – | | + | + | |
| *B. flexus* | – | + | + | + | + | + | + | | + | + | |
| *B. intestinalis* | ND | + | + | + | – | + | – | | + | + | + |
| *B. nordii* | – | – | + | + | + | + | – | – | + | – | |
| *B. oleiciplenus* | + | + | + | + | + | + | + | | + | – | |
| *B. ovatus* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | A, p, S, pa |
| *B. salyersae* | | + | | | – | | – | | | – | |
| *O. splanchnicus* | – | + | – | – | – | – | – | – | + | + | A, p, S, ib, iv, pa |
| *B. stercoris* | + | – | – | + | – | + | + | + | + | v | A, p, S |
| *B. thetaiotaomicron* | + | + | + | + | – | + | + | – | + | + | A, p, S, pa |
| *B. uniformis* | – | + | + | – | + | + | – | v | + | + | a, p, s |

(*Suite*)

**TABLEAU 41-4**

**Suite.**

| *Souche indole –* | *Catalase* | *Fermentation des sucres* | | | | | | | *Hydrolyse de l'esculine* | *α fucosidase* | *β-glucuronidase* | *CPG* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Arabinose* | *Cellobiose* | *Rhamnose* | *Salicine* | *Saccharose* | *Tréhalose* | *Xylane* | | | | |
| *B. caccae* | – | + | + | + | – | + | + | – | + | + | | A, p, S |
| *B. coprocola* | – | – | + | + | + | + | – | | + | + | – | |
| *P. distasonis* | + | – | + | +/V | + | + | + | – | + | – | – | A, p, S, pa |
| *B. dorei* | | + | – | + | – | + | – | | – | + | | |
| *B. finegoldii* | | + | + | + | + | + | – | | | – | | |
| *B. fragilis* | + | – | + | – | – | + | – | – | + | + | | A, p, S, pa |
| *P. goldsteinii* | v | – | + | + | | + | – | – | + | – | + | |
| *P. gordonii* | – | + | – | – | – | + | – | | – | – | – | |
| *B. helcogenes* | | – | + | – | + | + | – | | + | + | + | |
| *P. johnsonii* | + | + | – | + | – | + | + | | + | – | + | SA |
| *B. massiliensis* | – | – | – | – | – | + | – | | + | + | – | |
| *P. merdae* | – | – | v | + | + | + | + | – | + | – | + | A, p, S |
| *B. plebeius* | – | + | + | + | – | + | – | | + | + | + | |
| *B. vulgatus* | – | + | – | + | – | + | – | – | – | + | + | A, p, S |

* Sensible à la bile.
CPG : chromatographie en phase gazeuse ; A : acide acétique ; p : propionique ; S : succinique ; ib : isobutyrique ; iv : isovalérique ; pa : phénylacétique ; f : faible ; v : variable.
*Odoribacter splanchnicus* (ex-*B. splanchnicus*) et *B. eggerthii* n'appartiennent pas au groupe *fragilis*.

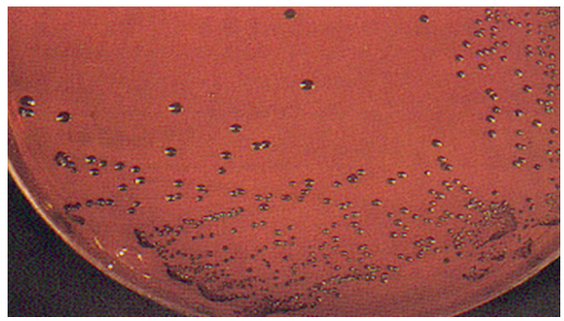


**Fig. 41.2.** – *Aspect des colonies de* Prevotella.

aLes *Prevotella* (fig. 41.2) sont résistantes à la kanamycine, la vancomycine et de sensibilité variable à la colistine selon les espèces. En cas de résistance à la colistine, ce qui les différencie des *Bacteroides* est l'absence de croissance autour du disque de bile. On distingue classiquement les *Prevotella* qui produisent un pigment noir (dont l'observation est parfois longue et difficile) des *Prevotella* non pigmentées (tableau 41.5). Parmi les *Prevotella* pigmentées, *P. denticola*, *P. loeschii* et *P. melaninogenica* fermentent le lactose ; et ne fermentent pas le lactose *P. corporis*, saccharose négatif, et le groupe *P. nigrescens, P. intermedia, P. pallens, P. falsenii, P. aurantiaca* (ces cinq dernières étant difficilement séparées par les seuls caractères phénotypiques), saccharose positif.

Les *Prevotella* non pigmentées sont divisées en trois sous-groupes. Le premier est protéolytique, ne fermente ni le saccharose, ni les pentoses (arabinose et xylose) ; il comprend *P. bivia* (lactose +) et *P. disiens* (lactose –). Les deux autres sous-groupes fermentent le saccharose ; l'un fermente les pentoses (*P. buccae, P. dentalis, P. oris*) ; l'autre ne fermente pas les pentoses (*P. buccalis, P. oralis P. veroralis*).

Les *Porphyromonas* sont caractérisés par une pigmentation noire des colonies, une sensibilité à la vancomycine. Trois espèces sont importantes en pathologie humaine (tableau 41.6). Il est à noter que les espèces d'origine humaine sont catalase négative, tandis que les souches d'origine animale que l'on isole après griffure ou morsure de chiens et de chats sont catalase positive.

Les *Fusobacterium* (tableau 41.7) sont sensibles à la kanamycine et à la colistine. Ils cultivent en présence de vert brillant comme *Bacteroides ureolyticus ;* ce dernier donne des colonies qui corrodent la gélose. Quatre

**TABLEAU 41-5**

**Caractères phénotypiques de 28 espèces de *Prevotella*.**

| *Caractères* | *1* | *2* | *3* | *4* | *5* | *6* | *7* | *8* | *9* | *10* | *11* | *12* | *13* | *14* | *15* | *16* | *17* | *18* | *19* | *20* | *21* | *22* | *23* | *24* | *25* | *26* | *27* | *28* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pigment* | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | – | – | – | + | + | – | – | – | – | – | + | + | + | + | – | + | – |
| Fermentation de : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arabinose | + | + | + | + | + | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Cellobiose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | v | + | + | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Lactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | v | – | – | – | – | – | – |
| Mannose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | v | + | v | v | + | + | v | – | – |
| Raffinose | + | + | + | + | – | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – | – | – | v | v | + | – | – | + | – |
| Salicine | + | – | + | + | + | + | + | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Saccharose | + | f | + | + | – | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – | – | – | v | + | + | – | – | + | – |
| Production d'indole | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | + | – | – | + | – |
| Hydrolyse de l'esculine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – | + | v | – | + | – | – | v | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Liquéfaction de la gélatine | + | – | v | – | – | 0 | v | f | – | – | + | v | + | + | + | + | – | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| α–fucosidase | | | + | + | 0 | | | f | | + | + | + | v | | + | + | | + | + | | + | | | + | + | 0 | 0 | |
| Glutamyl glutamic arylamidase | | | 0 | + | 0 | | | | | + | | | | | | | | + | – | – | | | | | | | | |

Espèces : 1, *P. buccae* ; 2, *P. dentalis* ; 3, *P. oris* ; 4, *P. salivae* ; 5, *P. bergensis* ; 6, *P. maculosa* ; 7, *P. oralis* ; 8, *P. baroniae* ; 9, *P. buccalis* ; 10, *P. nanceiensis* ; 11, *P. loescheii* ; 12, *P. veroralis* ; 13, *P. multiformis* ; 14, *P. denticola* ; 15, *P. melaninogenica* ; 16, *P. shahii* ; 17, *P. oulorum* ; 18, *P. pleuritidis* ; 19, *P. timonensis* ; 20, *P. enoeca* ; 21, *P. bivia* ; 22, *P. tannerae* ; 23, *P. intermedia* ; 24, *P. nigrescens* ; 25, *P. corporis* ; 26, *P. marshii* ; 27, *P. pallens* ; 28, *P. disiens*.

f : faible ; v : variable.

* La pigmentation sur gélose au sang peut nécessiter jusque 14 jours et varie de marron à noir selon les espèces.

**TABLEAU 41-6**

**Caractères d'identification des *Porphyromonas*.**

| | Catalase | Fluorescence (culture jeune) | Lipase | Indole | Trypsine | Chymotrypsine | α gal | β gal | Arginine aryl-amidase | β NAG | α fuco-sidase | Production d'acide phénylacétique | Source |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *P. asaccharolytica* | – | + | – | + | – | – | – | – | – | – | + | – | Humaine |
| *P. gingivalis* | – | – | – | + | + | – | – | – | + | + | – | + | Humaine |
| *P. endodontalis* | – | + | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | Humaine |

*P. asaccharolytica, P. gingivalis* et *P. endodontalis;* glucose –, saccharose –, lactose –, cellobiose –, salicine –, colistine R.

espèces sont fréquemment isolées, *F. nucleatum, F. necrophorum*, *F. varium* et *F. mortiferum*. Les trois dernières espèces cultivent en présence de bile. Les *Fusobacterium* fermentent peu les sucres, ce qui évite de les confondre avec des bactéries qui, après coloration de Gram, présentent une morphologie en fuseau. On peut les confondre avec des bactéries qui fermentent les sucres dont le saccharose, comme les *Leptotrichia* (bacilles plus gros que les *Fusobacterium*) ou les *Capnocytophaga* dont les colonies sont jaunes et capables de cultiver sous $CO_2$. De plus, *Capnocytophaga* est résistant au métronidazole.

Il existe de nombreuses autres espèces qui fermentent peu ou pas les sucres. On se reportera à des ouvrages de référence (voir les références).

## Identification des cocci anaérobies stricts

### *Cocci à Gram négatif*

S'il existe plusieurs genres, c'est *Veillonella parvula* (catalase +, nitrates-réductase +, ne fermentant pas le glucose) qui est le plus fréquemment isolée ; c'est une bactérie témoin de contamination salivaire qui est rarement pathogène (infection osseuse).

### *Cocci à Gram positif (GPAC)*

Les souches microaérophiles *Peptococcus morbillorum*, *Peptostreptococcus constellatus* et *Peptostreptococcus intermedius*, sont transférées dans le genre *Streptococcus*. *Peptococcus saccharolyticus* n'est pas un anaérobie ; il est transféré dans le genre *Staphylococcus*.

L'utilisation des tests enzymatiques grâce aux galeries dites d'identification rapide facilite l'identification de ces bactéries. Les changements taxonomiques sont nombreux.

Globalement, une seule espèce dans les genres *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Finegoldia* et *Micromonas* : *P. niger*, *Ps. anaerobius*, *F. magna*, *M. micra*. La plupart des cocci anaérobies ont été reclassés dans les genres *Anaerococcus* et *Peptoniphilus*.

Les espèces saccharolytiques sont rangées dans le genre *Anaerococcus* : *Anaerococcus prevotii*, *Anaerococcus tetradius*, *Anaerococcus hydrogenalis*, *Anaerococcus vaginalis*, *Anaerococcus octavius*.

Les espèces non saccharolytiques sont reclassées dans le genre *Peptoniphilus* : *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Peptoniphilus indolicus*, *Peptoniphilus lacrimalis*, *Peptoniphilus ivorii* et *Peptoniphilus harei*.

*Peptostreptococcus barnesae* est rangé dans le genre *Gallicola*. *Peptostreptococcus heliotrinreducens* est placé dans le genre *Slackia* ; *Streptococcus parvulus* est classé dans le genre *Atopobium*. *Finegoldia magna* (ex-*Peptostreptococcus magnus*) et *Micromonas micra* sont les GPAC les plus fréquemment isolés dans les produits pathologiques. Comme son nom le suggère, *F. magna* se présente sous la forme de très gros cocci ; à l'opposé, les plus petits cocci correspondent à *M. micra*. Il n'est peut-être pas nécessaire d'identifier tous les cocci, dans la mesure où ils ne sont pas les seuls pathogènes en cause.

## Antibiogramme des anaérobies

La réalisation d'un antibiogramme apparaît indispensable, en raison de l'apparition de mécanismes de résistance aux antibiotiques. *Bacteroides fragilis, B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis* et *Clostridium ramosum* sont considérés comme les bactéries les plus résistantes aux antibiotiques.

### *Difficultés techniques*

#### Antibiogramme par diffusion

Il ne faut pas réaliser les tests sur des milieux Mueller-Hinton qui conviennent mal à la croissance des anaérobies. Pour les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et les *Clostridium*, on peut employer le Wilkins-Chalgren sans addition de sang. Mais pour l'ensemble des anaérobies, 20 % des souches ne cultivent pas sur ce milieu, même après addition de sang. Il est préférable de réaliser les tests sur milieu *Brucella* au sang. La méthode de diffusion n'est pas la méthode idéale ; c'est une méthode par défaut qui permet par exemple la détection de la résistance aux carbapénèmes, à la clindamycine ou au métronidazole chez bon nombre d'anaérobies.

**TABLEAU 41-7**

## Caractères d'identification de l'ensemble des espèces et sous-espèces de *Fusobacterium*.

| *Caractères* | *1* | *2* | *3* | *4* | *5* | *6* | *7* | *8* | *9* | *10* | *11* | *12* | *13* | *14* | *15* | *16* | *17* | *18* | *19* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cellobiose | – | – | f | – | f | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Hydolyse de l'esculine | – | – | +/– | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Fructose | – | – | f | – | f | –/f | –/f | f/– | f/– | f/– | f/– | f/– | f/– | f/– | f/– | – | f | – | f |
| Glucose | – | f | + | –/f | f | –/f | –/f | f/– | f/– | f/– | f/– | f/– | f/– | f | f/– | | f | + | f |
| Lactose | – | – | f | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Maltose | – | – | f | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Mannose | – | – | f | – | f | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | f |
| Raffinose | – | – | V | – | –/f | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Saccharose | – | – | V | – | –/f | – | – | – | – | – | – | – | – | f | – | – | – | – | – |
| Gélatine | –/f | – | – | – | – | V | V | –/f | –/f | –/f | –/f | –/f | –/f | – | – | – | – | – | – |
| Indole | + | + | – | + | – | + | + | + | + | + | + | + | + | – | + | – | + | – | +/– |
| Nitrates réductase | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | – |
| Culture dans la bile | + | – | + | – | + | V | V | – | – | – | – | + | – | – | – | – | + | + | + |
| Lipase | + | – | – | – | – | | +/– | – | – | – | – | – | – | – | – | – | f | – | –/f |
| β-hémolyse | – | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Production de gaz en gélose | ND | + | + | – | + | + | + | – | – | – | – | – | – | + | – | – | – | + | + |
| α-glucosidase | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| β-glucosidase | – | – | +/– | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| α-galactosidase | – | – | + | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| β-galactosidase | – | – | + | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | – |
| β-glucuronidase | – | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Phosphatase alcaline | – | – | + | – | + | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | f | – | – | f |
| Phosphatase acide | + | f | + | – | + | + | + | – | – | – | – | – | – | f | – | + | – | + | f |
| N-acétyl glucosaminidase | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | – |
| Arginine aryl amidase | ND | ND | + | ND | ND | – | – | – | – | – | – | – | – | ND | – | ND | ND | + | + |
| Sérine aryl amidase | ND | ND | + | ND | ND | – | – | – | – | – | – | – | – | ND | – | ND | ND | + | + |
| Estérase C | + | – | – | – | – | f | f | – | – | – | – | – | – | – | – | – | f | – | – |
| Estérase C8 | + | – | – | – | – | f | f | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Résistance au fluoroquinolone | | | | | | | | | | | | | R | | | | | | |
| Origine de la souche | C | NO | NO | O S | NO | O | O, CT | O | O | O | O | S | CT, CH | H, CO | O | NO | S | NO | NO |

Espèces : 1, *F. equinum* ; 2, *F. gonidiformans* ; 3, *F. mortiferum* ; 4, *F. naviforme* ; 5, *F. necrogenes* ; 6, *F. necrophorum* spp. *fundiliforme* ; 7, *F. necrophorum* spp. *necrophorum* ; 8, *F. nucleatum* spp. *nucleatum* ; 9, *F. nucleatum* spp. *fusiforme* ; 10, *F. nucleatum* spp. *polymorphum* ; 11 : *F. nucleatum* spp. *vincentii* ; 12, *F. nucleatum* spp. *animalis* ; 13, *F. canifelinum* ; 14 : *F. perfoetans* ; 15, *F. periodonticum* ; 16, *F. rusii* ; 17, *F. simae* ; 18, *F. ulcerans* ; 19, *F. varium*.
Origine de la souche : C, cheval ; CT, chat ; CH, chien ; CO, cochon ; NO, humain non orale ; O, humain orale ; S, singe.
+ : positif, – : négatif, f : faible.

### Méthodes alternatives

Si l'E-test® est une méthode fiable, son coût rend cette méthode prohibitive. Les galeries API ATB ANA® ont été validées. Elles seront employées à condition que les souches soient capables de cultiver en bouillon Wilkins-Chalgren.

## Ce qu'il convient de faire

La mise en évidence de la production d'une β-lactamase ne doit pas être recherchée chez les *Bacteroides* du groupe *fragilis* car elle est toujours présente (céphalosporinase chromosomique). Sa recherche est indispensable chez *Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium* et quelques *Clostridium* (*C. butyricum, C. clostridioforme, C. ramosum*). La faible affinité des β-lactamases de *Prevotella* pour la nitrocéphine fait qu'il est préférable de déterminer la CMI de l'amoxicilline par la méthode E-test® et de conclure à la présence d'une β-lactamase si la CMI de l'amoxicilline est >0,38 mg/l. Ne pas considérer la différence entre les zones d'inhibition obtenues autour des disques d'amoxicilline et de son association avec l'acide clavulanique pour affirmer une production de β-lactamase, car l'acide clavulanique possède une activité antibiotique intrinsèque sur les anaérobies, y compris à Gram positif.

Chez *B. fragilis*, il est important de détecter une éventuelle résistance à l'association amoxicilline + acide clavulanique seule ou associée à l'imipénème, une sensibilité diminuée voire une résistance au métronidazole.

On assiste à l'apparition de la résistance au métronidazole chez de nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif (*Prevotella*), de la résistance aux glycopeptides chez certains *Clostridium*. Quant à la résistance à la clindamycine, elle est présente chez toutes les espèces, avec un taux de résistance de 25 % sur l'ensemble des anaérobies.

Pour les conditions techniques et la lecture interprétative, on se reportera au communiqué du CA-SFM ou au livre *L'Antibiogramme*.

Pour un laboratoire isolant peu de bactéries anaérobies, la technique la plus simple est la méthode en diffusion. Dans le cas d'obtention de résultats non conformes aux données de la littérature, ceux-ci devront être obligatoirement contrôlés par une autre technique, comme l'E-test®. La galerie ATB ANA®, du fait de sa commercialisation et de sa simplicité d'utilisation, constitue également une bonne technique de première intention. Enfin, la dilution en gélose, qui constitue la méthode de référence, n'apparaît utilisable que pour l'étude d'un grand nombre de souches, lors d'expertises par exemple. Elle sera généralement réservée aux laboratoires spécialisés disposant d'enceinte anaérobie.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


**Généralités sur les anaérobies et taxonomie**

Bland SA, Sédallian L, Dubreuil. *Clostridium* autres que *C. difficile*. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2004. p. 1–11 [Section X, chapter 3].

Conrads G, Citron DM, Mutter R, et al. *Fusobacterium canifelinum sp. nov.*, from the oral cavity of cats and dogs. Syst Appl Microbiol 2004; 27 : 407–13.

Downes J, Sutcliffe IC, Hofsatd T, Wade WG. *Prevotella bergensis sp. nov.*, isolated from human infections. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56 : 609–12.

Dubreuil L, Sédallian A. Généralités sur les anaérobies. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2004. p. 1–19 [Section X, chapter 1].

Dubreuil L, Sédallian A. Bactéries anaérobies à Gram négatif. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2004. p. 1–29 [Section X, chapter 5].

Gavini FA, Sédallian L, Dubreuil. Anaérobies à Gram positif non sporulés. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2004. p. 1–22 [Section X, chapter 4].

Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, et al. Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual. 6th ed. Belmont, California : Star Publishing Company; 2002.

**Sensibilité aux antibiotiques**

Behra-Miellet J, Dubreuil L, Calvet L. In vitro activity evaluation of ertapenem and nine other comparators against anaerobic bacteria. Int J Antimicrob Agents 2006; 28 : 25–35.

Behra-Miellet JL, Calvet F, Mory, et al. Antibiotic resistance among anaerobic Gram negative bacilli : Lessons from a French multicentric survey. Anaerobe 2003; 9 : 105–11.

Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Report 2003. Int J Antimicrob Agents 2003; 21 : 364–91.

Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Communiqué annuel 2005. htpp// : sfm.asso.fr.

Dubreuil L, Singer E, Houcke I. Susceptibility testing of anaerobic bacteria : evaluation of the redesigned (version 96) bioMérieux ATB ANA device. J Clin Microbiol 1999; 37 : 1824–8.

Dubreuil L. Méthodes d'étude des anaérobies. In : Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. L'Antibiogramme. 2e éd. Paris : ESKA; 2006. p. 521–36.

Dubreuil L. Anaérobies à Gram négatif. In : Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. L'Antibiogramme. 2e éd. Paris : ESKA; 2006. p. 547–62.

Koeth LM, Good CE, Appelbaum PC, et al. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxi-clav and five other antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother 2004; 53 : 1039–44.

**ADRESSE UTILE**

**Centre national de référence Bactéries anaérobies et botulisme**
Institut Pasteur
Unité des bactéries anaérobies et toxines
25-28, rue du docteur Roux
75 724 Paris cedex 15
Dr Michel R. Popoff
Tél. : 01 40 61 34 47 – Fax : 01 40 61 31 23
E-mail : mpopoff@pasteur.fr.

CHAPITRE

# 42 Instauration et surveillance d'un traitement antibiotique

N. Hidri, M.-C. Ploy

Différents critères bactériologiques, pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicologiques sont à considérer dans le choix d'un traitement antibiotique.

L'étude de l'activité des antibiotiques sur les bactéries rencontrées en pathologie constitue une étape nécessaire au choix d'une antibiothérapie. L'évaluation de cette activité nécessite une étude in vitro réalisée au laboratoire de bactériologie.

Les antibiotiques actuellement disponibles sont définis selon un spectre naturel d'activité, c'est-à-dire la liste des espèces bactériennes sur lesquelles ils sont normalement actifs. Certains antibiotiques ont un spectre large, comme les β-lactamines ou les fluoroquinolones qui agissent aussi bien sur les bactéries à Gram négatif qu'à Gram positif, et d'autres ont un spectre plus étroit comme les glycopeptides qui n'agissent que sur les bactéries à Gram positif.

Outre les résistances naturelles, les bactéries ont su développer au cours du temps des résistances dites « acquises ». Dans ce dernier cas, seules certaines souches au sein d'une espèce expriment la résistance.

Cette résistance peut être due à des mutations affectant des gènes présents sur le chromosome ou à l'acquisition de gènes étrangers, le plus souvent par le transfert horizontal d'éléments génétiques tels que les plasmides ou les transposons.

La fréquence de souches résistantes à un antibiotique au sein d'une espèce bactérienne, par acquisition de résistance, est parfois élevée (par exemple, 46 % des souches d'*Escherichia coli* isolées en France sont résistantes à l'amoxicilline). Il est donc nécessaire d'évaluer in vitro la sensibilité des bactéries aux antibiotiques afin d'aider le clinicien dans son choix thérapeutique.

## Bactériostase et bactéricidie

### Définition

Les interactions bactérie–antibiotique dans le temps, en présence de concentrations croissantes d'antibiotique, peuvent se traduire soit par un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase), soit par un effet létal de l'antibiotique (bactéricidie) (fig. 42.1).

La bactériostase est quantifiée par la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la bactéricidie par la CMB (concentration minimale bactéricide), les deux concentrations étant exprimées en mg/l.

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu, après 18 heures d'incubation, de la souche bactérienne étudiée.

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique laissant après 18 heures d'incubation un pourcentage de survivants ≤ 0,01 % de l'inoculum de départ. Un antibiotique est bactéricide si la CMI et la CMB sont proches. Si le rapport CMB/CMI ≥ 32, l'antibiotique est bactériostatique ou s'il s'agit d'un antibiotique habituellement considéré comme bactéricide ; la souche est dite tolérante.

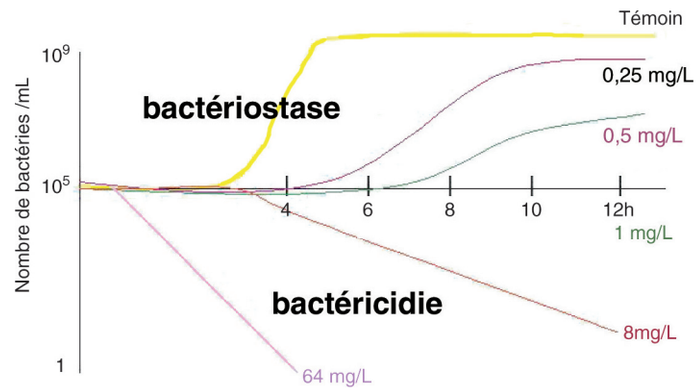



Fig. 42.1. – *Courbes de croissance d'un inoculum bactérien en présence d'antibiotique en concentrations croissantes.*

## Étude de la bactériostase

### Détermination de la CMI en milieu liquide

Une série de tubes est ensemencée avec $10^5$ UFC/ml de la bactérie à étudier en bouillon Mueller-Hinton. Ensuite, des quantités croissantes d'antibiotiques sont ajoutées de façon à réaliser une gamme de concentrations en progression géométrique de raison 2. Un tube sans antibiotique servira de témoin (fig. 42.2).

Après 18 heures à 37 °C, la CMI correspond à la concentration d'antibiotique présente dans le premier tube où il n'y a pas de culture visible.

Cette méthode en milieu liquide peut aussi être réalisée en microplaques, ce qui permet d'automatiser la technique.

### Détermination de la CMI en milieu solide par dilution en gélose

Cette méthode est celle recommandée par le CA-SFM (Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie). Le principe est identique mais cette fois-ci l'antibiotique est incorporé dans la gélose Mueller-Hinton. Chaque boîte de Pétri correspond à une concentration donnée d'antibiotique. Il est possible de tester ainsi sur plusieurs souches déposées sous forme de spot sur la même série de boîtes avec un inoculum de $10^4$ UFC/spot (fig. 42.3). La CMI correspond alors à la concentration d'antibiotique présente dans la première boîte où la culture bactérienne n'est pas visible.

### Détermination de la CMI en milieu solide par diffusion en gélose

Une autre approche est d'utiliser des bandelettes de plastique imprégnées d'un gradient prédéfini de concentrations croissantes d'antibiotique. C'est le principe utilisé pour les E-Tests® (bioMérieux) ou les MICE Tests® (Oxoid) (fig. 42.4).

Ces bandelettes sont appliquées directement à la surface d'une gélose inoculée avec la bactérie (selon les recommandations du fabricant). Le gradient préformé exponentiel d'antibiotique est immédiatement transféré sur la gélose (quelques secondes). Après incubation de 18 heures à 37 °C, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette se forme (fig. 42.4).

La CMI des antibiotiques bactéricides correspond à la concentration d'antibiotique lisible au point où l'ellipse croise la bandelette (100 % d'inhibition). Pour les

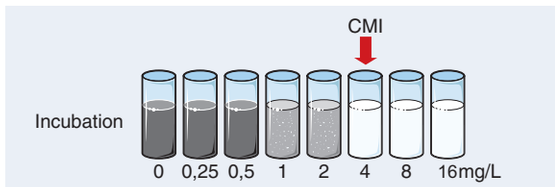



**Fig. 42.2.** – *Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide.*

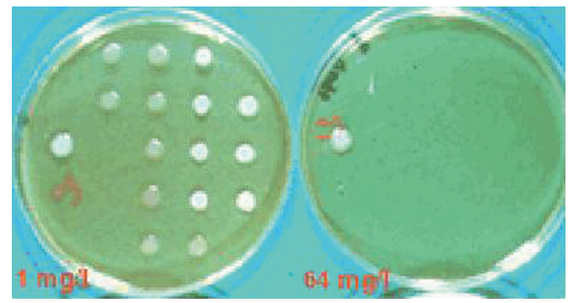



**Fig. 42.3.** – *Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide par dilution en gélose.*

antibiotiques bactériostatiques, une zone de traîne se forme au niveau de l'ellipse. La lecture de la CMI correspond à 80% d'inhibition, avec prise en compte des macrocolonies (les microcolonies sont occultées) (Guide pratique E-test®, AES, Chemunex).

Cette technique est facile à réaliser en routine et permet d'obtenir des CMI avec une bonne concordance avec les CMI réalisées par dilution en milieu gélosé, pour la plupart des espèces bactériennes ; elle est utilisée en routine dans différents cas, notamment pour l'étude de la sensibilité de *S. pneumoniae* aux β-lactamines.

### Détermination automatisée de la CMI

Certains automates utilisés pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques rendent des résultats de CMI. Des galeries contenant une gamme de concentration par antibiotique sont inoculées avec une suspension de la bactérie à étudier.

Après incubation dans l'automate, des CMI seront déterminées. Trois automates permettent de déterminer

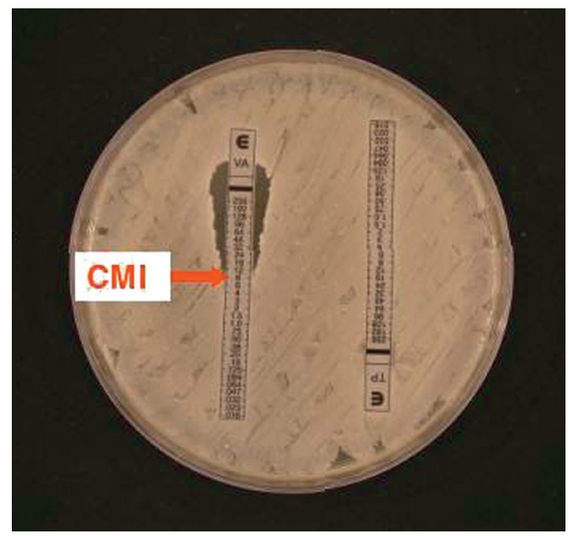



**Fig. 42.4.** – *Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide par diffusion en gélose (technique E-Test®).*

les CMI : le Phoenix® (Becton Dickinson), le Vitek 2® (bioMérieux) et le Microscan® (Siemens).

### Étude de la bactéricidie

#### *Détermination de la CMB en milieu liquide*

Dans un premier temps, une gamme de concentrations d'antibiotique est réalisée comme pour la détermination de la CMI. Le même jour, une numération de l'inoculum de départ est effectuée en réalisant 4 dilutions successives de 10 en 10 qui seront chacune ensemencées en strie à l'aide d'une anse calibrée sur une gélose Mueller-Hinton. Cette gélose sera incubée 18 heures à 37 °C, puis les colonies seront dénombrées et le nombre d'unités formant colonie (UFC) à la dilution au 1/10 000e correspondra à 0,01 % de l'inoculum de départ. Après 18 heures à 37 °C, tous les tubes qui ont une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI seront repiqués sur gélose Mueller-Hinton en stries à l'aide d'une anse calibrée (même volume que pour la numération de l'inoculum de départ). Après 18 heures à 37 °C, les colonies présentes sur chaque strie sont comptées. Cette numération est comparée avec la numération de l'inoculum de départ (fig. 42.5).

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle le nombre de colonies bactériennes est inférieur ou égal au nombre de colonies présentes sur la dilution de l'inoculum de départ au 1/10 000e (c'est-à-dire ≤0,01 % de l'inoculum de départ).

La CMB peut aussi être réalisée en microplaque.

#### *Détermination de la CMB par dilution en milieu gélosé*

La technique utilisée est pratiquement la même que celle décrite pour la détermination des CMI en milieu gélosé, mais les ensemencements en spot se font sur un filtre en nitrate de cellulose déposé à la surface des géloses contenant les concentrations d'antibiotique. Une numération de l'inoculum de départ est aussi réalisée avec 4 dilutions de 10 en 10 sur gélose Mueller-Hinton sans antibiotique sur laquelle un filtre aura préalablement été déposé.

Après 18 heures d'incubation à 37 °C, les filtres sans croissance bactérienne sont transférés deux fois de suite à 15 minutes d'intervalle, afin de limiter le transport des antibiotiques, sur une gélose Mueller-Hinton sans antibiotique.

Après 18 heures à 37 °C, les colonies sont dénombrées et comparées à la numération de l'inoculum de départ.

Cependant, il faut souligner que la CMB est soumise à des variations dépendant aussi bien du milieu que de l'inoculum, mais également des tubes utilisés (les antibiotiques peuvent adhérer aux tubes plastiques). De plus, sont parfois observés des effets paradoxaux avec une bactéricidie précoce suivie d'une phase de recroissance (rebond) et parfois une bactéricidie importante à des valeurs proches de la CMI et plus faible à des concentrations plus élevées. La détermination in vitro de la bactéricidie est donc difficile à interpréter.

La détermination de la vitesse de bactéricidie avec des repiquages à 2, 4, 6 heures, etc. (*time killing curves* des Anglo-Saxons) est beaucoup plus intéressante, mais n'est pratiquement jamais réalisée en routine.

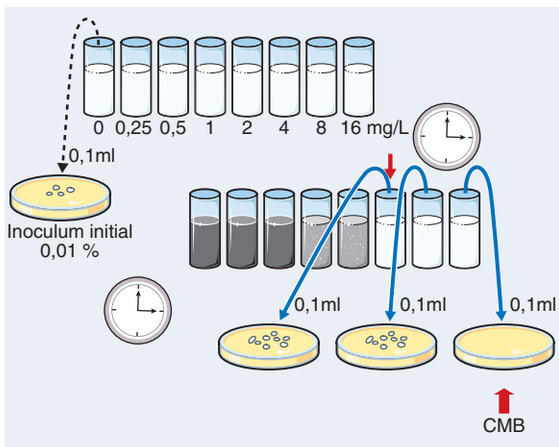



Fig. 42.5. – *Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu liquide.*

## Antibiogramme

La détermination des CMI en méthode manuelle, encore assez fastidieuse à réaliser, ne peut pas être envisagée en routine pour toutes les bactéries isolées et tous les antibiotiques testés, et reste réservée à quelques cas particuliers (pneumocoque de sensibilité diminuée aux pénicillines, staphylocoques et entérocoques résistants aux glycopeptides, germes à croissance lente, infections sévères, etc.).

En routine, l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est effectuée grâce à la technique de l'antibiogramme.

### Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

#### *Technique*

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un antibiotique dans un milieu gélosé à partir d'un support papier préimprégné.

Des disques de papier préimprégnés d'une concentration connue d'antibiotiques sont déposés à la surface d'une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. L'antibiotique diffuse à partir du disque de papier selon un gradient de concentration décroissant. Après 18 heures d'incubation à 37 °C, une zone d'inhibition centrée sur le disque se forme ; la concentration d'antibiotique en bordure de la zone d'inhibition correspond à la CMI de l'antibiotique pour la souche étudiée.

Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètres et des courbes de concordance diamètre–CMI

sont réalisées (fig. 42.6). Ces courbes sont construites pour chaque antibiotique à partir d'échantillons représentatifs des différentes espèces bactériennes ; elles ne sont valables que si tous les paramètres sont rigoureusement contrôlés.

La gélose utilisée est une gélose Mueller-Hinton et son épaisseur doit être de 4 mm. La composition du milieu gélosé est importante car des modifications de composition peuvent avoir des conséquences sur le résultat des tests de sensibilité pour certains antibiotiques. Pour des bactéries exigeantes, des additifs peuvent être ajoutés comme du sang à 5 % (*Streptococcus pneumoniae, Campylobacter, Neisseria meningitidis*) et des modifications de diamètre d'inhibition peuvent apparaître. Pour les bactéries anaérobies, on utilisera plutôt une gélose Wilkins-Chalgren additionnée de 5 % de sang et, pour *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus*, on utilisera une gélose chocolat Polyvitex®. Il est nécessaire de suivre les recommandations du CA-SFM en ce qui concerne la composition des milieux afin d'obtenir des résultats fiables pour l'antibiogramme.

Pour des résultats reproductibles et comparables, cette technique a été très bien standardisée et le respect des conditions d'inoculum, de milieu, de temps et d'atmosphère d'incubation est primordial. L'inoculum varie selon la bactérie étudiée. L'inoculum doit être dilué de façon à obtenir des colonies jointives mais non confluentes. Les conditions de dilutions d'inoculum sont données par le CA-SFM. L'ensemencement de la gélose est réalisé par inondation ou par écouvillonnage (en imprimant successivement à la boîte de Pétri une triple rotation de 60 °C environ). Les disques sont déposés bien à plat à la surface de la gélose à une distance de 30 mm les uns des autres. Les disques ne doivent pas ensuite être déplacés car l'antibiotique diffuse rapidement après la pose des disques. Les géloses ensemencées sont incubées à 37 °C pendant 18 heures en position renversée (couvercle en bas).

Après incubation, on doit observer des colonies juxtaposées non confluentes pour pouvoir interpréter les diamètres (fig. 42.7A) ; ceux-ci seront mesurés en millimètres à l'aide d'un pied à coulisses. Des systèmes automatisés de lecture des diamètres existent (par exemple SIR Scan®).

Un contrôle de qualité interne au laboratoire doit être organisé pour s'assurer de la validité des résultats obtenus. Le CA-SFM recommande d'utiliser les souches suivantes : *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Providencia stuartii* CIP107808 et *Streptococcus pneumoniae* CIP104485.

ENCADRÉ

**Gélose Mueller-Hinton**

- Formule : en g/l d'eau distillée
- Macération de viande de bœuf : 300 ml
- Hydrolysat de caséine : 17,5 G
- Amidon : 1,5 G
- Agar : 10 G
- pH : 7,4 (environ)

## Interprétation en catégorisation clinique

La réponse au clinicien ne se fera pas simplement en termes de CMI en mg/l ou en diamètre d'inhibition en millimètres mais en termes de probabilités d'activité. L'antibiogramme est donc un test de prédiction de succès ou d'échec clinique.

Les résultats seront rendus au clinicien en « S » (sensible), « I » (intermédiaire) ou « R » (résistant). Ces catégorisations cliniques sont définies en comparant les résultats obtenus en CMI avec des concentrations critiques définies par les sociétés savantes de microbiologie, le CA-SFM en

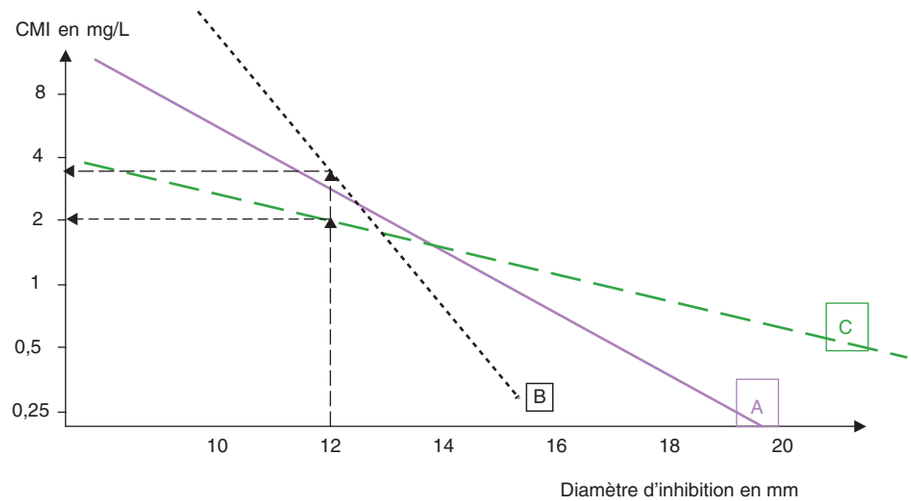



Fig. 42.6. – *Courbes de concordance diamètre d'inhibition–CMI.*

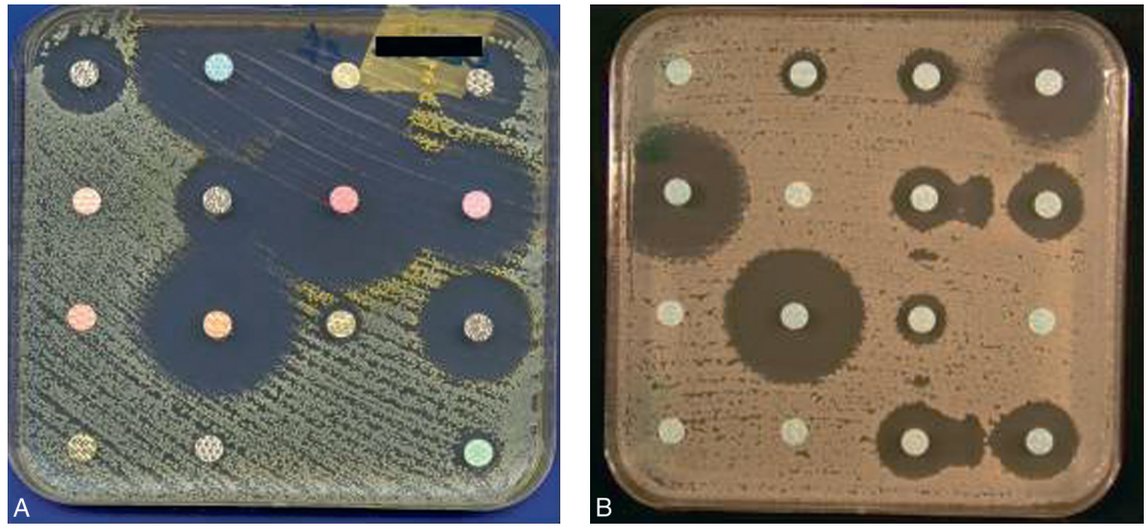



**Fig. 42.7.** – *A) Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton. B) Image de synergie permettant de détecter une BLSE (β-lactamase à spectre élargi).*

France, en fonction des concentrations sériques obtenues après des posologies usuelles (fig. 42.8). La réponse interprétative est donc unique et ne tient pas compte du site de l'infection.

Grâce aux courbes de concordance, aux concentrations critiques correspondent des diamètres critiques. Ces concentrations critiques sont définies à partir de critères bactériologiques, cliniques et pharmacocinétiques :

- le résultat « R » (résistant) signifie que le risque d'échec thérapeutique est grand quel que soit le traitement ;
- le résultat « S » (sensible) signifie qu'il n'y a pas de mécanisme de résistance acquise exprimé in vitro. La probabilité de succès thérapeutique est forte, à condition que les autres paramètres pharmacologiques (diffusion au site de l'infection), toxicologiques et cliniques soient pris en compte ;
- le résultat « I » (intermédiaire) correspond à une zone d'incertitude qui ne peut pas prédire du succès ou de l'échec thérapeutique.

Différentes sociétés savantes ont établi leurs propres recommandations pour l'interprétation de l'antibiogramme, ce qui peut être source d'interprétations différentes selon les pays. À l'heure actuelle, il y a une tendance à l'harmonisation. En Europe, il y a une harmonisation autour de l'EUCAST (European committee for antibiotic susceptibility testing). Aux États-Unis, c'est le CLSI (Clinical laboratory standard institute) qui est la référence.

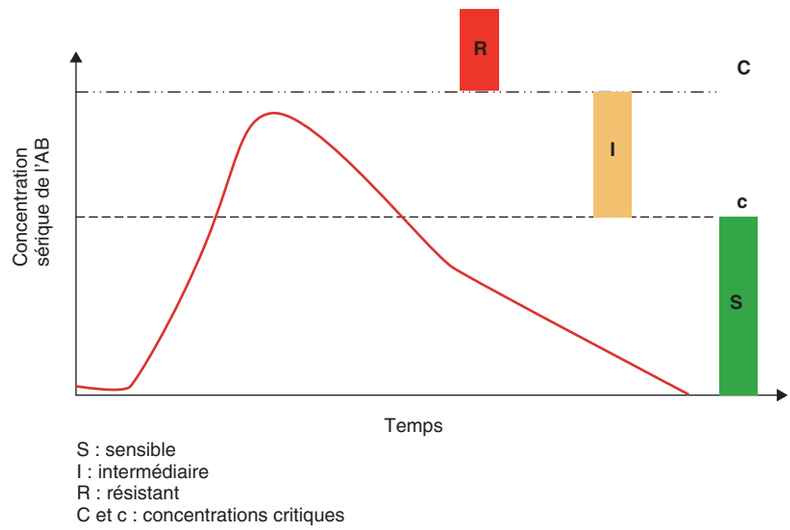



**Fig. 42.8.** – *Interprétation clinique des données de l'antibiogramme.*

### Causes d'erreur

Des réponses erronées à partir de l'antibiogramme peuvent être consécutives au non-respect de différents paramètres touchant à :

- la composition du milieu ;
- l'inoculum ;
- l'épaisseur de la gélose et donc le caractère plan des boîtes plastiques ;
- l'atmosphère d'incubation : l'incubation en anaérobiose ne permet pas de déterminer la sensibilité aux aminosides ; l'incubation sous $CO_2$ compromet la détermination de la sensibilité aux aminosides et aux macrolides ;
- temps d'incubation et de croissance de bactéries : pour les bactéries à croissance lente, les zones d'inhibition des antibiotiques actifs vont artificiellement augmenter ;
- stockage des disques imprégnés d'antibiotique ; ils doivent être conservés à +4 °C, avec un respect strict des dates de péremption ;

## Techniques automatisées

Depuis plusieurs années, des techniques automatisées performantes existent pour la réalisation de l'antibiogramme, techniques d'antibiogramme en milieu liquide ou semi-liquide. L'avantage de ces systèmes est avant tout leur standardisation. En effet, un certain nombre de paramètres est ainsi rigoureusement contrôlé (incubation, lecture et en amont contrôle des réactifs). De plus, le rendu des résultats est généralement plus rapide (4 à 6 heures) que le délai de 18 heures nécessaire pour l'antibiogramme en milieu gélosé.

Différents systèmes existent qui utilisent seulement deux concentrations par antibiotique ou une gamme de concentrations et rendent alors des CMI (le Phoenix®, Becton Dickinson ; le Vitek 2®, bioMérieux ; et le Microscan®, Siemens).

## Lecture interprétative de l'antibiogramme

Pour interpréter un test de sensibilité aux antibiotiques, le résultat brut des diamètres ou CMI peut ne pas être suffisant. Il faut essayer de mettre en évidence le ou les mécanismes de résistance afin de prédire le phénotype.

Par exemple, la **résistance des staphylocoques à la méticilline** est difficile à détecter. L'incubation à 30 °C ou l'utilisation de milieu hypersalé incubé à 37 °C est recommandée pour détecter cette résistance, notamment son caractère hétérogène. Récemment, il a été montré que l'utilisation d'un disque de céfoxitine ou de moxalactam était plus performante que celle d'un disque d'oxacilline pour détecter la résistance à la méticilline.

Pour les **pneumocoques**, l'utilisation d'un disque d'oxacilline chargé à 5 µg est recommandée pour détecter les souches de sensibilité diminuée aux pénicillines.

La **détection de la pénicillinase** à l'aide d'un substrat chromogénique (disque de nitrocéfine) doit être systématique pour certaines bactéries telles que *Haemophilus, Branhamella, Campylobacter, Fusobacterium, Prevotella, Staphylococcus, Neisseria gonorrhoeae*.

Devant une souche d'entérobactérie ou de *P. aeruginosa* résistante aux céphalosporines de 3e génération ($C_3G$), une BLSE (β-lactamase à spectre étendu) ou une hyperproduction de céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) doivent être évoquées.

Pour la mise en évidence d'une BLSE, l'utilisation d'un test de synergie entre un ou plusieurs antibiotiques de type $C_3G$ et un inhibiteur de β-lactamase est préconisée (fig. 42.7B). La présence d'une BLSE est affirmée par des images de synergie à type de « bouchons de champagne ».

En cas d'hyperproduction de céphalosporinase, une restauration de la sensibilité aux $C_3G$ en présence de cloxacilline (250 mg/l) est observée.

Depuis peu, l'émergence de souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes est rapportée. La restauration (au moins partielle) de la sensibilité aux carbapénèmes par l'EDTA ou l'acide boronique est évocatrice de carbapénémases. En effet, l'EDTA, chélateur d'ions, est inhibiteur des carbapénémases de type métallo-enzyme (classe B de Ambler), enzyme nécessitant deux ions zinc dans son site actif. L'acide boronique est inhibiteur des céphalosporinases et des carbapénémases de type sérine β-lactamases.

De même, certaines molécules non employées en clinique sont utilisées pour la détermination du phénotype de résistance. Ainsi, la kanamycine est préférée à l'amikacine pour détecter l'APH(3') du staphylocoque, la lincomycine à la clindamycine pour détecter le phénotype $MLS_B$ inductible.

Cette lecture interprétative, primordiale pour le rendu au clinicien, est réalisée par le microbiologiste à partir de ses connaissances sur les mécanismes de résistance.

Différentes sociétés commerciales ont développé des systèmes experts aidant le biologiste dans son interprétation. Certains systèmes experts utilisent des règles de détection en comparant les résultats « S », « I » ou « R » des différentes molécules.

Le principe d'un système par règles est le suivant :

Analyse de molécules « cibles »
↓
Si résistance
↓
Déduction du mécanisme de résistance
↓
Réponse déduite pour d'autres antibiotiques moins touchés en apparence

L'inconvénient des systèmes à règles tient aux points suivants :

- il n'existe pas de consensus pour toutes les classes d'antibiotiques et les règles peuvent varier selon les pays et les sociétés savantes ;
- le système est fondé sur des résultats « S », « I » ou « R » qui sont des catégorisations cliniques ;
- les mécanismes exprimés à bas niveau sont mal détectés car une augmentation de CMI n'entraînera pas obligatoirement de changement de catégorisation clinique.

D'autres systèmes comparent les résultats bruts de CMI obtenus avec une base de connaissances très complète. Ce système est fondé sur les CMI et non pas sur des catégorisations « S », « I » ou « R » et a donc plus une valeur universelle.

### Limites de l'antibiogramme

L'antibiogramme est un outil extrêmement utile en routine pour orienter le clinicien vers le meilleur choix thérapeutique. Cependant, il ne faut pas oublier certaines limites de l'antibiogramme :

- c'est un test in vitro qui ne prédit pas l'activité des antibiotiques in vivo ;
- c'est un test prenant en compte seulement la bactériostase ;
- la réponse ne tient pas compte du site de l'infection, mais seulement des concentrations sériques pour des posologies usuelles ;
- c'est un test simple dans sa réalisation mais très complexe dans son interprétation.

## Techniques génotypiques de détection de la résistance

Les techniques de biologie moléculaire ont été largement appliquées à la détection de la résistance aux antibiotiques. Cependant, seul un petit nombre d'entre elles sont utilisées à ce jour en routine dans les laboratoires de microbiologie, soit parce qu'elles sont encore trop onéreuses, soit parce qu'elles sont encore trop complexes à mettre en œuvre ou à interpréter. En effet, pour certaines familles d'antibiotiques et certains mécanismes de résistance, de très nombreux gènes existent, complexifiant la possibilité de les détecter de façon exhaustive. Ces méthodes viennent donc dans la majorité des cas compléter les méthodes phénotypiques et représentent un plus dans le déroulement du rendu des résultats au clinicien. En effet, les méthodes génotypiques présentent un intérêt par rapport aux méthodes phénotypiques pour les bactéries à croissance lente ou difficilement cultivables. De plus, elles peuvent être applicables directement sur les produits pathologiques et permettent d'obtenir une réponse plus rapide, notamment en cas d'infection sévère. Différents industriels ont développé des kits ciblant spécifiquement des gènes de résistance. C'est par exemple le cas pour la détection du gène *mecA* chez les staphylocoques, la recherche de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques (gènes *vanA, vanB*) et la détection de la résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis (*mutations du gène *rpoB)*, le plus souvent par des techniques PCR dont certaines ont été développées sur des sytèmes automatisés ne nécessitant pas de personnel qualifié en biologie moléculaire (Genexpert, Cepheid). Des systèmes de puces sont commercialisés pour détecter de nombreux gènes de β-lactamase (Checkpoints distribué en France par Biocentrics).

La détection d'un gène de résistance a une valeur universelle, à la différence des concentrations critiques, mais bien évidemment, seuls les gènes de résistance connus sont détectables et ces méthodes génotypiques ne permettent pas la détection de nouveaux mécanismes de résistance, à la différence de l'antibiogramme « classique » qui évalue la relation bactérie–antibiotique et qui permet de détecter un nouveau mode de résistance.

## Étude des associations d'antibiotiques

### Buts d'une association

Il est possible d'associer des antibiotiques pour des raisons différentes :

- **élargissement du spectre :** il est souhaitable parfois d'élargir le spectre antibactérien aussi bien pour les infections communautaires que pour les infections nosocomiales. Par exemple, devant une pneumopathie grave, il est parfois difficile de déterminer l'étiologie de la maladie sur la seule clinique et une double antibiothérapie probabiliste est parfois prescrite pour traiter aussi bien les bactéries telles que le pneumocoque ou *Haemophilus influenzae* que des bactéries intracellulaires comme *Chlamydophila* ou *Mycoplasma pneumoniae* ;
- **prévention de l'émergence de mutants résistants :** il est admis que la probabilité d'obtenir un mutant résistant à deux antibiotiques est le produit des probabilités d'émergence de mutants résistants pour chaque antibiotique (environ $10^6$). Un double mutant de résistance ($10^{12}$ à $10^{14}$) est donc assez rare, car les densités microbiennes, au site de l'infection, atteignent rarement cette densité. Certains antibiotiques, comme l'acide fucidique, la fosfomycine, sont connus pour leur fréquence de mutation élevée et ne seront pas utilisés en monothérapie ;
- **obtention d'une synergie :** la synergie entre deux antibiotiques correspond à une meilleure activité de l'association antibiotique par rapport à chacune des deux molécules prises isolément. La seule synergie démontrée in vitro et in vivo est l'association aminosides-β-lactamines. Le bénéfice des associations d'antibiotiques a été démontré dans certaines infections sévères telles que les endocardites, les septicémies et les infections osseuses.

### Effets des associations

Lors de tests in vitro étudiant l'association d'antibiotiques, quatre effets sont distingués :

- indifférence : l'activité de l'association n'est ni supérieure ni inférieure à celle de chacun des deux antibiotiques pris isolément ;
- addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque antibiotique pris isolément ;

- synergie : l'effet est supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique pris isolément ;
- antagonisme : l'activité est inférieure à la somme des effets des deux antibiotiques.

## Techniques d'étude

### *Dilution en milieu liquide : méthode de l'échiquier*

La méthode est identique à la détermination des CMI en milieu liquide, mais les concentrations d'antibiotiques sont associées entre elles deux à deux selon un schéma carré en microplaques (fig. 42.9 et 42.10) ; la technique est dite de l'échiquier.

Après 18 heures d'incubation à 37 °C, la valeur de l'association est mesurée grâce au FIC (*fractional inhibitory concentration*) dans les tubes où il n'y a pas de culture visible.

$$\text{FIC index} = \frac{CMI_{A/B}}{CMI_{A}} + \frac{CMI_{B/A}}{CMI_{B}}$$

$CMI_{A/B}$ : CMI de l'antibiotique A en présence de l'antibiotique B.

$CMI_{B/A}$ : CMI de l'antibiotique B en présence de l'antibiotique A.

La synergie est définie par un FIC index $\leq 0{,}5$.

L'antagonisme est défini par un FIC index $> 2$.

Entre 0,5 et 1, il y a addition, et entre 1 et 2, indifférence.

Dans tous les tubes où il n'y a pas de culture visible, il est possible de pratiquer un repiquage sur gélose à l'aide d'une anse calibrée et de dénombrer les colonies. On compare ensuite cette numération à celle de l'inoculum de départ faite le premier jour (comme pour la détermination de la CMB). Il est possible de calculer alors un FBC index (*fractional bactericidal concentration*).

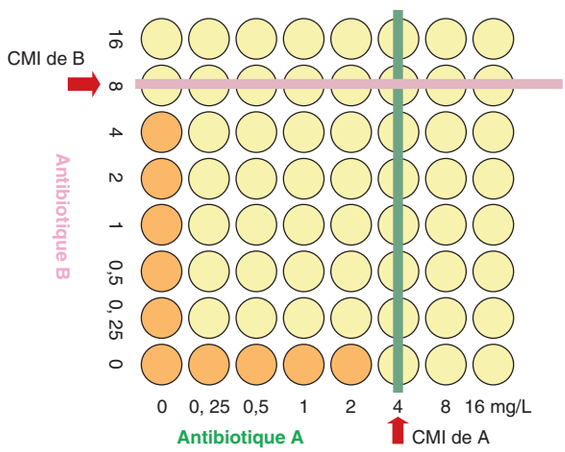



Fig. 42.9. – *Étude des associations d'antibiotique : technique de l'échiquier.*

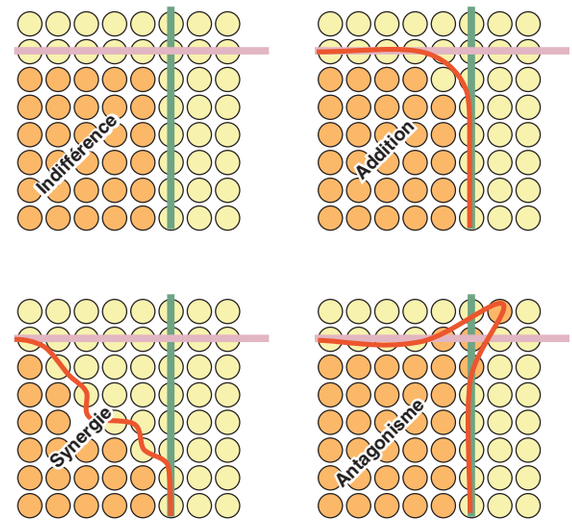



Fig. 42.10. – *Étude des associations d'antibiotique.*

$$\text{FBC index} = \frac{CMB_{A/B}}{CMB_{A}} + \frac{CMB_{B/A}}{CMB_{B}}$$

Cependant, le caractère parfois non continu de l'effet bactéricide (phénomène de palier ou de rebond) rend difficile l'interprétation du FBC index. Il est plus adapté de comparer le nombre de survivants de l'association par rapport à celui obtenu pour l'antibiotique le plus actif pris isolément.

### *Techniques en milieu solide*

#### Dilution en milieu solide

On peut utiliser la même technique qu'en milieu liquide mais en utilisant des boîtes gélosées contenant l'association d'antibiotiques à différentes concentrations. Dans ce cas, il sera possible de n'étudier que la bactériostase et pas la bactéricidie.

#### Diffusion en gélose

Il est possible d'utiliser les disques destinés à la réalisation des antibiogrammes ou des bandes de papier imprégnées d'antibiotiques disposés à angle droit ; l'antibiotique diffuse à partir de chaque bande selon un gradient exponentiel de concentrations décroissantes.

Après 18 heures d'incubation à 37 °C, on observe des images permettant de prédire l'effet de l'association en examinant avec attention la zone où les deux produits ont codiffusé.

#### Méthode des bandelettes

L'association de deux antibiotiques peut aussi être étudiée à l'aide des bandelettes type E-Test®.

Une première bandelette correspondant à un antibiotique est déposée à la surface de la gélose ensemencée avec

la bactérie à étudier. Après 1 heure de contact à 37 °C, la première bandelette est retirée et la deuxième est déposée sur l'empreinte de la première en prenant soin de faire coïncider les deux concentrations maximales (Cmax) de chaque bandelette.

Les associations doivent être réalisées dans les deux sens, tout d'abord la bandelette A puis la B, et sur une autre boîte la bandelette B puis la A. En parallèle, les CMI de A et B doivent être déterminées isolément.

Après 18 heures d'incubation à 37 °C, la CMI de l'association est comparée à la CMI de chaque antibiotique pris isolément.

## Rôle du laboratoire de bactériologie dans la surveillance d'un traitement antibiotique

Pour qu'une antibiothérapie soit efficace, il faut que la concentration en antibiotique au site de l'infection soit suffisante et efficace, et ce d'autant plus dans les infections sévères (endocardites, méningites, septicémies, infections osseuses) où la concentration en antibiotique in situ doit être supérieure à la CMI.

Par ailleurs, il est aussi nécessaire d'être vigilant au risque de toxicité des antibiotiques en dosant les antibiotiques au niveau sérique afin d'adapter la posologie (c'est par exemple le cas des glycopeptides ou des aminosides qui ont une toxicité rénale).

Les dosages d'antibiotiques seront généralement réalisés dans les laboratoires de pharmacologie, notamment à l'aide de techniques de chromatographie performantes ou EMIT (*enzyme multiplied immunotechnique*), FPIA (*fluorescence polarization immuno-assay*).

Le rôle du laboratoire de bactériologie, dans la surveillance du traitement antibiotique, réside dans la détermination de CMI des antibiotiques utilisés en clinique, particulièrement dans les cas de méningites ou d'endocardites.

Auparavant, l'étude du pouvoir bactériostatique et bactéricide des liquides biologiques (test de Heilman) était réalisée, mais elle est quasi abandonnée de nos jours.

## Rôle du laboratoire dans la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques

En cas d'échec thérapeutique, il est important de comparer la sensibilité ou la résistance de souches isolées séquentiellement chez un même patient.

L'émergence croissante des résistances acquises aux antibiotiques nécessite une surveillance aiguë de l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques.

Différents réseaux de surveillance existent en France dont la plupart sont fédérés par l'Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA). L'ONERBA a publié des recommandations méthodologiques pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques dans les laboratoires de microbiologie.

Dans chaque laboratoire, il est donc possible de collecter les données de résistance. L'amélioration de la connaissance des résistances participe à la limitation de la diffusion des bactéries multirésistantes dans un établissement mais aussi dans la communauté.

**POUR EN SAVOIR PLUS**


Communiqué 2011 du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Site internet http://www.sfm.asso.fr.

Courvalin P. Interpretive reading of antimicrobial susceptibility tests. Molecular analysis and therapeutic interpretation of in vitro tests to improve antibiotic therapy. ASM News 1992; 58 : 368–75.

Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J. L'antibiogramme. mpc-vidéom; 1985.

Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Antibiogramme. 2e éd. Paris : ESKA; 2006.

Leclercq R. Antibiogramme automatisé et expertise : concept et application. Rev Franç des Lab 1999; 312 : 115–7.

Marcel JP. L'antibiogramme et son impact médical. Antibiotiques 2005; 7 : 53–8.

Potel G, Caillon J, Xiong YQ, et al. La concentration sérique critique des antibiotiques outil thérapeutique et moyen d'évaluation comparative. La Presse Médicale 1995; 24 : 750–2.

Pournaras S, Polou A, Tsakris AJ. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. Antimicrobial Chemotherapy 2010; 65 : 1319–21.

CHAPITRE

# 43 Dosage des antibiotiques : pourquoi, comment ?

F. Jehl

## Pourquoi

### Généralités

Les antibiotiques représentent une des rares classes thérapeutiques dont le récepteur est un organisme vivant. De ce fait, la sensibilité de la cible (la bactérie) au médicament (l'antibiotique) est variable, d'abord ponctuellement selon le couple antibiotique–bactérie, mais aussi dans le temps. En pratique, dans la majorité des cas, cette sensibilité peut être mesurée (CMI, CMB), et l'on dispose ainsi d'un objectif d'efficacité pour les concentrations d'antibiotiques in vivo. Bien que les conditions d'activité des antibiotiques in vitro soient certainement différentes de celles existant in vivo, cela autorise un raisonnement thérapeutique et justifie le dosage des antibiotiques en routine hospitalière quotidienne.

Ainsi, le dosage des antibiotiques est justifié dans au moins deux situations majeures :

- lors des études pharmacocinétiques descriptives et pharmacodynamiques nécessaires à la documentation des dossiers d'autorisation de mise sur le marché (AMM ; avec dosages sériques et tissulaires) ;
- pour le suivi thérapeutique au laboratoire de bactériologie des traitements des maladies infectieuses bactériennes (dosages quasi exclusivement sériques, rares LCR ou liquides pleuraux).

### Suivi thérapeutique des antibiotiques

Ce suivi est justifié pour trois raisons :

- optimisation de la tolérance aux antibiotiques : les risques néphrotoxiques, hépatotoxiques, cardiotoxiques, neurotoxiques sont parmi les plus fréquents. Cette crainte explique pourquoi le dosage des molécules potentiellement toxiques (aminosides, glycopeptides) est réalisé depuis longtemps et fait partie des réflexes des cliniciens ;
- optimisation du traitement des infections bactériennes : les sous-dosages sont très fréquents, avec comme conséquence directe les échecs thérapeutiques. Le sous-dosage peut être considéré comme un vrai risque (de plus en plus fréquemment évoqué dans les conflits médicolégaux) ;
- prévention de l'émergence de résistances. On maîtrise de mieux en mieux les mécanismes de sélection des mutants résistants in vitro mais aussi in vivo, et les sous-dosages apparaissent en première ligne.

L'optimisation de traitement et la prévention de l'émergence de résistance n'ont pris leur réelle signification que grâce aux développements relativement récents de la pharmacodynamie des antibiotiques (PK/PD, *pharmacokinetics/pharmacodynamics* des Anglo-Saxons). Celle-ci a permis de donner un cadre rationnel au suivi thérapeutique des antibiotiques, avec des objectifs clairs de taux sériques à atteindre, aussi bien en termes de résiduelles que de pics, selon la nature des molécules et de leurs modalités de bactéricidie dynamique.

### Apport de la PK/PD au suivi thérapeutique des antibiotiques

#### *Aminosides*

#### Pharmacodynamie des aminosides

##### *Bactéricidie*

Les aminosides sont des antibiotiques caractérisés par une cinétique de bactéricidie très nettement concentration-dépendante ; la vitesse et la profondeur de leur bactéricidie sont directement proportionnelles à la concentration d'antibiotique mise en contact de la bactérie (fig. 43.1) [1]. Toute augmentation de la concentration est suivie d'une augmentation de la bactéricidie. Cependant, le principe de la bactéricidie globale d'un antibiotique ne résulte pas uniquement de sa capacité de tuer, c'est-à-dire de réduire considérablement l'inoculum, mais aussi de prévenir l'émergence de mutants résistants pendant l'intervalle entre deux « apports » d'antibiotique (in vitro ou in vivo). Dans toute population bactérienne, il existe spontanément des mutants résistants préexistants, pour peu qu'elle soit suffisamment dense, c'est-à-dire supérieure à la fréquence de mutation de l'antibiotique considéré. Pour les aminosides, a priori concentrations-dépendants, de fortes concentrations initiales en contact avec la bactérie, même pendant un laps de temps relativement court, permettent, en principe, couplées à l'effet postantibiotique (EPA, voir infra), de prévenir cette émergence avant l'apport suivant (entre deux intervalles) [2]. Mais dans l'hypothèse où le laps de temps entre la fin de l'EPA et le nouvel apport correspond à plusieurs temps de génération de la bactérie spontanément mutante, non tuée pendant la première phase, la population bactérienne est susceptible de recroître, limitant ainsi la bactéricidie dans son ensemble [2]. On voit ici l'importance de la *concentration maximale initiale* sur la bactéricidie des mutants,

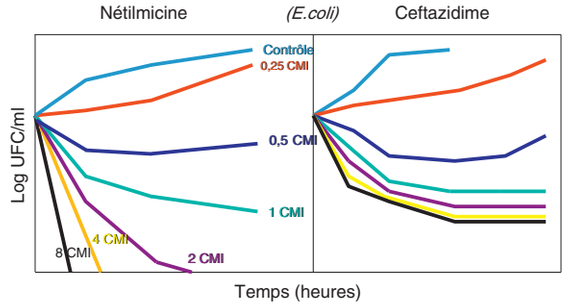



**Fig. 43.1.** – *Bactéricidie dynamique temps-dépendante d'une β-lactamine (ceftazidime) sur E. coli (à droite) par comparaison à la bactéricidie concentration-dépendante d'un aminoside (nétilmicine, à gauche).*
Log UFC/ml = nombre de bactéries/ml. L'augmentation des concentrations (exprimées dans le cas de la figure en multiples de CMI) d'un aminoside sur la souche d'*E. coli* étudiée se traduit par une augmentation de la vitesse de bactéricidie *et* de la profondeur de bactéricidie, proportionnellement à la concentration d'antibiotique. Cette modalité de bactéricidie est qualifiée de concentration-dépendante. Elle a induit des ajustements importants sur les modalités d'utilisation des aminosides. À l'inverse, l'augmentation des concentrations d'une β-lactamine, la ceftazidime, n'améliore la profondeur de bactéricidie qu'à concurrence d'une concentration égale à environ une fois la CMI. Au-delà de cette valeur, l'amélioration de la profondeur de bactéricidie n'est proportionnelle qu'au temps écoulé au contact de l'antibiotique à une valeur au moins égale une fois la CMI. Ce comportement a été qualifié de temps-dépendant.

mais aussi l'importance capitale de la durée de l'EPA pour éviter la recroissance [2,3].

### *Effet postantibiotique (EPA)*

L'EPA peut être défini comme une rémanence de l'effet bactéricide de l'antibiotique même lorsque celui-ci n'est plus présent. L'existence de cet EPA a été démontrée aussi bien in vitro qu'in vivo [4].

D'une façon générale, l'EPA in vitro des aminosides varie entre 1 heure et plusieurs heures en fonction de la bactérie : 1 à 2 heures pour *S. aureus*, 2 à 8 heures pour les bacilles à Gram négatif. Son homologue in vivo est plus conséquent. En fait, la durée de l'EPA in vitro est proportionnelle à deux paramètres : la concentration de l'antibiotique pendant la période de contact et la durée de ce contact. Plus la concentration est élevée, et plus elle est élevée longtemps, plus l'EPA est important. C'est également vrai in vivo. On voit que tout schéma d'administration favorisant ces deux paramètres est à privilégier (dose unique journalière [DUJ]). La concentration élevée assure une bactéricidie optimale en diminuant l'inoculum, et de ce fait le risque d'émergence de mutants résistants, en favorisant l'EPA, qui prévient également des recroissances secondaires. La durée de l'EPA est donc très importante.

### *Résistance adaptative*

Il s'agit de l'apparition d'une résistance phénotypique des bactéries ayant survécu à ce premier contact [5]. Leur CMI peut augmenter considérablement, et ce pendant un laps de temps, de l'ordre de quelques heures à 24 à 36 heures. Cette augmentation de CMI s'accompagne d'une diminution de la vitesse de bactéricidie, ainsi que d'une diminution de l'EPA. Cette résistance adaptative dure tant qu'il y a de l'antibiotique dans le milieu. Le retour à la sensibilité normale de la bactérie est d'autant plus long que l'on multiplie ses contacts avec l'antibiotique pendant la phase de résistance adaptative. Cela plaide clairement en faveur d'un espacement des doses, afin de permettre à la bactérie de retrouver sa sensibilité normale.

## Paramètres pharmacodynamiques clés des aminosides

Les caractéristiques de la bactéricidie dynamique des aminosides ont fait émerger deux paramètres clés comme étant prédictifs à la fois de leur efficacité bactérioclinique et de leur capacité de prévenir l'émergence de mutants résistants [1–6] : le quotient inhibiteur maximal sérique (QI max = Cmax/CMI), et le rapport aire sous courbe des concentrations sériques par la CMI (ASC 24 heures/CMI). La CMI est celle relative à la bactérie responsable de l'infection. Si, pour ce second paramètre, la valeur cible à atteindre n'est pas encore très clairement définie mais de l'ordre de 250 selon les auteurs et les situations, il existe un consensus sur la valeur du rapport Cmax/CMI qui doit être compris entre 8 et 10 fois la CMI (de nombreuses revues sont consacrées à ce sujet [6]). On saisit aisément l'importance de la valeur prise par le Cmax. Lorsque la documentation bactériologique n'est pas disponible, il est prudent de postuler que la CMI se situe à la valeur maximale qu'elle puisse prendre dans la catégorisation sensible, c'est-à-dire la concentration critique inférieure telle qu'elle est définie par le CA-SFM. Ces valeurs figurent dans le tableau 43.1, où apparaissent également les objectifs à atteindre. Les CMI peuvent ainsi imposer des pics sériques de l'ordre de 40 à 80 mg/l selon l'aminoside

**TABLEAU 43-1**

**Valeurs requises pour T > CMI à une activité bactéricide pour différents couples antibiotiques–bactéries.**

| *Couple antibiotique/ bactéries* | *T > CMI requis pour une activité bactéricide* |
|---|---|
| C3G/entérobactéries | 70 |
| C3G/*Staphylococcus aureus* | 40 |
| C3G/pneumocoques | 40 |
| Amoxicilline/ pneumocoques | 50 |

et la bactérie. Il est primordial d'obtenir de telles valeurs dès la première injection, pour éradiquer dès le départ les mutants résistants préexistants, s'assurer d'un EPA maximal et s'affranchir de la résistance adaptative. Certains travaux [6] ont clairement montré l'incidence d'un pic d'amikacine élevé d'emblée, supérieur à 40 mg/l, sur la survie de patients de réanimation. Dès lors, toute situation qui ne permettrait pas d'atteindre immédiatement de telles valeurs serait une situation à risque. On retrouve ainsi les patients ayant un volume de distribution significativement supérieur à la moyenne, ou chez qui la demi-vie d'élimination serait considérablement raccourcie. Ces situations sont potentiellement rencontrées chez les patients âgés, pédiatriques, de réanimation, les brûlés, les patients neutropéniques, qui sont autant de justification au dosage du pic des aminosides.

### Conséquences : la monodose journalière

Il convient de privilégier les modes d'administration qui, d'une part, optimisent les paramètres pharmacodynamiques favorables à l'activité bactéricide et, d'autre part, minimisent ceux qui l'entravent. L'objectif étant d'obtenir des pics sériques les plus élevés possibles, ce qui répond à la bactéricidie concentration-dépendante et favorise l'EPA, il semble logique, au moins sur le plan théorique, d'administrer la dose totale journalière en une seule fois. Par ailleurs, administrer la dose suivante suffisamment loin de la précédente minimise l'impact de la résistance adaptative.

**ENCADRÉ**

**Suivi thérapeutique des aminosides**

- dosage au pic sérique, si possible dès la première administration ;
- dosage en résiduelle : dans les situations à risque (insuffisance rénale, coadministration de substances néphrotoxiques, etc.), au-delà de 5 jours de traitement.

## *β-lactamines*

### Objectifs à atteindre

Les β-lactamines sont des antibiotiques temps-dépendants. Le paramètre prédictif de l'efficacité bactérioclinique est le temps pendant lequel les concentrations sériques sont supérieures à la CMI (fig. 43.2). Selon le couple antibiotique–bactérie, il doit atteindre des valeurs comprises entre 40 et 70 % pour garantir des conditions optimales de guérison bactérioclinique (tableau 43.2) [1]. Il n'est cependant pertinent que dans les infections modérées à peu sévères et semble peu utile dans un contexte de réanimation, où les infections sont plus sévères, sur des terrains souvent débilités. Dans les faits, des travaux de bactéricidie in vitro, des modèles PK/PD d'infection in vitro, surtout à *P. aeruginosa*, des modèles d'infections expérimentales

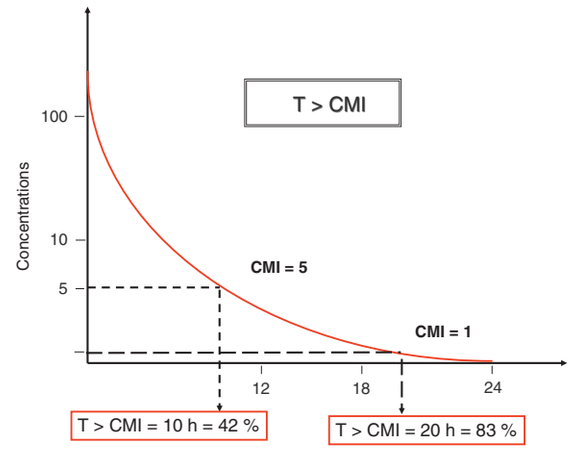



**Fig. 43.2.** – *T > CMI : il s'agit du temps pendant lequel les concentrations sériques sont supérieures à la CMI de l'antibiotique.*
Dans le cas présent d'une administration intraveineuse directe et d'une CMI égale à 5, les concentrations sont supérieures à cette valeur pendant 10 heures, soit 42 % de l'intervalle entre deux administrations. Si la CMI est égale à 1, le T > CMI augmente naturellement à 83 %.

(endocardites), ainsi que des études cliniques ont clairement montré que l'objectif à atteindre est une concentration de l'ordre de 4 à 10 fois la CMI [1,8–16], et ce pendant un temps égal à 100 % de l'intervalle entre deux administrations. Donc l'objectif passe de T > CMI = 70 % à T > 4–10 CMI = 100 %. Cela signifie qu'à 100 % de l'intervalle (c'est-à-dire au moment de la valeur résiduelle), la concentration doit être égale à 4 à 10 CMI. Traduit en termes de quotients inhibiteurs (QI), cela est équivalent à un QI résiduel sérique compris entre 4 et 10, généralement 8.

### Comment atteindre ces objectifs ?

#### *Voie intraveineuse directe*

À l'exception de la ceftriaxone, la plupart des β-lactamines ont une demi-vie courte, de l'ordre de 1 à 2 heures. Le

**TABLEAU 43-2**

**Différents quotients inhibiteurs utilisables – par exemple le pic sérique divisé par la CMI donne le quotient inhibiteur sérique maximal, QI max sér.**

| *Concentration* | *Divisée par* | *QI résultant* |
|---|---|---|
| Pic sérique | CMI | QI max sérique |
| Résiduelle sérique | | QI résiduel sérique |
| Pic tissulaire | | QI max tissulaire |
| Résiduelle tissulaire | | QI résiduel tissulaire |

**TABLEAU 43-3**

**Concentrations résiduelles usuelles des C3G, comparées aux pré-requis PK/PD. Au-delà d'une CMI = 0,5 mg/l, la voie discontinue (trois injections par jour) n'est plus adaptée.**

| *CMI* | *Concentrations cibles (8 × CMI) QI = 8* | *Concentrations résiduelles des C3G aux posologies usuelles* | |
|---|---|---|---|
| | | *3 ×1 g* | *3 × 2 g* |
| 0,01 | 0,08 | 0,2–2,0 | 0,5–5 |
| 0,1 | 0,8 | | |
| 0,5 | 4 | | |
| 1 | 8 | | |
| 4 | 32 | | |

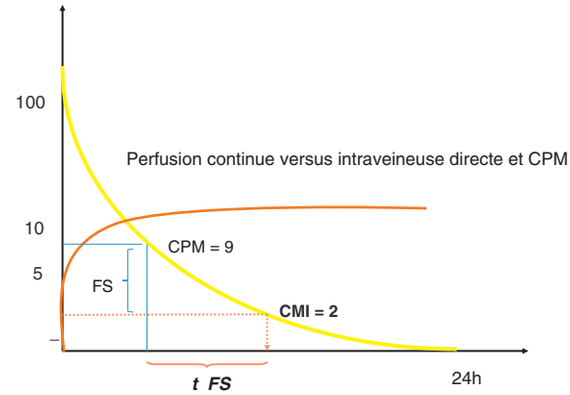



**Fig. 43.3.** – *Le plateau idéal à atteindre lors de l'utilisation de la perfusion continue est une concentration répondant à la fois au critère efficacité bactérioclinique (C = 8 × CMI) et au critère de prévention de l'émergence de résistance (C > CPM).*

tableau 43.3 donne les valeurs des concentrations résiduelles obtenues aux posologies usuelles des céphalosporines de troisième génération. À la posologie de 3 × 1 g ou 2 × 2 g (céfotaxime, ceftazidime, céfépime, aztréonam, etc.), les concentrations résiduelles obtenues ne « couvrent » pas les CMI supérieures à 0,1 mg/l en regard du pré-requis d'un QI au moins égal à 8. Une augmentation de la dose unitaire (3 × 2 g) n'améliore guère le résultat. Au-delà de CMI de 0,5 mg/l, l'administration en 2 ou 3 fois devient illusoire. Les objectifs PK/PD (8 CMI) sont trop élevés.

De ce fait, la perfusion continue est, en théorie, la voie optimale. La dose perfusée doit être adaptée à l'objectif 8 CMI. Cela représente le seul moyen d'avoir des concentrations en « résiduelles » (en fait en plateau) suffisamment élevées, puisqu'elles gardent théoriquement la même valeur pendant toute la durée de la perfusion (fig. 43.3) [15,16].

### *Perfusion continue*

L'objectif de la perfusion continue est d'atteindre un plateau de concentration de l'ordre de 8 CMI. Lorsque celle-ci est fournie par le laboratoire de bactériologie, la cible est aisée à calculer. Lorsque seul un antibiogramme de type S, I, R (sensible, intermédiaire, résistant) est disponible, il est judicieux de considérer que la CMI est égale

**TABLEAU 43-4**

**Concentrations critiques des β-lactamines (valeurs 2011)*.**

| *Antibiotiques* | *Bactéries* | *Concentration critique inférieure* | *Concentration critique supérieure* |
|---|---|---|---|
| Céfotaxime, ceftriaxone | Entérobactéries | 1 | 2 |
| Ceftazidime, céfépime, cefpirome | Entérobactéries | 1 | 8 |
| Ceftazidime, céfépime, cefpirome | *P. aeruginosa* | 8 | 8 |
| Pipéracilline/tazobactam | Entérobactéries | 8 | 64 |
| Pipéracilline/tazobactam | *P. aeruginosa* | 16 | 64 |
| Imipénème, méropénème | Entérobactéries | 2 | 8 |
| Imipénème | *P. aeruginosa* | 4 | 8 |
| Méropénème | *P. aeruginosa* | 2 | 8 |
| Ertapénème | Entérobactéries | 0,5 | 1 |
| Aztréonam | Entérobactéries | 1 | 8 |
| Aztréonam | *P. aeruginosa* | 1 | 16 |

* La concentration critique inférieure doit être utilisée dans le calcul de l'objectif à atteindre lors du suivi thérapeutique mené par le dosage des antibiotiques. Elle peut varier selon la bactérie pour un antibiotique donné.

à la concentration critique inférieure de l'antibiotique (concentration la plus élevée autorisant encore à classer la bactérie dans la catégorie « sensible »). Ces valeurs ont été récemment révisées et varient d'une molécule à l'autre. Une interprétation bactérioclinique documentée, éventuellement suivie d'une adaptation posologique imposent la mesure des CMI ponctuelles des bactéries isolées dans les situations critiques (tableau 43.4).

### *Quelle dose perfuser en 24 heures ?*

La variabilité pharmacocinétique, aux origines multiples, chez les patients de réanimation fait qu'il est quasi impossible de prévoir d'emblée quelle sera la dose à perfuser pour atteindre un objectif fixé. Pour la ceftazidime, par exemple, on connaît une variabilité de 10 à 20 % chez le volontaire sain, de 30 à 40 % chez les malades de chirurgie et jusqu'à 50 à 70 % chez les patients de soins intensifs [17–19]. Les valeurs présentées dans le tableau 43.5 témoignent de cette variabilité importante. En conséquence, le dosage est impératif, bien entendu en résiduel lors d'administrations discontinues avec pour objectif 8 fois la CMI, mais aussi lors de l'utilisation de la perfusion continue. Cette voie d'administration ne dispense en aucun cas du suivi thérapeutique ; elle le simplifie cependant, la mesure au plateau pouvant se faire à n'importe quel moment de la perfusion continue.

## β-lactamine et prévention de l'émergence de résistance

### *Paramètres impliqués*

Le rapport ASC 24 heures/CMI (fig. 43.4) est prédictif de la capacité de la β-lactamine de prévenir l'émergence de résistance. Un pré-requis minimal de 250 semble nécessaire [17–22]. Par ailleurs, il est important que les concentrations sériques restent le moins longtemps possible dans la fenêtre de sélection, c'est-à-dire dans une fourchette de concentration comprise entre la CMI et la concentration de prévention des mutants résistants (CPM ; fig. 43.3 et 43.5).

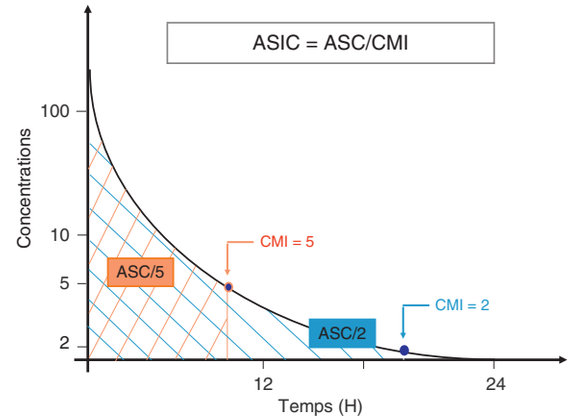



**Fig. 43.4.** – *ASIC : ASC/CMI.*
La surface sous courbe à considérer pour le calcul est celle obtenue par les concentrations *supérieures à la CMI*. Dans le cas présenté, il s'agit d'une seule administration par 24 heures. Le principe du calcul reste le même pour 2, 3, ou plus administrations par 24 heures.

### *CPM et perfusion continue*

Le plateau idéal à atteindre lors de l'utilisation de la perfusion continue est une concentration répondant à la fois au critère d'efficacité bactérioclinique ($C = 8 \times CMI$) et au critère de prévention de l'émergence de résistance ($C > CPM$) (fig. 43.3).

**TABLEAU 43-5**

**Comparaison des valeurs résiduelles obtenues après administration fractionnée avec la valeur au plateau de la perfusion continue, et variabilité de ce plateau indépendamment de la posologie (d'après [19])*.**

| | *Doses perfusées sur 24 heures (g) (sauf [1])* | *Concentrations à l'équilibre (sauf [2])* | *Écarts* |
|---|---|---|---|
| Ceftazidime | 6 g | 28,4 | 20–30 |
| | 3 g | 29,7 | 10–62 |
| | 4 g | 21 | 6–36 |
| | 3 × 2 g[1] | Cmin = 4,6[2] | |
| | 3 g | | 11–30 |
| | 4 g | | 20–35 |
| | 6 g | | 28–44 |
| Céfépime | 4 g | 28 | 18–39 |
| | 2 × 2 g[1] | Cmin = 3,3[2] | |

* Cette variabilité impose le dosage au plateau lors de l'administration en perfusion continue.

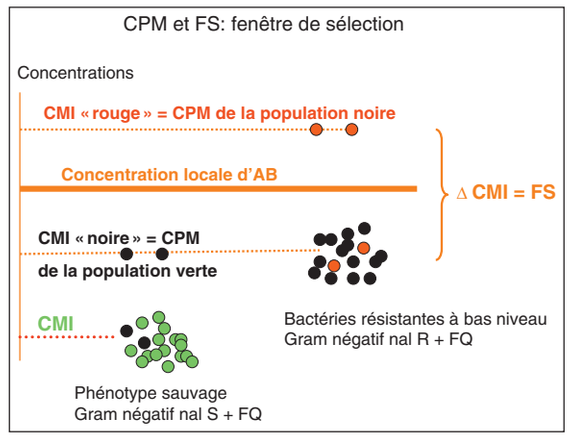



**Fig. 43.5.** – *Concentration de prévention des mutants résistants (CPM).*
La population bactérienne « verte », avec sa propre CMI « verte », possède des mutants résistants préexistants « noirs », avec leur propre CMI « noire », plus élevée. Si la population de départ, comme dans le cas présent, est très sensible, la CPM (CMI des noires) reste relativement basse. Si le niveau de « départ » se situe plus haut, comme c'est le cas de la population principale noire dans cet exemple, les mutants préexistants auront donc des CMI rouges situées à un niveau plus élevées ; c'est la CPM de la population « noire ». FQ : fluroquinolone.

Il est impossible pour l'instant de déterminer la CPM en routine de façon aisée et rapide. Il s'avère cependant que, d'une façon générale, la CPM est de l'ordre de 5 à 10 fois la CMI.

### *Perfusion continue en routine et dosages*

Dans l'utilisation au quotidien de la perfusion continue, deux points sont critiques :
- Quelle dose utiliser d'emblée ?
- Faut-il faire une dose de charge d'emblée avant la perfusion ?

La dose à perfuser est peu prévisible. Le tableau 43.5 confirme qu'une concentration cible donnée peut résulter de doses allant du simple au double. La variabilité est très grande. Les doses proposées dans la littérature oscillent entre 2 g et 6 g/24 heures, parfois plus. Le point essentiel est de doser le plateau obtenu 3 à 4 heures suivant le début de la première perfusion et d'adapter en fonction du résultat et de l'objectif fixé (c'est-à-dire 8 CMI si elle est mesurée, 8 fois la concentration critique inférieure si le résultat est uniquement « S »). Notre expérience prouve que, dans la très grande majorité des cas, la première dose est trop faible ; la deuxième dose est très souvent revue à la hausse. En conséquence, il peut paraître raisonnable de privilégier d'emblée une forte dose susceptible d'être plus efficace, quitte à la diminuer le cas échéant (situation rare). Le risque encouru semble mineur en regard du risque de sous-dosage pour des posologies trop faibles. Le point crucial reste le contrôle du taux sérique obtenu qui devient le déterminant majeur de l'adaptation posologique. Dans cette logique, il paraît inacceptable d'avoir une période de « latence » en début de perfusion nécessaire à l'antibiotique pour atteindre le plateau. La dose de charge semble donc incontournable.

**ENCADRÉ**

**Le suivi thérapeutique des β-lactamines dans les infections sévères, ou à BMR, ou en présence de CMI élevées, ou à *P. aeruginosa* (+ carbapénèmes, + ceftazidime, + pipéracilline-tazobactam, + aztréonam, etc.), ou hémodynamique perturbée, ou brûlés, ou polytraumatisés, ou mucoviscidose :**
- dosage des résiduelles lors d'administration discontinues (même perfusion courte), ou dosage au plateau en perfusion continue de 24 heures
- objectif : 8 CMI, ou 8 fois concentrations critiques inférieures

## *Fluoroquinolones*

### Pharmacodynamie des fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont caractérisées par une bactéricidie de type concentration-dépendante. Les paramètres PK/PD pertinents sont le rapport ASC/CMI (aire sous courbe des concentrations sériques/CMI) et le QI max (Cmax sérique/CMI). Le premier est prédictif de l'efficacité bactérioclinique lorsqu'il atteint le pré-requis ; le second est en relation avec la capacité de l'antibiotique de prévenir l'émergence de mutants résistants.

Les nombreux mécanismes de résistances jouent un rôle important dans la pharmacodynamie des fluoroquinolones. Pris isolément, ces mécanismes n'ont pas les mêmes répercussions sur la sensibilité des bactéries. Les mutations touchant les topoisomérases sont responsables des plus hauts niveaux de résistance (après deux mutations successives, sur le gène *gyr A* puis le gène *par C*). Les autres mécanismes (imperméabilité, pompes à efflux, protéine qnr, AAC6') ont plutôt pour effet direct une résistance de bas niveau, mais ils facilitent l'apparition des résistances de haut niveau. Ils ont pour effet d'*augmenter la CPM* et donc d'augmenter le risque de sélection de résistance [23–26] (fig. 43.6). L'acquisition d'un mécanisme de résistance par imperméabilité (ou par efflux, ou par protéine qnr) peut parfois impliquer une résistance clinique dès la première mutation des topoisomérases (fig. 43.7 et 43.8). Ce sont donc des situations qui peuvent justifier de dosages destinés à vérifier les concentrations sériques.

### Objectifs à atteindre en termes d'efficacité

L'efficacité des fluoroquinolones est liée à l'obtention d'un rapport ASC/CMI égale au moins à 30 pour les bactéries à Gram positif, en particulier pour le pneumocoque, et des

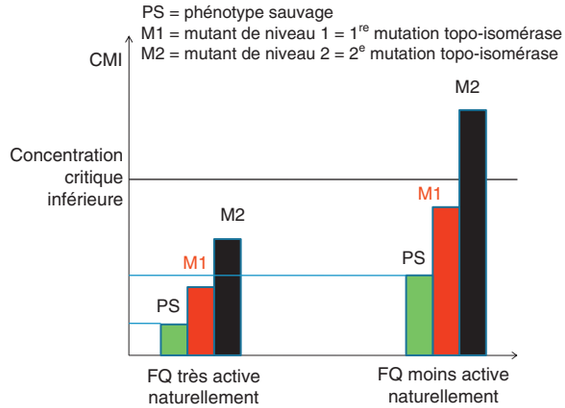



**Fig. 43.6.** – *Les mutations touchant les topoisomérases se succèdent et s'additionnent.*
Lorsque le niveau de départ est suffisamment « bas », les CMI restent inférieures à la concentration critique inférieure, même au terme de la deuxième mutation. Au contraire, si le niveau de départ est « trop haut » (quelle qu'en soit l'origine), la souche devient résistante au terme de la deuxième mutation. Ainsi, le niveau de la sensibilité de départ est un paramètre très important dans l'obtention des mutants de haut niveau.
FQ : fluroquinolone.

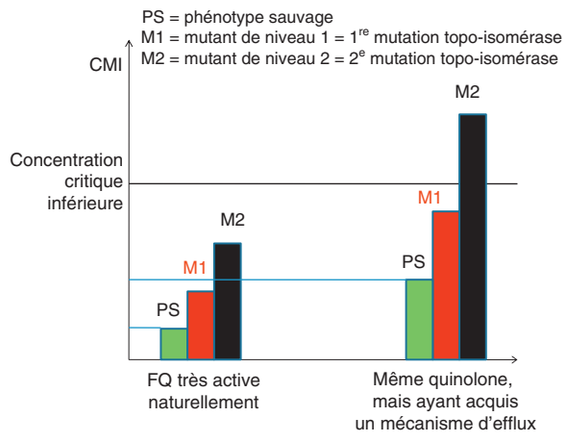



**Fig. 43.7.** – *L'acquisition d'un mécanisme d'efflux met une quinolone, même très active naturellement, dans une situation où l'acquisition d'une résistance de haut niveau est plus probable. Elle augmente la CPM. FQ : fluroquinolone.*

valeurs de l'ordre de 125 à 250 pour les bactéries à Gram négatif. Cette constatation vaut particulièrement pour les infections respiratoires. L'obtention d'un rapport Cmax/CMI (QI max) > 10 est également prédictif de l'efficacité bactérioclinique vis-à-vis de *P. aeruginosa* [23–26].

## Bactéries à Gram négatif [23–26]

Lorsqu'elles sont du phénotype sauvage, les entérobactéries ont très généralement des CMI très basses. Ces CMI (0,1 ou 0,01 mg/l), confrontées aux concentrations

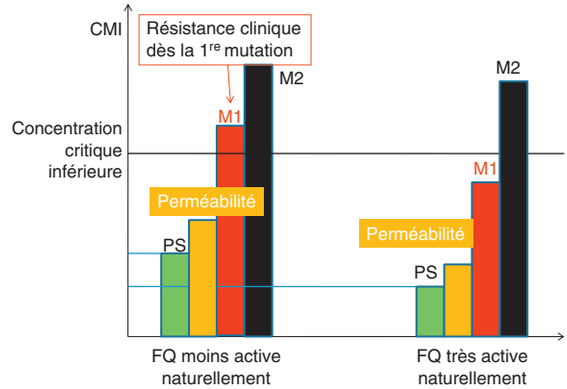



**Fig. 43.8.** – *L'acquisition d'un mécanisme de résistance par imperméabilité (ou par efflux, ou par protéine Qnr) peut parfois impliquer une résistance clinique dès la première mutation des topoisomérases. FQ : fluroquinolone; PS : Phénotyle sauvage.*

usuelles obtenues aux posologies usuelles des fluoroquinolones, permettent d'obtenir des paramètres PK/PD en accord avec les pré-requis à l'efficacité ou la prévention de l'émergence de résistance. Une résistance aux quinolones non fluorées (non sauvages) dans un contexte d'infection sévère impose la mesure de la CMI des fluoroquinolones et l'évaluation de l'ASIC en cours de traitement (par un dosage du pic et de la résiduelle qui permet d'approcher l'ASC et donc de calculer l'ASIC). Pour *P. aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii*, toujours dans un contexte d'infection sévère, la mesure de la CMI peut également s'imposer en raison d'une sensibilité naturelle souvent moyenne de ces espèces à ces antibiotiques.

## Bactéries à Gram positif [23–26]

Si les staphylocoques ont généralement une sensibilité aux fluoroquinolones qui permet de satisfaire aux pré-requis PK/PD, il n'en est pas de même pour le pneumocoque et autres cocci à Gram positif en chaînettes. En effet, les CMI des nouvelles fluoroquinolones sont relativement élevées, quand bien même elles autorisent toujours leur catégorisation clinique en « sensible » en regard des concentrations critiques inférieures dans la grande majorité des cas. Le tableau 43.6 montre que l'écart est faible entre les CMI 90 des pneumocoques et les CMI maximales que les fluoroquinolones récentes peuvent prendre pour rester dans des valeurs acceptables de l'ASIC. Le moindre glissement vers des valeurs de CMI plus élevées mettrait les fluoroquinolones en porte à faux vis-à-vis du pneumocoque. La mesure des CMI semble donc également s'imposer dans les situations à risque, conjointement aux dosages des concentrations sériques.

## Objectifs à atteindre en termes de prévention de l'émergence de résistance

L'objectif est un pic sérique amenant le QI max à 10 à 12. Les considérations relatives à l'ASIC s'appliquent

TABLEAU 43-6

**PK/PD des fluoroquinolones et pneumoques*.**

| | *Dose* | *ASC* | *CMI max tolérée pour ASIC = 30* |
|---|---|---|---|
| Ciprofloxacine | 750 | 16 | 0,53 |
| Ofloxacine | 400 | 28 | 0,90 |
| Lévofloxacine | 500 | 53 | 1,8 |
| Lévofloxacine | 750 | 90 | 3,0 |
| Moxifloxacine | 400 | 35 | 1,1 |
| | *Dose* | *Cmax* | *CMI max tolérée pour QI = 12* |
| Ciprofloxacine | 750 | 4,3 | 0,35 |
| Ofloxacine | 400 | 5,5 | 0,45 |
| Lévofloxacine | 500 | 7,8 | 0,65 |
| Lévofloxacine | 750 | 12,0 | 1,0 |
| Moxifloxacine | 400 | 3,1 | 0,25 |

* Les CMI maximales acceptables pour obtenir une ASIC en adéquation avec le pré-requis sont proches des CMI 90 pour la lévofloxacine et la moxifloxacine vis-à-vis du pneumocoque. Ces chiffres expliquent également pourquoi ciprofloxacine et ofloxacine sont inefficaces sur le pneumocoque. Les CMI maximales acceptables pour obtenir un QI en adéquation avec le pré-requis sont proches des CMI 90 de ces antibiotiques vis-à-vis du pneumocoque. Ces chiffres expliquent l'incapacité de la ciprofloxacine et de l'ofloxacine de prévenir l'émergence de résistance du pneumocoque. Ils montrent également que la situation pour lévofloxacine et moxifloxacine, si elle est acceptable, ne laisse aucune marge de CMI. Toute évolution vers des CMI augmentées emballerait un processus de résistance.

aussi au QI max (CMI, concentrations sériques). Ainsi, les entérobactéries acide nalidixique-R, *P.aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. et *S. pneumoniae* forment-ils des couples à risque avec une fluoroquinolone. Cela s'avère une fois de plus particulièrement vrai avec le pneumocoque (tableau 43.6), pour lequel les CMI 90 sont très proches des valeurs de CMI maximales au-delà desquelles le risque d'émergence de résistance est réel. La CPM n'est pas un paramètre mesurable en routine et est donc plus difficile à exploiter dans ce contexte. Néanmoins, il est intéressant de constater, chaque fois qu'elle a été explorée, qu'elle est sensiblement égale à une dizaine de fois la CMI, ce qui coïncide avec le pré-requis de 12 pour le QI max.

ENCADRÉ

### Le suivi thérapeutique des fluoroquinolones

- inutile sur les entérobactéries de phénotypes sauvages (Nal S) ;
- pics et résiduelles pour *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., entérobactéries Nal R et infections sévères, pneumopathies ou autres infections sévères à pneumocoques (particulièrement si résistance à haut niveau à la norfloxacine, c'est-à-dire contact au disque par diffusion). Calculer une aire sous courbe approchée (ASC = [pic + résiduelle]/2 × intervalle), et ASIC = ASC/CMI. Valeur cible : 30 (Gram +) et 250 (Gram –) ;
- prévention de la résistance QI max : au pic, valeur cible ; 12 fois la CMI.

## *Pharmacodynamie des glycopeptides* [27–31]

Les glycopeptides sont considérés de façon très consensuelle comme des antibiotiques dont les modalités d'activité bactéricide sont temps-dépendantes. Il existe un faisceau d'arguments obtenus aussi bien in vitro qu'in vivo, à travers de nombreux modèles d'infections expérimentales ou en clinique humaine :

- in vitro : travaux de bactéricidie dynamique ;
- in vivo : infections expérimentales telles que péritonites à staphylocoques ou pneumocoques, endocardites à *S. aureus*, infections à *S. aureus* chez la souris neutropénique, endocardite à entérocoques ;
- in vivo en clinique humaine, telles que septicémies à *S. aureus* traitées par la teicoplanine, avec un succès thérapeutique corrélé au Cmin et QI min, infections à *S. aureus* méti-R (teicoplanine) avec mise en évidence de l'importance du T > CMI et surtout du QI sérique résiduel, dont la valeur seuil a été établie à 8.

### Objectifs à atteindre en termes d'efficacité et de prévention de la résistance

Comme pour les β-lactamines, l'efficacité bactérioclinique des glycopeptides est liée à l'obtention d'un quotient inhibiteur résiduel de l'ordre de 8 (QI rés = 8), ce qui correspond à un T > 8 CMI = 100 %. Elle est également corrélée à l'ASIC pour une valeur autour de 400. La prévention de l'émergence de résistance est aussi corrélée à l'ASIC.

### Quotient inhibiteur résiduel

Pour des staphylocoques de phénotypes sauvages, ou ceux pour lesquels les CMI ne dépassent pas 1 mg/l, les posologies « usuelles » des glycopeptides (teicoplanine 400 mg/j, vancomycine 3 fois 500 mg) autorisent des quotients inhibiteurs en adéquation avec les pré-requis PK/PD des glycopeptides en termes d'efficacité. Ces pré-requis sont a fortiori atteints avec des posologies supérieures.

Certaines souches de staphylocoques, de plus en plus nombreuses, sont caractérisées par des CMI approchant 2 mg/l, limite actuelle de sensibilité. Pour ces CMI supérieures à 1 mg/l, les pré-requis du quotient inhibiteur ne sont plus atteints aux posologies « basses » des glycopeptides. Il faut alors recourir aux posologies « élevées », 800 mg (ou plus) pour la teicoplanine, et à la perfusion continue pour la vancomycine. Il est à noter que la dose à perfuser pour atteindre le pré-requis est imprévisible, à l'instar de ce que l'on observe pour les β-lactamines. Cela justifie le recours aux dosages au plateau pour vérifier l'obtention d'une concentration égale à au moins 8 fois la CMI. La dose de charge avant la perfusion continue semble incontournable.

### ASIC

Comme pour le QI résiduel, les posologies « usuelles basses » des glycopeptides autorisent des ASIC en adéquation avec les pré-requis PK/PD en termes d'efficacité et de prévention de la résistance, lorsque les CMI ne dépassent pas 1 mg/l. Pour des CMI supérieures à 1 mg/l, il faut recourir aux posologies « élevées », et à la perfusion continue pour la vancomycine.

ENCADRÉ

**Le suivi thérapeutique des glycopeptides**

- inutile sur les phénotypes sauvages ;
- dans les infections sévères, ou à staphylocoques à CMI élevées, ou hémodynamique perturbée, ou brûlés, ou polytraumatisés, ou mucoviscidose ; endocardites, infections ostéoarticulaires ;
- dosage des résiduelles lors d'administrations discontinues (même perfusion courte), ou dosage au plateau en perfusion continue de 24 heures ;
- objectif : 8 CMI, ou 8 fois concentrations critiques inférieures.

## Comment

On identifie traditionnellement trois grands groupes de méthodes de dosages des antibiotiques :

- microbiologiques [32–34] ;
- immuno-enzymatiques [33] ;
- chromatographiques et électrophorétiques [35–37].

### Dosages microbiologiques

#### *Principe général*

Ce sont les plus anciennement utilisés. Ils font appel à des méthodes qui dosent l'activité microbiologique globale du sérum contenant l'antibiotique. Les méthodes microbiologiques utilisent la comparaison des diamètres obtenus avec une gamme de concentrations connues de l'antibiotique vis-à-vis d'une bactérie sensible incluse dans une gélose, aux diamètres d'inhibition de l'échantillon à doser. La bactérie peut également être ensemencée à la surface de la gélose. Le liquide biologique à doser peut être placé dans un cylindre ou déposé sur un disque et diffuser dans la gélose. De nombreuses variations dans les conditions techniques de réalisation existent concernant surtout la nature de la souche indicatrice, les milieux de culture, les temps et température d'incubation. Lors des associations d'antibiotiques, il faut ajouter des inhibiteurs de l'antibiotique qu'on ne souhaite pas doser.

#### *Utilité actuelle*

Cette technique n'est plus utilisable en routine car, en raison des délais de réponse trop longs, elle ne répond pas aux impératifs de rapidité dont doit bénéficier un ajustement posologique. Elle peut encore présenter un intérêt lors d'études pharmacocinétiques de nouvelles molécules, dans la recherche d'éventuels métabolites actifs par comparaison avec des méthodes plus spécifiques comme les méthodes immunologiques et surtout chromatographiques. Elle peut être informative a posteriori dans l'explication de certains échecs thérapeutiques.

### Dosages immunologiques

#### *Principes de base*

Le principe consiste à fixer un anticorps spécifique sur l'antigène d'intérêt (antibiotique à doser), puis à révéler la présence de cet anticorps, avec un second anticorps anti-anticorps accroché à un révélateur.

On distingue deux grands types de dosages immunologiques utilisant un marqueur, selon que le réactif, c'est-à-dire l'anticorps, est limitant ou en excès par rapport à l'antigène (antibiotique) à doser.

- *Méthode directe : dosage avec excès de réactif.* La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps fixe. Il est ensuite révélé par un anticorps marqué. On mesure la fraction liée qui augmente avec la concentration en antigène à doser. Le signal est croissant (fig. 43.9).
- *Méthode indirecte, avec réactif limitant.* L'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps. La totalité des sites anticorps disponibles est liée. On mesure la fraction libre qui est inversement proportionnelle à la concentration en antibiotique. Le signal est décroissant (fig. 43.10).

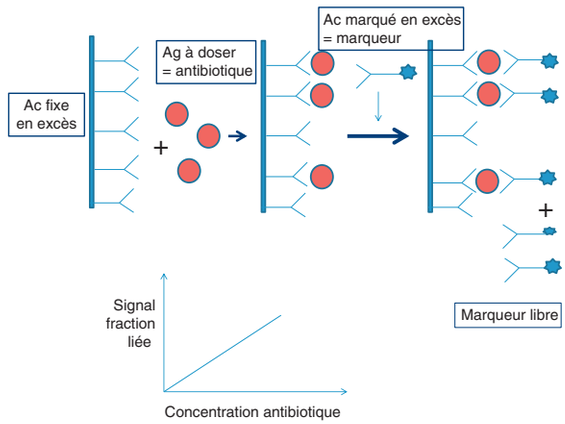



**Fig. 43.9.** – *Méthode directe, avec excès de réactif.* La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps (Ac) fixe. Il est ensuite révélé par un anticorps marqué. On mesure la fraction liée qui augmente avec la concentration en antigène (Ag) à doser. Le signal est croissant.

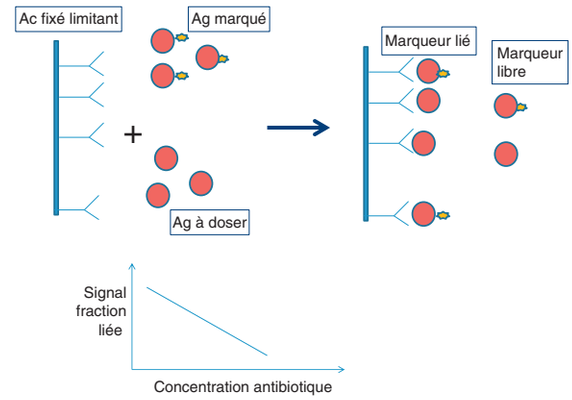



**Fig. 43.10.** – *Méthode indirecte, avec réactif limitant.* L'antigène (Ag) à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps (Ac). La totalité des sites anticorps disponibles est liée. On mesure la fraction libre qui est inversement proportionnelle à la concentration en antibiotique.

**TABLEAU 43-7**

**Classification des méthodes de dosages immunologiques.**

| Traceur | Dosages avec compétition (anticorps limitant) | Dosages sans compétition (anticorps en excès) |
|---|---|---|
| Radiomarqué | *Radio-immunoassay* (RIA) | *Immunoradiometric assay* (IRMA) |
| Enzyme | *Enzymo-immunoassay* (EIA)<br>*Enzyme multiplied immunoassay* (EMIT) | *Enzyme-labeled immunosorbent assay* (ELISA) |
| Fluorescent | *Fluoro-immunoassay* (FIA) | *Immunofluorometric assay* (IFMA) |
| Luminescent | *Lumino-immunoassay* (LIA) | *Immunoluminometric assay* (IFLA) |

**TABLEAU 43-8**

**Enzymes utilisées en méthodes immuno-enzymatiques.**

| *Enzymes* | *Sources* | *Substrats* | *Produits* |
|---|---|---|---|
| Lysozyme | Blanc d'œuf | | |
| Malate déshydrogénase | Mitochondries<br>cœur de porc | | |
| Glucose-6P déshydrogénase | | G6-phosphate | NADH ou NADPH, 340 nm |
| Peroxydase | Raifort | H2O2 + orthophénylène diamine<br>H2O2 + Luminol | Produit coloré orange<br>Produit luminescent |
| Glucose oxydase | *Aspergillus niger* | | |
| Phosphatase alcaline | *E. coli* | 4-nitrophényl-phosphate | 4-nitrophénol jaune 405 nm |
| β-galactosidase | *E. coli* | ONPG | 2-nitrophénol jaune 405 nm |

Dans ces deux cas de méthodes par compétition, il faut employer un traceur (marqueur) qui caractérise l'antigène marqué ; il peut s'agir d'une enzyme, d'une molécule radiomarquée, luminescente, fluorescente (tableau 43.7). L'utilisation d'enzymes est fréquente. Elles doivent être faciles à obtenir, et à purifier, stables, et mettre en jeu une réaction produisant un composé coloré (tableau 43.8). La mesure de la liaison du traceur lié à l'anticorps nécessite l'utilisation d'une méthode adéquate de séparation du traceur libre et lié. De nombreuses méthodes de séparation existent (précipitation par polyéthylène glycol, adsorption sur charbon actif, etc.).

## Appareils existants (en 2011)

Le tableau 43.9 recense les appareils existants et les types de dosages leur correspondant. La figure 43.11 montre un de ces appareils.

**TABLEAU 43-9**

**Principaux appareils commercialisés.**

| *Technique* | *Fabricant* | *Appareil* | *Antibiotiques dosés* |
|---|---|---|---|
| EMIT | Dade Behring | Cobas Mira®, ACA® | Gentamicine, tobramycine, nétilmicine, amikacine, vancomycine |
| FPIA | Abbott<br>Roche | TDx® et AxSym®<br>Cobas Integra® | Aminosides, glycopeptides |
| FIA | Dade Behring | Opus® | Vancomycine |
| Spectrophotométrie | Bayer | Immuno I® | Vancomycine |
| | Siemens | Viva E® | Aminosides, vancomycine |

**Fig. 43.11.** – *Automate d'immunodosage des aminosides et de la vancomycine.*
Sur le dessus de l'appareil, au centre, sont visibles les carrousels porteurs d'échantillons ainsi que les bras préleveurs. Sur la gauche, l'écran permet une visualisation de la localisation des différents échantillons sur le plateau.

## *Avantages et inconvénients des méthodes immunologiques*

### Avantages

Indéniablement, le fait de pouvoir travailler sur du sérum sans traitement préalable est d'un grand confort et rend ces techniques très praticables. Le volume de sérum nécessaire est faible, et limite ainsi le volume de sang à prélever (pédiatrie). Ces techniques sont totalement automatisées, et ainsi à la portée de personnel sans formation préalable poussée. Enfin, elles sont parfaitement adaptées au suivi thérapeutique de routine puisque très rapides, le temps nécessaire s'échelonnant de 30 minutes à 2 heures selon le nombre et la diversité des dosages à réaliser. Elles répondent bien à la notion d'urgence qui accompagne parfois le dosage de certains antibiotiques, comme par les aminosides et les glycopeptides dans les situations à risque.

### Inconvénients

Les automates sont fermés et n'autorisent aucun contrôle. Il n'y a aucun moyen de s'assurer du bon déroulement du dosage pour les échantillons des patients en ce qui concerne les interférences. La spécificité n'est pas toujours excellente. Le développement et la mise à disposition des kits sont parfois aléatoires, soumis aux aléas de la rentabilité pour le fabricant. Ces techniques sont coûteuses en réactifs.

## Dosages chromatographiques

La seule technique utilisée est la chromatographie liquide à haute performance (CLHP, fig. 43.12, tableau 43.10). Il s'agit avant tout d'une technique de chromatographie, donc de séparation des constituants d'un mélange. Cette séparation peut se faire aux fins de purification d'un constituant (chromatographie préparative) ou de détection/analyse/dosage (chromatographie analytique). La chromatographie en phase liquide est la plus utilisée. Cela signifie que les deux phases, stationnaire et mobile, non miscibles entre elles, entre lesquelles les constituants du mélange vont se partager de façon préférentielle selon

**Fig. 43.12.** – *Deux systèmes de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) isocratique.*
On distingue deux pompes, de part et d'autre du recueil de l'effluent (éliminé). La vanne et la colonne apparaissent agrandies dans la figure 43.13. Les détecteurs sont sous les pompes. À gauche, l'informatique de pilotage des pompes et d'intégration des données. On peut constater que l'encombrement est mineur.

**TABLEAU 43-10**

**Éléments classiques d'un système de CLHP pour le dosage des antibiotiques.**

| *Solvants d'élution* | *Type de chromatographie* | *Colonnes* | *Types de détecteurs* |
|---|---|---|---|
| Tampon + solvant apolaire (organique) ou polaire dans le même flacon | Isocratique | Support polaire : chromatographie en phase normale (rare)<br>Support apolaire : chromatographie en phase inverse, le plus fréquent<br>Colonne d'échange d'ions (très rare) | Absorbtiométrie UV (Spectro)photomètres<br>Fluorimétrie (Spectro) fluorimètre<br>Électrochimie (rare)<br>Spectrométrie de masse (rare en routine) |
| Tampon + solvant apolaire ou polaire dans deux flacons différents | Proportion constante des deux constituants : isocratique | | |
| | Variation dans le temps (augmentation) du solvant apolaire : technique en gradient | | |

leurs propriétés physicochimiques (et donc se séparer), sont « liquides ». La notion de haute performance est apparue après l'appellation d'origine de chromatographie liquide à haute pression (eu égard aux pressions élevées dans les colonnes), lorsqu'il a semblé évident que cette technique autorisait de « hautes performances » analytiques.

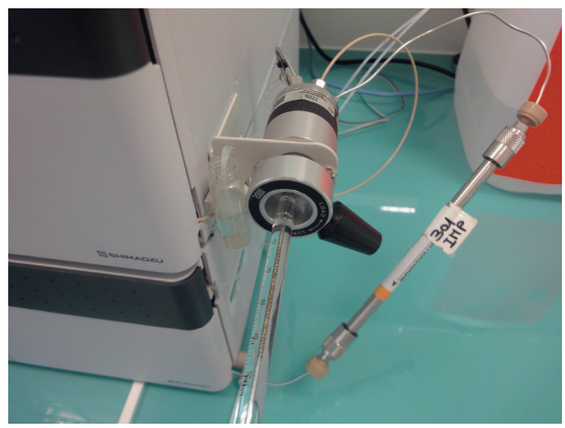


**Fig. 43.13.** – *Vanne d'injection et colonne de chromatographie.*
La seringue en verre sert à charger la vanne calibrée par une boucle d'injection de volume choisi fixe (à l'arrière de la vanne). Une fois chargée, il suffit d'injecter en tournant la manette noire. La colonne présentée mesure 15 cm. Il en existe de plus petites (jusqu'à 3,5 cm, souvent garnie de particules de silice très petites, de l'ordre de 2 à 3 µm) et de plus grandes (25 cm, taille des particules 5 µm). La colonne présentée sert au dosage de l'imipénème, très demandé par les réanimateurs, et d'autres β-lactamines nécessitant les mêmes solvants. Point important : les fixations des tubulures aux colonnes se fait manuellement. C'est la fin de la « plomberie ».

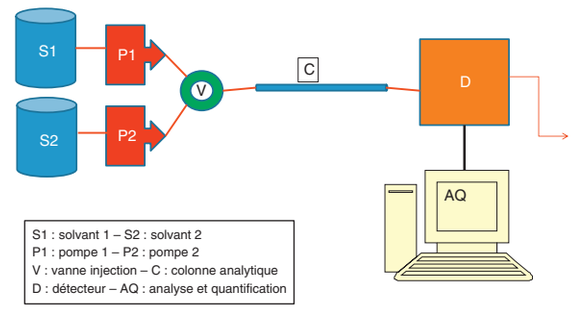



**Fig. 43.14.** – *Schéma d'un système de chromatographie liquide à haute performance.*

## Principes

Le mélange (extrait du sérum contenant l'antibiotique à doser) est déposé via un injecteur en tête de colonne (fig. 43.13). Il est poussé à travers la colonne contenant la phase stationnaire (assimilée à un liquide « fixé » sur la colonne) par la phase mobile propulsée par les pompes. Les substances du mélange ayant plus d'affinité pour la phase stationnaire fixée dans la colonne vont y rester plus longtemps que celles ayant plus d'affinité pour la phase dite mobile, qui circule à travers la colonne (fig. 43.14). On comprend ainsi l'importance de la nature de chacune de ces phases, dont les compositions respectives seront la base et la clé d'une bonne séparation donc d'un dosage correct. La caractéristique physicochimique principale intervenant dans le partage entre les deux phases est la polarité des molécules à séparer.

## Étapes du dosage

### Préparation de l'échantillon

Le sérum ne peut être injecté tel quel dans la colonne. Sa viscosité et sa richesse en composants variés aboutiraient à une obturation rapide des colonnes dont la durée de vie serait ainsi réduite (et le coût de dosage augmenté).

**TABLEAU 43.11**

**Les étapes principales de la préparation des échantillons sanguins.**

| *Étape 1* | *Étape 2* | *Étape 3* | *Étape 4* | *Étape 5* | *Remarques* |
|---|---|---|---|---|---|
| Déprotéinisation : méthanol, acétonitrile | Centrifugation | Injection du surnageant 5 à 50 µl | | | Rapide, souvent suffisant |
| Déprotéinisation : méthanol, acétonitrile | Centrifugation | Reprise du surnageant par 4 à 5 volumes de solvant non miscible : dichlorométhane | Mélange, centrifugation | Injection du surnageant 5 à 50 µl | Chromatogrammes plus « propres » |
| Extraction de l'antibiotique (fluoroquinolones) du sérum par dichlorométhane | Centrifugation | Élimination phase aqueuse Réextraction de l'antibiotique du dichlorométhane par un acide ou une base | Centrifugation | Injection du surnageant | Chromatogrammes très « propres » |
| Dépôt du sérum sur cartouche | Préchromatographie sur cartouche | Injection de l'éluant sortant de la cartouche | | | |

Par ailleurs, la complexité de la composition du sérum aboutirait à des chromatogrammes très complexes et ininterprétables.

Les techniques de préparation sont nombreuses (tableau 43.11).

- Souvent, une simple déprotéinisation volume à volume avec du méthanol ou de l'acétonitrile, ou par un acide (perchlorique, trichloracétique, trifluoroacétique) est efficace. Il suffit pour cela de petits volumes de sérum (50 à 100 µl) que l'on mélange par agitation à un volume équivalent de solvant ou d'acide (fig. 43.15). Une centrifugation adaptée permet de récupérer un surnageant limpide qui peut être injecté dans la colonne. Cette technique est utile en pédiatrie lorsque l'on dispose de faibles volumes de sang. Elle a pour inconvénient de diluer de moitié l'antibiotique et d'abaisser la limite de quantification. Il faut également s'assurer que l'acide ne détruit pas l'antibiotique.
- Il peut également être utile de retraiter le surnageant de déprotéinisation avec un solvant organique non miscible (dichlorométhane par exemple), qui aura pour effet d'éliminer l'acétonitrile en excès et donc de concentrer l'antibiotique dans la phase aqueuse qui surnage. Cette deuxième étape permet d'obtenir des chromatogrammes plus « propres ».
- L'antibiotique peut être extrait directement du sérum de façon plus ou moins spécifique par un solvant organique (hexane, chloroforme, etc.). Il convient ensuite d'évaporer à sec ce solvant et de reprendre le résidu en phase aqueuse avant injection.
- Il faut éviter les simples dilutions du sérum avec un tampon pour le « fluidifier ». Cette technique n'évite pas le colmatage rapide de la colonne.
- Enfin, certaines techniques de préparation utilisent une préchromatographie du sérum menée à la seringue manuellement sur de petites cartouches préconditionnées par des supports souvent identiques à ceux des colonnes analytiques.

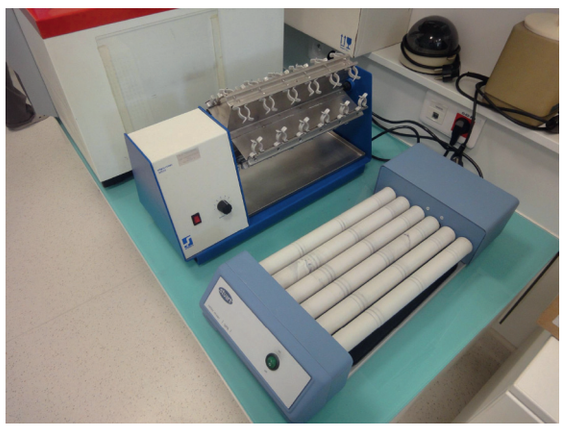


**Fig. 43.15.** – *Deux systèmes d'agitations des échantillons de sérum pour la déprotéinisation ou l'extraction organique.*
À gauche, les tubes fixés par les clips tournent verticalement autour du rotor, à droite, posés entre les rouleaux, ils tournent horizontalement.

## Injection du surnageant d'extraction

Le volume d'injection est variable, de 5 à 50 µl généralement. Il se fait par l'intermédiaire d'une boucle calibrée fixée sur la vanne d'injection, garantissant la reproductibilité du volume d'injection (fig. 43.13), à partir du surnageant d'extraction (fig. 43.16).

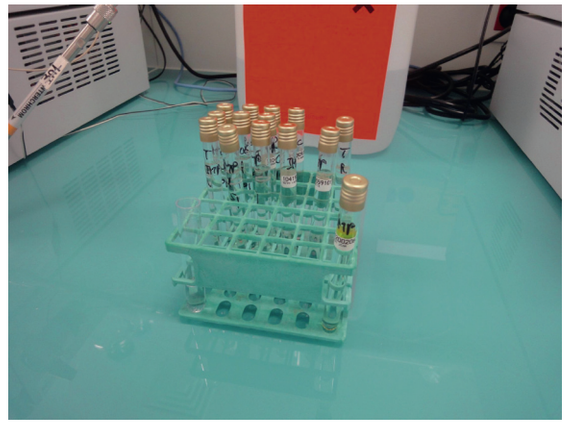


**Fig. 43.16.** – *Portoir garni de 14 échantillons sériques extraits, prêts à être injectés.*
Sur ce portoir, plusieurs molécules seront dosées, mais l'utilisation d'une technique d'extraction commune permet de les traiter toutes en même temps. Deux colonnes et des phases mobiles très proches en composition permettent d'effectuer ces dosages en environ 3 heures, calibrations et contrôles inclus.

## Chromatographie sur colonnes analytiques

Les colonnes analytiques sont de taille et de diamètre variables (3,5 à 25 cm et quelques millimètres, fig. 43.13), selon les besoins. Le paramètre déterminant est la phase stationnaire qui la garnit.

En chromatographie par échange d'ion, la colonne est remplie par une résine échangeuse d'ion. Elle est rarement utilisée pour le dosage des antibiotiques.

La plus fréquente est la chromatographie de partage, au cours de laquelle les composés du mélange se partagent de façon différentielle entre les deux phases, mobile (solvant) et stationnaire (colonne). En chromatographie dite en « phase inverse », la plus courante car la plus performante, la colonne est remplie de billes de silice recouvertes par des greffons apolaires (octadecylsilanes), que l'on apparente à un liquide apolaire. La phase mobile est polaire (tampon) avec proportion variable d'un solvant apolaire. La taille des particules définit les performances de la colonne : plus elles sont petites, plus la colonne est performante (et plus elle peut être courte), mais plus la pression est élevée. La taille varie de 2 à 10 microns généralement. De nombreuses marques existent, qui ne sont pas de qualité et de prix identiques. Sur ce type de colonne, plus la polarité de la phase mobile se rapproche de la polarité de la colonne, plus sa force élutive est grande, et moins les différents constituants du mélange (antibiotique et autres molécules sériques) seront séparés. À l'inverse, moins la phase mobile sera élutive, plus longtemps les différents constituants seront retenus sur la colonne, leur différence de rétention s'allongera, et la séparation sera meilleure. Dans ce dernier cas, cela se fait au détriment de la rapidité. Il convient, lors du développement des techniques, d'optimiser ce rapport de force. La polarité des colonnes étant fixée, il faudra donc jouer sur celle des phases mobiles (voir infra). En chromatographie de partage en phase normale, le solvant est apolaire (organique), et la phase stationnaire polaire. Elle est rarement utilisée pour le dosage des antibiotiques.

## Détection/quantification

En sortie de colonnes, les différents constituants qui ont été séparés passent dans un détecteur où ils sont quantifiés. Le signal émis par le détecteur est mesuré en continu. La ligne de base correspond à l'absorption de la phase mobile passant dans la cuve du détecteur. Chaque fois qu'un composé passe dans la cuve, entraîné par la phase mobile, un pic apparaît ; l'antibiotique à doser est identifié par son temps de passage dans le détecteur après l'injection (fig. 43.17). La quantification se fait par mesure de la hauteur ou la surface du pic. La détection/quantification peut se faire par absorptiométrie dans l'ultraviolet, par fluorimétrie, par néphélémétrie, par électrochimie, par spectrométrie de masse. Le plus souvent, il s'agit d'absorptiométrie à 214, 220 ou 254 nm (photomètre à longueur d'onde fixe ou spectrophotomètre). Cette technique est simple d'application, à condition que l'antibiotique absorbe dans l'ultraviolet, ce qui est très souvent le cas, et très reproductible. Les appareils vont du plus simple (photomètre à filtres, donc longueur d'onde fixe) au plus sophistiqué (spectrophotomètre à barrettes de diode et réalisation du spectre en vol lorsque sort le produit de la colonne).

La visualisation sur écran du chromatogramme (fig. 43.17) permet d'apprécier la qualité de la séparation, et les logiciels d'exploitation permettent de

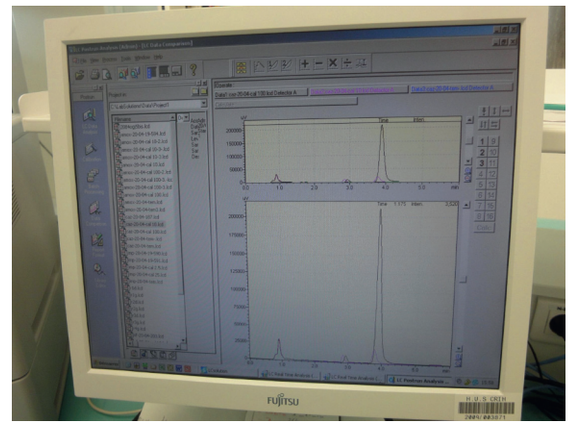



**Fig. 43.17.** – *Chromatogramme d'un dosage de céfotaxime.*
Grand chromatogramme du bas : à 1 et 3 minutes apparaissent des pics inhérents au sérum, non éliminés par l'extraction, mais dont la présence n'est pas gênante, car élués loin du pic de céfotaxime qui apparaît à 4 minutes. Il s'agit de la superposition de deux dosages, l'un a 11,5 mg/l (petit pic), l'autre à 95,8 mg/l (grand pic). La ligne de base obtenue par du sérum témoin sans antibiotique indique clairement l'absence d'interférences au temps de rétention du céfotaxime.

retravailler le chromatogramme pour le rendre plus fiable. L'enregistrement sur disque dur assure une bonne traçabilité du dosage.

### *Composition des phases mobiles*

Le dosage des antibiotiques se fait dans la très grande majorité des cas en phase inverse. La phase mobile est donc polaire, composée majoritairement d'un tampon aqueux (coût faible) avec une proportion variable de solvant apolaire. Deux types d'élution sont possibles :

- en chromatographie isocratique, la composition de la phase mobile est fixe pendant tout le dosage ;
- en chromatographie en gradient, le pourcentage de solvant apolaire change au cours du dosage. Il est donc pompé séparément, d'où nécessité d'une deuxième pompe, les deux fluides étant ensuite réunis dans un mélangeur. Cette technique, facile, est utile pour les séparations « difficiles », ou lors de dosages de plusieurs constituants au cours du même *run*.

Lors de la fabrication de la phase mobile, le respect du pourcentage précis de solvant apolaire est important. Une variation de 1 % de ce solvant peut changer de façon rédhibitoire la force élutive de la phase mobile, et donc l'aspect du chromatogramme, et, partant, la fiabilité de la quantification. De la même façon, le réglage du pH par le tampon doit être très précis.

## Mise en place en pratique du dosage des antibiotiques par CLHP au laboratoire de bactériologie

Nous n'envisagerons dans ce paragraphe que la problématique de l'adaptation dans un laboratoire donné d'une technique déjà éprouvée et publiée. Il ne s'agit pas ici de décrire la chronologie des événements à respecter pour développer une technique « maison », ce qui est plus complexe et plus long.

### *Recherche des techniques publiées*

Il existe de très nombreuses techniques publiées pour la quasi-totalité des antibiotiques. Il est rigoureusement impossible d'en faire la liste exhaustive. Le choix d'une technique passe d'abord par le choix de la revue à explorer dans cet objectif.

Les revues à privilégier sont les suivantes :

- *Journal of Chromatographie, Biomedical Application.* C'est la revue par excellence dédiée aux dosages des xénobiotiques par CLHP, avec, bien sûr, la place qu'il convient de consacrer aux antibiotiques ;
- *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ainsi que *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, qui publient également de façon régulière des articles consacrés au dosage des antibiotiques par CLHP.

De façon encore plus simple, mais moins spécifique, entrer quelques mots clés judicieusement adaptés à la problématique du dosage à résoudre dans un moteur de recherche est toujours fructueux (à cet égard, taper *« antibiotics, HPLC, serum »* dans le plus célèbre de ces moteurs génère plus d'un million de réponses). La vraie difficulté réside dans le tri final. Rechercher dans les revues spécialisées ci-dessus autorise en général un accès à des articles plus en accord avec les préoccupations des microbiologistes.

### *Choix des quelques techniques à mettre à l'épreuve*

Il n'y a pas de règle absolue, mais quelques précautions sont utiles.

- Vérifier que la technique concerne bien des dosages sériques et éventuellement d'autres liquides biologiques si nécessaire. En effet, de nombreuses techniques sont destinées au contrôle de qualité de préparations pharmaceutiques, s'adressant donc à des produits d'emblée très purs.
- S'assurer qu'il s'agisse de chromatographie en phase inverse (solvant apolaire = acétonitrile ou méthanol), la plus praticable.
- Jeter un coup d'œil rapide sur les chromatogrammes en illustration de la publication afin de vérifier que la séparation des pics de l'antibiotique des autres pics inhérents au sérum soit parfaite, avec de la « marge » de part et d'autre du pic d'antibiotique (cela permet de pallier les variations, normales, inhérentes aux différences de lieux et de matériels).
- S'assurer que la technique d'extraction est praticable (il en existe presque toujours une qui soit relativement simple), à savoir souvent déprotéinisation ± *back extraction*.
- S'assurer que la publication donne les qualités de la technique (précision, exactitude, limites de linéarité, limites de détection et quantification, spécificité, nécessité d'ajout d'un standard interne).
- Si le type de colonne sur lequel la technique doit être adaptée est déjà imposé, essayer de trouver une publication utilisant le même type – ce point est précieux.

### *Comment se simplifier la vie au laboratoire*

Le respect de ces quelques règles permet souvent de gagner un temps précieux à l'adaptation d'une technique dans un laboratoire. Il ne faut pas hésiter à utiliser la phase mobile d'une publication avec l'extraction d'une autre. Il existe des extractions applicables à plusieurs antibiotiques d'une même famille, par exemple les β-lactamines entre elles, mais aussi à des molécules appartenant à des familles différentes. Si l'on y ajoute la précaution d'utiliser des phases mobiles ayant la même nature de solvants et de tampons [35,36], l'équilibrage des colonnes pour passer de la phase mobile d'un antibiotique à celle d'un autre, en routine, ne prend que quelques minutes. Les points de calibrations quotidiens pour chaque antibiotique peuvent être préparés sous forme d'aliquotes de sérum aux concentrations utiles de chaque antibiotique, congelés en petits volumes (250 à 500 µl) qui ne mettent que quelques minutes à décongeler et être prêts à l'emploi. Il suffit de les renouveler tous les 6 mois car, congelés à –80 °C, ils sont parfaitement stables (une demi-journée de travail semestriel pour une technicienne).

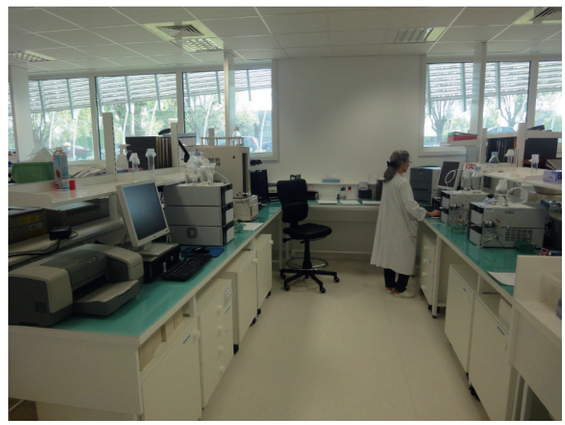


**Fig. 43.18.** – *Deux paillasses dédiées au dosage des antibiotiques par CLHP et immuno-enzymologie, intégrées dans le secteur ouvert de sérologie du laboratoire de bactériologie.*
Plus de 20 antibiotiques peuvent être dosés au quotidien, à « la carte ». Les demandes les plus fréquentes concernent les aminosides, les glycopeptides ; parmi les β-lactamines l'imipénème, le céfotaxime, la ceftazidime, le céfépime, et la pipéracilline (tazocilline), la rifampicine, la ciprofloxacine et la lévofloxacine.

S'il s'avère nécessaire, en fonction des molécules que le laboratoire souhaite doser, d'utiliser deux types de solvants différents avec deux types de tampons différents, il peut être pertinent de consacrer une colonne analytique à chacun des couples solvant–tampon. Cela permettra également un gain de temps au quotidien.

Dans ces conditions il devient possible de doser les antibiotiques majeurs relevant de la CLHP au coup par coup, « à la carte », au fur et à mesure que les sérums arrivent au laboratoire. Ce mode de fonctionnement satisfait aux exigences d'un suivi thérapeutique cohérent des antibiotiques, répondant à la nécessité d'adaptation posologique la plus rapide possible (fig. 43.18).

### *Avantages et inconvénients*

#### Avantages

Plus que tout autre technique, la CLHP, par la visualisation des chromatogrammes, permet de savoir immédiatement si le dosage « s'est bien passé », contrairement aux automates fermés pour les aminosides et les glycopeptides. Les contrôles qualité et les points de calibration permettent de contrôler la technique. Toute interférence intempestive (substance inhabituelle dans le sang du patient, ou insuffisance rénale sévère accumulant un composé en faibles concentrations habituellement, etc.) est apparente sur le pic d'antibiotique, et autorise une mesure corrective (par exemple diminution du taux de solvant organique pour mieux séparer les deux pics, ajustement du pH, etc.).

- Il n'y a a priori aucune limitation dans les possibilités de dosage. À l'exception de quelques très rares molécules (fosfomycine) qui ne « conviennent » pas à la CLHP, tous les antibiotiques peuvent bénéficier de cette technique.
- Elle est rapide, et bénéficie régulièrement d'innovations techniques qui la rendent très praticable.

#### Inconvénients (vrais et faux)

La CLHP souffre d'une réputation de technique onéreuse, difficile à mettre en œuvre, nécessitant un personnel très qualifié, plus adaptée aux techniciens de pharmacologie ou de biochimie ; il s'agit, pour certains de ces points, d'une contrevérité. La difficulté réelle réside dans le *développement* d'une nouvelle technique. L'*adaptation* est considérablement plus aisée. À l'heure où aucun laboratoire de bactériologie ne recule devant l'emploi de la biologie moléculaire (en 2011), exigeante en termes de précautions d'utilisation (PCR, séquençage, kits moléculaires en tous genres, etc.), il n'y a aucune raison de considérer la CLHP comme inaccessible techniquement. Il est en revanche évident que son application au service du dosage des antibiotiques doit rester l'apanage des laboratoires de bactériologie *en routine* ; en effet, c'est là que se trouve tout l'environnement nécessaire à la compréhension du besoin du dosage, à sa prescription correcte, à son interprétation (CMI, espèce bactérienne concernée, phénotype sauvage ou non, antécédent de telle ou telle souche dans le service concerné, etc.), au dialogue bactérioclinique.

Le coût d'investissement n'est pas plus important que celui d'autres techniques devenant habituelles en laboratoire de bactériologie.

La véritable avancée à espérer pour cette technique de dosage des antibiotiques (en 2011) est le développement d'un (ou de plusieurs) réseaux de contrôle de qualité en vue de l'accréditation.

### Électrophorèse capillaire [37]

Cette technique peut être un complément utile à la CLHP pour les molécules trop polaires ne pouvant être chromatographiées (fosfomycine, fosmidomycine). Il s'agit d'une véritable électrophorèse réalisée dans un tube capillaire sous une différence de potentiel très élevée. Très spécifique, elle souffre cependant d'une limite de détection parfois insuffisante, et d'un coût d'investissement et d'utilisation élevé.

## Conclusion

Le développement de la PK/PD des antibiotiques a eu, entre autres, le mérite de donner un cadre cohérent au choix et au suivi thérapeutique des traitements par les antibiotiques (cela est également vrai pour les autres anti-

infectieux). Il n'est bien entendu pas question de doser tous les antibiotiques chez tous les patients, mais de se consacrer du mieux possible aux situations qui le méritent réellement. L'augmentation de la résistance, voire de la multirésistance, couplée à l'absence de nouvelles molécules, nous oblige à « mieux faire » avec ce dont nous disposons. Il a fallu attendre ces extrémités pour voir apparaître la notion de « bon usage des antibiotiques ». Ce bon usage passe de façon incontournable par le dosage des antibiotiques. Ce dernier a eu la faveur des cliniciens dans un souci de prévention de la toxicité ; il est évident qu'il doit bénéficier d'un engouement encore plus fort en termes d'efficacité bactérioclinique et de prévention de l'émergence de résistance. Les technologies existantes le permettent et il est du rôle du bactériologiste de le promouvoir avec l'aide des cliniciens concernés.

**RÉFÉRENCES**


[1] Craig WA, Legget J, Totsuka K, Vogelman B. Key pharmacokinetic parameters of antibiotic efficacy in experimental animal infections. J Drug Dev 1988 ; 1 : 7–15.

[2] Lacy MK, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R. The pharmacodynamics of aminoglycosides. Clin Infect Dis 1998 ; 27 : 23–7.

[3] Drusano GL. Human pharmacodynamics of beta-lactams, aminoglycosides, and their combinations. Scand J Infect Dis 1991 ; 74 : 235–48.

[4] MacKenzie FM, Igould IM. The post-antibiotic effect. J Antimicrob Chemother 1993 ; 32 : 519–37.

[5] Karlowsky JA, Saunders MH, Harding GA, Hoban DJ, Zhanel GG. In vitro characterization of aminoglycoside adaptative resistance in *P. aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1996 ; 40 : 1387–93.

[6] Beaucaire G. The role of aminoglycosides in modern therapy. J Chemother 1995 ; 7(Suppl. 2) : 111–23.

[7] Kashuba ADM, Bertino JS, Nafzinger AN. Dosing of aminoglycoside to rapidly attain pharmacodynamic goals and hasten therapeutic response by using individualized pharmacokinetic monitoring of patients with pneumonia caused by Gram negative organisms. Antimicrob Agents Chemother 1998 ; 42 : 1842–4.

[8] Tessier PR, Nicolau DP, Onyeji CO, et al. Pharmacodynamics of intermittent- and continuous-infusion cefepime alone and in combination with once-daily tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro infection model. Chemotherapy 1999 ; 45 : 284–95.

[9] Xiong YQ, Caillon J, Zhou XT, et al. Treatment of experimental rabbit infective endocarditis due to a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with high dose ceftazidime alone and combined with amikacin or sulbactam or both. J Antimicrob Chemother 1995 ; 35 : 697–706.

[10] Manduru M, Mihm LB, White RL, et al. In vitro pharmacodynamics of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother 1997 ; 41 : 2053–6.

[11] Mouton JW, Den Hollender JG. Killing of *Pseudomonas aeruginosa* during continuous and intermittent infusion in an in vitro pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother 1994 ; 38 : 931–6.

[12] Mouton JW, Vinks A.T.M.M.. Is continuous infusion of beta-lactams worthwile ? Efficacy and pharmacokinetic considerations. J Antimicrob Chemother 1996 ; 38 : 5–15.

[13] Lee SY, Kuti JL, Nicolau DP. Cefepime pharmacodynamics in patients with expended spectrum beta-lactamases (ESBL) and non-ESBL infection. J Infect 2007 ; 54 : 463–8.

[14] Tam VH, McKinnon PS, Akins RL, et al. Pharmacodynamics of cefepime in patients with Gram negative infections. J Antimicrob Chemother 2002 ; 50 : 425–8.

[15] Craig WA, Ebert SC. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1992 ; 36 : 2577–83.

[16] Benko AS, Cappelletty DM, Kruse JA, et al. Continuous infusion versus intermittent administration of ceftazidime in critically ill patients with suspected gram-negative infections. Antimicrob Agents Chemother 1996 ; 40 : 691–5.

[17] Ryback MJ. Pharmacodynamics : relation to antimicrobial resistance. Am J Infect Control 2006 ; 34 : S38–45.

[18] Roberts JA, Paratzab J, Paratza E, et al. Continuous infusion of β-lactam antibiotics in severe infections : a review of its role. Int J Antimicrob Agents 2007 ; 30 : 11–8.

[19] Carlet J. Intérêt clinique de l'administration intraveineuse continue de la ceftazidime. Antibiotiques 2002 ; 4 : 5–8.

[20] Olofsson SK, Geli P, Andersson DI, et al. Pharmacodynamic model to describe the concentration-dependent selection of cefotaxime-resistant *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2005 ; 49 : 5081–91.

[21] Eagye KJ, Nicolau DP, Lockhart SR, et al. A pharmacodynamic analysis of resistance trends in pathogens from patients with infection in intensive care units in the United States between 1993 and 2004. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2007 ; 6 : 11–7.

[22] Kasiakou SK, Sermaides GJ, Michalopoulos A, et al. Continuous versus intermittent intravenous administration of antibiotics : a meta-analysis of randomised controlled trials. Lancet Infect Dis 2005 ; 5 : 581–9.

[23] Noreddin AM, Marras TK, Sanders K, et al. Pharmacodynamic target attainment analysis against *Streptococcus pneumoniae* using levofloxacin 500mg, 750mg and 1000mg once daily in

RÉFÉRENCES

plasma and epithelial lining fluid of hospitalized patients with community acquired pneumonia. Int J Antimicrob Agents 2004 ; 24 : 479–84.

[24] Frei CR, Burgess DS. Pharmacodynamic analysis of ceftriaxone, gatifloxaicne, and levofloxacine against *Streptococcus pneumoniae* with the use of Monte Carlo simulation. Pharmacotherapy 2005 ; 25 : 1161–7.

[25] Conte JE, Golden JA, McIver M. Intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of high dose levofloxacin in healthy volunteers subjects. Int J Antimicrob Agents 2006 ; 28 : 114–21.

[26] Garrison MW. Pharmacodynamic assessment of the activity of high dose (750mg) levofloxacin, ciprofloxacin and gatifloxacin against clinical strains of Pseudomonas aeruginosa. Diagn Microbiol Infect Dis 2006 ; 54 : 51–6.

[27] Knudsen JD, Fursted K, Espersen F, et al. Activities of vancomycin and teicoplanin in vitro and in vivo and correlation to pharmacokinetic parameters in the mouse peritoneal model. Antimicrob Agents Chemother 1997 ; 41 : 1910–5.

[28] Knudsen JD, Fursted K, Raber S, et al. Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* infection. Antimicrob Agents Chemother 2000 ; 44 : 1247–54.

[29] Chambers HF, Kennedy S. Effects of dosage, peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanin in a rabbit model of endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1990 ; 34 : 510–4.

[30] Harding I, McGovan MP, White LO, et al. Teicoplanin therapy of *Staphylococcus aureus* septicemia : relationship between pre-dose serum concentration and outcome. J Antimicrob Chemother 2000 ; 45 : 835–41.

[31] Jehl F. Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides. Antibiotiques 2003 ; 5 : 89–98.

[32] Davis WW, Stout DR. Disc plate method of microbiological antibiotic assay ; II. Novel procedure offering improved accuracy. Appl Microbiol 1971 ; 22 : 666–70.

[33] Edberg SC. The measurement of antibioticsin human body fluids : technics and significance. In : Lorian V, editor. Antibiotic in laboratory medicine. 2nd ed New York : William and Wilkins ; 1986. p. 381–466.

[34] Kitzis MD. Le dosage des antibiotiques. In : Courvalin P, Leclerq R, Bingen E, editors. Antibiogramme. 2e éd. 2006. p. 653–66.

[35] Jehl F, Gallion C, Monteil H. High performance liquid chromatography of antibiotics. J Chromatogr 1990 ; 531 : 509–48.

[36] Levêque D, Gallion-Renault C, Monteil H, Jehl F. Analysis of recent antimicrobial agents in human biological fluids by high performance liquid chromatography. J Chromatogr 1998 ; 815 : 163–72.

[37] Levêque D, Gallion-Renault C, Monteil H, Jehl F. Capillary electrophoresis for pharmacokinetic studies. J Chromatogr 1997 ; 697 : 163–72.

CHAPITRE

# 44 Liste des maladies bactériennes à déclaration obligatoire (MDO)

Botulisme
Brucellose
Charbon
Choléra
Diphtérie
Fièvre typhoïde et fièvres paratyphoïdes
Infection invasive à méningocoque
Légionellose
Listériose
Peste
Tétanos
Toxi-infection alimentaire collective
Tuberculose
Tularémie
Typhus exanthématique

*Arrêté du 22 août 2011. JO 27 août 2011*

**République française**

| **Médecin ou biologiste déclarant (tampon)** | **Si notification par un biologiste** |
|---|---|
| Nom : | **Nom du clinicien :** |
| Hôpital/service : | |
| Adresse : | Hôpital/service : |
| Téléphone : | Adresse : |
| Télécopie : | Téléphone : |
| **Signature :** | Télécopie : |

Maladie à déclaration obligatoire

**Infection invasive à méningocoque**

cerfa N° 12201*03

**Important :** cette maladie justifie une intervention urgente locale, nationale ou internationale. **Vous devez la signaler par tout moyen approprié (téléphone, télécopie…)** au médecin de l'ARS avant même confirmation par le CNR ou envoi de cette fiche.

Initiale du nom : ☐ Prénom : ..... Sexe : ☐ M ☐ F Date de naissance : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

**Code d'anonymat :** ☐☐☐☐ ☐☐☐☐ ☐☐☐☐ ☐☐☐☐ *(A établir par l'ARS)* **Date de la notification :** ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

**Code d'anonymat :** ☐☐☐☐ ☐☐☐☐ ☐☐☐☐ ☐☐☐☐ *(A établir par l'ARS)* **Date de la notification :** ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

Sexe : ☐ M ☐ F Date de naissance : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ ou âge : ☐☐ Code postal du domicile du patient : ☐☐☐☐☐

**Confirmation du diagnostic :**

- Culture positive dans :
  ☐ sang ☐ LCR ☐ lésion cutanée purpurique
  Liquide : ☐ articulaire ☐ pleural ☐ péricardique ☐ péritonéal
- PCR positive dans :
  ☐ sang ☐ LCR ☐ lésion cutanée purpurique
  Liquide : ☐ articulaire ☐ pleural ☐ péricardique ☐ péritonéal
- Présence de diplocoques Gram – au direct :
  ☐ oui ☐ non ☐ non recherché
- LCR évocateur de méningite bactérienne purulente :
  ☐ oui ☐ non ☐ non recherché
- Antigènes solubles :
  ☐ présence ☐ absence ☐ non recherchés
- *Purpura fulminans :* ☐ oui ☐ non Signes de choc : ☐ oui ☐ non Eléments purpuriques cutanés : ☐ oui ☐ non

**Infection invasive à méningocoque**

**Critères de notification**

1. Isolement bactériologique de méningocoques ou PCR positive à partir d'un site normalement stérile (sang, LCR, liquide articulaire, liquide pleural, liquide péritonéal, liquide péricardique) ou à partir d'une lésion cutanée purpurique.
2. Présence de diplocoques Gram négatif à l'examen microscopique du LCR.
3. LCR évocateur de méningite bactérienne purulente (à l'exclusion de l'isolement d'une autre bactérie) ET :
   - soit présence d'éléments purpuriques cutanés quel que soit leur type ;
   - soit présence d'antigènes solubles méningococciques dans le LCR, le sang ou les urines.
4. Présence d'un *purpura fulminans* (*purpura* dont les éléments s'étendent rapidement en taille et en nombre, avec au moins un élément nécrotique ou ecchymotique de plus de trois millimètres de diamètre, associé à un syndrome infectieux sévère, non attribué à une autre étiologie).

**Sérogroupe :** ☐ A ☐ B ☐ C ☐ X ☐ Y ☐ W135 ☐ autre, préciser : ..... ☐ non groupé

**Hospitalisation** (phase aiguë) : Date : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ Hôpital : .....

Le patient avait-il reçu un traitement antibiotique avant les premiers prélèvements biologiques : ☐ oui ☐ non ☐ inconnu

Si oui, s'agit-il d'une injection antibiotique précoce pour suspicion de *purpura fulminans* : ☐ oui ☐ non ☐ inconnu

**Statut vaccinal :** le sujet est-il vacciné par un vaccin antiméningococcique : ☐ oui ☐ non ☐ ne sait pas

Si oui : ☐ conjugué C Date dernière injection : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ Nombre total de doses reçues : ☐☐

☐ conjugué ACYW135 Date dernière injection : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

☐ A+C Date dernière injection : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

☐ ACYW135 Date dernière injection : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐

**Evolution :** ☐ guérison ☐ décès ☐ séquelles, préciser : .....

| **Prophylaxie des sujets contacts** | Nom de l'antibiotique<br>Type de vaccin | Collectivité :<br>nombre de personnes | Entourage proche :<br>nombre de personnes |
|---|---|---|---|
| Chimioprophylaxie | | ☐☐☐ | ☐☐☐ |
| Vaccination | | ☐☐☐ | ☐☐☐ |
| Type de contacts | | ☐ crèche ☐ milieu scolaire<br>☐ autre, préciser : ..... | ☐ famille<br>☐ amis |

**Autres cas dans l'entourage :** ☐ oui ☐ non ☐ inconnu Si oui, pour chaque autre cas, indiquer l'âge, la date d'hospitalisation et le département de résidence

Cas n°1 : âge (en années) : ☐☐ date d'hospitalisation : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ département : ☐☐☐

Cas n°2 : âge (en années) : ☐☐ date d'hospitalisation : ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ département : ☐☐☐

.....

| **Médecin ou biologiste déclarant (tampon) :** | **Si notification par un biologiste** | **ARS (signature et tampon)** |
|---|---|---|
| Nom : | **Nom du clinicien :** | |
| Hôpital/service : | | |
| Adresse : | Hôpital/service : | |
| Téléphone : | Adresse : | |
| Télécopie : | Téléphone : | |
| **Signature :** | Télécopie : | |

*Maladie à déclaration obligatoire (Art L 3113-1, R 3113-1, R 3113-2, R 3113-5, D 3113-7 du Code de la santé publique)*
*Information individuelle des personnes - Droit d'accès et de rectification pendant 6 mois par le médecin déclarant (loi du 6 janvier 1978) - Centralisation des informations à l'Institut de veille sanitaire*

**Fig. 44.1.** – *Modèle de fiche de déclaration obligatoire faite par le biologiste ou le clinicien : exemple de la fiche « Infection invasive à méningocoque ».*

CHAPITRE

# 45 Centres nationaux de référence (CNR 2006–2011)

La liste des centres à partir de 2012 est en cours de révision et n'est pas encore publiée. Elle sera mise à jour dans le prochain tirage de l'ouvrage.

| *Centres nationaux de référence* | *Adresses* | *Contacts* |
|---|---|---|
| CNR Bactéries anaérobies et botulisme | Institut Pasteur<br>Unité Bactéries anaérobies et toxines<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr Michel R. Popoff<br>Dr Philippe Bouvet<br>Mme Christelle Mazuet<br>Tél. : 01 45 68 83 10<br>Fax : 01 40 61 35 01<br>mpopoff@pasteur.fr<br>pbouvet@pasteur.fr |
| CNR Bactéries anaérobies et botulisme (*Clostridium difficile*) – Laboratoire associé | Hôpital Saint-Antoine<br>Service bactériologie-virologie<br>184, rue du Faubourg Saint-Antoine<br>75012 Paris | Dr Frédéric Barbut<br>Dr Catherine Eckert<br>Tél. : 01 49 28 20 00<br>Fax : 01 49 28 20 84<br>frederic.barbut@sat.aphp.fr<br>catherine.eckert@sat.aphp.fr |
| CNR *Borrelia* | Institut Pasteur<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Mme Elisabeth Ferquel<br>Dr Valérie Choumet<br>Tél. : 01 45 68 83 67 ou 01 45 68 83 37<br>Fax : 01 40 61 30 01<br>elisabeth.ferquel@pasteur.fr |
| CNR *Borrelia,* Laboratoire associé | Faculté de Médecine<br>Institut de bactériologie<br>3, rue Koeberlé<br>67000 Strasbourg | Pr Benoît Jaulhac<br>Tél. : 03 68 85 37 80 ou 03 68 85 37 90<br>Fax : 03 68 85 38 08<br>benoit.jaulhac@medecine.u-strasbg.fr |
| CNR *Brucella* | AFSSA, unité zoonoses bactériennes<br>23, avenue du Général-de-Gaulle<br>BP 67<br>94706 Maisons-Alfort cedex | Dr Bruno Garin-Bastuji<br>Tél. : 01 49 77 13 23<br>Fax : 01 49 77 13 44<br>b.garin-bastuji@afssa.fr |
| CNR *Brucella*, Laboratoire associé | CHU de Grenoble<br>Laboratoire de bactériologie<br>BP 217<br>38043 Grenoble cedex 09 | Pr Max Maurin<br>Tél. : 04 76 76 54 79<br>Fax : 04 76 76 59 12<br>mmaurin@chu-grenoble.fr |
| CNR *Campylobacter* et *Helicobacter* | Université Victor Segalen Bordeaux-2,<br>EA 516 Bactériologie et épidémiologie,<br>des infections digestives<br>146, rue Léo-Saignat<br>BP 76<br>33076 Bordeaux cedex | Pr Francis Megraud<br>Tél. : 05 56 79 59 10<br>Fax : 05 56 79 60 18<br>francis.megraud@chu-bordeaux.fr |
| CNR Charbon | Institut Pasteur<br>Unité des toxines et pathogénie bactérienne<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | M. Pierre Goossens<br>M. Christophe Brezillon<br>Tél. : 01 45 68 83 12 ou 01 40 61 30 35<br>Fax : 01 45 68 89 54<br>cnr.charbon@pasteur.fr |
| CNR Charbon, Laboratoire associé | AFSSA, Unité Zoonoses bactériennes<br>23, avenue du Général-de-Gaulle<br>BP 67<br>94706 Maisons-Alfort cedex | Dr Bruno Garin-Bastuji<br>Dr Nora Madani<br>Tél. : 01 49 77 13 23<br>Fax : 01 49 77 13 44<br>j.vaissaire@afssa.fr |

| *Centres nationaux de référence* | *Adresses* | *Contacts* |
|---|---|---|
| CNR *Chlamydiae* | Faculté de médecine Hyacinthe-Vincent<br>Laboratoire de bactériologie<br>146, rue Léo-Saignat<br>33076 Bordeaux cedex | Dr Bertille de Barbeyrac<br>Tél. : 05 56 79 56 67<br>Fax : 05 56 79 56 11<br>bertille.de.barbeyrac@u-bordeaux2.fr |
| CNR Coqueluche et autres bordetelloses | Institut Pasteur, Unité prévention et thérapie moléculaires des maladies humaines<br>25–28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr Nicole Guiso-Maclouf<br>Mme Sophie Guillot<br>Tél. : 01 45 68 80 05 ou 01 45 68 83 34<br>Fax : 01 40 61 35 33<br>cnr-bordetella-coqueluche@pasteur.fr |
| CNR Corynébactéries toxinogènes | Institut Pasteur, Unité prévention et thérapie moléculaires des maladies humaines<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr Nicole Guiso-Maclouf<br>M. Edgar Badell-Ocando<br>Tél. : 01 45 68 80 05 ou 01 45 68 83 36<br>Fax : 01 45 68 88 37<br>coryne@pasteur.fr |
| CNR *Escherichia coli* et shigelles | Institut Pasteur, Laboratoire des bactéries pathogènes entériques<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr François-Xavier Weill<br>Dr Ingrid Filliol<br>Tél. : 01 45 68 83 45 ou 01 45 68 87 39<br>Fax : 01 45 68 88 37<br>colishig@pasteur.fr |
| CNR *Escherichia coli* et shigelles, Laboratoire associé | Hôpital Robert-Debré, service de microbiologie<br>48, boulevard Serrurier<br>75019 Paris | Pr Edouard Bingen<br>Tél. : 01 40 03 23 40<br>Fax : 01 40 03 24 50<br>edouard.bingen@rdb.aphp.fr |
| CNR *Francisella tularensis* | CHU de Grenoble, Laboratoire de bactériologie et virologie<br>BP 217<br>38043 Grenoble cedex 09 | Pr Max Maurin<br>Tél. : 04 76 76 54 79<br>Fax : 04 76 76 59 12<br>mmaurin@chu-grenoble.fr |
| CNR Gonocoques | Institut Alfred-Fournier<br>25, boulevard Saint-Jacques<br>75014 Paris | Dr Patrice Sednaoui<br>Tél. : 01 40 78 26 70<br>Fax : 01 40 78 26 27<br>patrice.sednaoui@institutfournier.org |
| CNR *Haemophilus influenzae* | Centre hospitalier de Lille<br>Laboratoire de bactériologie hygiène hospitalière<br>Centre de biologie et pathologie<br>59037 Lille | Dr Olivier Gaillot<br>Tél. : 03 20 44 49 46<br>Fax : 03 20 44 48 95<br>o-gaillot@chru-lille.fr |
| CNR *Legionella* | Groupement hospitalier Est, Université Claude Bernard, Centre de biologie et pathologie, Institut de microbiologie<br>59, boulevard Pinel<br>69677 Bron cedex | Pr Jérôme Étienne<br>Dr Sophie Jarraud<br>Tél. : 04 72 12 96 25<br>Fax : 04 72 35 73 35<br>jerome.etienne@chu-lyon.fr |
| CNR Leptospirose | Institut Pasteur, Unité postulante de biologie des spirochètes<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr Mathieu Picardeau<br>Mme Pascale Bourhy<br>Tél. : 01 45 68 83 37 ou 01 45 68 83 68<br>Fax : 01 40 61 30 01<br>spiroc@pasteur.fr |
| CNR *Listeria* | Institut Pasteur, Groupe microorganismes et barrières de l'hôte<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Pr Marc Lecuit<br>M. Alexandre Leclerc<br>Tél. : 01 40 61 31 90 ou 01 40 61 31 12<br>Fax : 01 40 61 35 67<br>listeria@pasteur.fr |
| CNR Méningocoques | Institut Pasteur, Unité postulante infections bactériennes invasives<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr Muhamed-Kheir Taha<br>M. Ala-Eddine Deghmane<br>Tél. : 01 40 61 31 08 ou 01 45 68 83 30<br>Fax : 01 40 61 30 34<br>meningo@pasteur.fr |

| *Centres nationaux de référence* | *Adresses* | *Contacts* |
|---|---|---|
| CNR Mycobactéries et résistance des mycobactéries aux antituberculeux | CHU Pitié-Salpétrière<br>Laboratoire de bactériologie, hygiène<br>47–83, boulevard de l'Hôpital<br>75013 Paris | Pr Vincent Jarlier<br>Dr Nicolas Veziris<br>Tél. : 01 40 77 97 46<br>Fax : 01 45 82 75 77<br>cnr.myctb@psl.aphp.fr |
| CNR Mycobactéries et résistance des mycobactéries aux antituberculeux, Laboratoire associé | Hôpital Saint-Louis<br>Service de microbiologie,<br>Nouveau Saint-Louis Secteur Vert – Porte 1<br>1, avenue Claude-Vellefaux<br>75475 Paris cedex 10 | Pr Emmanuelle Cambau<br>Tél. : 01 42 49 94 93<br>Fax : 01 42 49 92 00<br>emmanuelle.cambau@sls.aphp.fr |
| CNR Peste et autres yersinioses | Institut Pasteur<br>Unité des Yersinia<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr Élisabeth Carniel<br>Dr Françoise Guinet<br>Tél. : 01 45 68 83 26 ou 01 45 68 83 27<br>Fax : 01 40 61 30 01<br>cnr.yersinia@pasteur.fr |
| CNR Pneumocoques | Hôpital Européen Georges Pompidou,<br>Laboratoire de microbiologie<br>20, rue Leblanc<br>75908 Paris cedex 15 | Pr Laurent Gutmann<br>Dr Emmanuelle Varon<br>Tél. : 01 56 09 39 67<br>Fax : 01 56 09 24 46<br>laurent.gutmann@hop.egp.aphp.fr<br>emmanuelle.varon@egp.aphp.fr |
| CNR Résistance aux antibiotiques | Institut Pasteur<br>Unité des agents antibactériens<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Pr Patrice Courvalin<br>Dr Katy Jeannot<br>Tél. : 01 45 68 83 20<br>Fax : 01 45 68 83 19<br>pcourval@pasteur.fr |
| CNR Résistance aux antibiotiques, Laboratoire associé | CHU de Caen<br>Service de microbiologie,<br>Hôpital de la Côte de Nacre<br>Avenue Côte-de-Nacre<br>14033 Caen cedex | Pr Roland Leclercq<br>Dr Marguerite Fines<br>Tél. : 02 31 06 45 72<br>Fax : 02 31 06 45 73<br>leclercq-r@chu-caen.fr |
| CNR Résistance aux antibiotiques, Laboratoire associé | Université Paris VII<br>Laboratoire de bactériologie,<br>Faculté de Médecine Xavier-Bichat<br>46, rue Henri-Huchard<br>75877 Paris cedex 18 | Pr Antoine Andremont<br>Dr Raymond Ruimy<br>Tél. : 01 40 25 85 00<br>Fax : 01 40 25 85 81<br>antoine.andremont@bch.aphp.fr |
| CNR Résistance aux antibiotiques, Laboratoire associé | Hôpital Jean Minjoz<br>Laboratoire de bactériologie, EA 3186<br>Boulevard Fleming<br>25030 Besançon cedex | Pr Patrick Plesiat<br>Dr Daniel Talon<br>Tél. : 03 81 66 82 86<br>Fax : 03 81 66 89 14<br>patrick.plesiat@univ.fcomte.fr |
| CNR Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* | Faculté de Médecine, Unité des rickettsies<br>27, boulevard Jean-Moulin<br>13385 Marseille cedex 5 | Pr Didier Raoult<br>Tél. : 04 91 32 44 11<br>Fax : 04 91 38 77 72<br>Didier.Raoult@medecine.univ-mrs.fr |
| CNR Salmonelles | Institut Pasteur<br>Laboratoire des bactéries pathogènes entériques<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr François-Xavier Weill<br>Dr Simon Le hello<br>Tél. : 01 45 68 83 45 ou 01 40 61 37 24<br>Fax : 01 45 68 88 37<br>salmonella@pasteur.fr |
| CNR Staphylocoques | Groupement hospitalier Est, Université Claude Bernard, Lyon 1, Centre de microbiologie et pathologie, Institut de microbiologie<br>59, boulevard Pinel<br>69677 Bron cedex | Pr François Vandenesch<br>Tél. : 04 72 12 96 25<br>Fax : 04 72 35 73 35<br>francois.vandenesch@chu-lyon.fr |

| *Centres nationaux de référence* | *Adresses* | *Contacts* |
|---|---|---|
| CNR Streptocoques | Groupe hospitalier Cochin, Saint-Vincent-de-Paul, service de bactériologie<br>27, rue du Fauboug Saint-Jacques<br>75014 Paris | Pr Claire Poyart<br>Tél. : 01 58 41 15 44<br>Fax : 01 58 41 15 48<br>claire.poyart@cch.ap-hop-paris.fr |
| CNR Streptocoques, Laboratoire associé | Hôpital de l'Hôtel Dieu, Université Paris VI, service de microbiologie<br>1, place Parvis-Notre-Dame<br>75181 Paris cedex 04 | Pr Anne Bouvet<br>Tél. : 01 42 34 82 73<br>Fax : 01 42 34 87 19<br>anne.bouvet@htd.ap-hop-paris.fr |
| CNR Streptocoques, Laboratoire associé | Hôpital Robert-Debré, service de microbiologie<br>48, boulevard Serrurier<br>75019 Paris | Pr Edouard Bingen<br>Tél. : 01 40 03 23 40<br>Fax : 01 40 03 24 50<br>edouard.bingen@rdb.ap-hop-paris.fr |
| CNR Streptocoques, Laboratoire associé | Institut Pasteur<br>Unité biologie des bactéries pathogènes à Gram positif<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr Patrick Trieu Cuot<br>Tél. : 01 45 68 88 10<br>Fax : 01 45 68 89 38<br>ptrieu@pasteur.fr |
| CNR Syphilis | Conseil Général 93, Laboratoire départemental de Seine-Saint-Denis<br>41, avenue de Verdun<br>93140 Bondy | Dr Anne Bianchi<br>Tél. : 01 48 48 44 74 ou 01 48 48 16 34<br>abianchi@cg93.fr |
| CNR Syphilis, Laboratoire associé | Hôpital Cochin<br>Laboratoire fédéré, Unité de recherche, service de dermatologie<br>Pavillon Gustave Roussy<br>8, rue Méchain<br>75014 Paris | Dr Philippe Grange<br>Pr Nicolas Dupin<br>Tél. : 01 44 41 25 60 ou 01 58 41 18 19<br>Fax : 01 58 41 18 49<br>philippe.grange@cch.aphp.fr<br>nicolas.dupin@cch.aphp.fr |
| CNR Vibrions et choléra | Institut Pasteur<br>Laboratoire des bactéries pathogènes entériques<br>25-28, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris cedex 15 | Dr Marie-Laure Quilici<br>Mme Malika Gouali<br>Tél. : 01 40 61 33 85 ou 01 45 68 82 21<br>Fax : 01 45 68 82 23<br>vibrions@pasteur.fr |

CHAPITRE

# 46 Liste et adresses des principales sociétés

| *Fournisseur* | *Adresse* | *Téléphone* | *N° de fax* | *Site Internet* | *Adresse e-mail* |
|---|---|---|---|---|---|
| ABBOTT Division Diagnostic | 12, rue de la Couture, BP 50203, 94518 Rungis cedex | 01 45 60 25 00 | 01 45 60 04 98 | | sylvie.gouevic@abbott.com |
| ABD Serotec France | 15, rue des Pas-Perdus, BP 38338, Les Bureaux de l'Horloge, 95804 Cergy | 01 34 25 83 34 | 01 34 25 44 00 | www.serotec.com.fr | info@fr.serotec.com |
| ADGENIX | 30, avenue Robert-Surcouf, BP 67, 78960 Voisins-le-Bretonneux | 01 39 44 15 30 | 01 39 44 15 40 | www.adgenix.com | adgenix@adgenix.fr |
| AES CHEMUNEX | Rue Maryse-Bastié, Ker-Lann, 35219 Bruz | 02 23 50 12 12 | 02 23 50 12 00 | www.aeslaboratoire.com | samuel.tesson@aeslabora-toire.com |
| ALL.DIAG | 10, rue Etorré-Bugatti, BP 6, 67038 Strasbourg cedex 3 | 03 88 78 80 88 | 03 88 78 76 78 | www.alldiag.com | info@alldiag.com |
| ANDA BIOLOGICALS | 37, rue de la Course, BP 30076, 67067 Strasbourg cedex | 03 88 32 81 22 | 03 88 32 19 80 | www.andabiologicals.com | andabio@wanadoo.fr |
| APPLIED BIOSYSTEMS | 25, rue de la Baltique, BP 96, 91943 Courtabeuf cedex | 01 69 59 85 85 | 01 69 59 85 00 | www.europe.applied-biosystems.com | abdirect@eur.appliedbio-systems.com |
| Autostainer Dagatronics Corporation [Korea] | 263–1 Ducki-dong, Ilsan-gu Goyang-si Gyeonggi-do 411–808 Korea | | | www.Dagatron.en.ec21.com | |
| BD Diagnostics Diagnostic Systems | 11, rue Aristide-Bergès, BP 4, 38800 Le-Pont-de-Claix | 04 76 68 36 36 | 04 76 68 35 04 | www.bd.com/France | bdfra_Diagnostic_Systems@eur ope.bd.com |
| BIO ADVANCE | Espace Villaparc – l'Érable, 1, avenue Marne et Gondoire, 77600 Bussy Saint-Martin | 01 64 61 66 66 | 01 64 61 62 20 | www.bio-advance.fr | bio-advance@wanadoo.fr |
| bioMérieux SA | Chemin de l'Orme, 69280 Marcy l'Étoile | 04 78 87 20 00 | 04 78 87 20 90 | www.biomerieux.com | GCF@eu.biomerieux.com |
| Bio Rad | 3, boulevard Raymond-Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette | 01 47 95 61 48 | 01 47 95 62 87 | www.biorad.fr | guillaume.camard@bio-rad.com |
| BMD | Actipole 25, 4–6, boulevard de Beaubourg-Croissy Beaubourg, 77435 Marne-la-Vallée cedex 2 | 01 64 62 10 12 | 01 64 62 09 66 | www.bmdnet.com | bmd@bmdnet.com |
| Carlo Erba Réactifs | Chaussée du Vexin, Parc d'Affaires des Portes, BP 616, 27106 Val-de-Reuil cedex | 02 32 09 20 00 | 02 32 09 20 20 | www.cersds.com | carloerba@carloerbareactifs.com |
| Consortium de Matériel pour Laboratoires (CML) | 1, rue des Palis, BP 30, 77792 Nemours cedex | 01 64 45 42 42 | 01 64 78 14 69 | www.cml.fr | serviceclient@cml.fr |
| Coopération Pharmaceutique Française | Place Lucien-Auvert, 77020 Melun | 01 64 87 20 00 | 01 64 87 20 70 | www.cooper.fr | |
| COPAN DIAGNOSTICS INC. | USA, Canada, Latin America, 26055 Jefferson Avenue Murrieta, CA 92562 États-Unis | (951) 696–6957 | (951) 600–1832 | | info@copanusa.com |

| *Fournisseur* | *Adresse* | *Téléphone* | *N° de fax* | *Site Internet* | *Adresse e-mail* |
|---|---|---|---|---|---|
| Dade Behring | 19–29, rue du Capitaine-Guynemer, Immeuble Berkeley, 92903 Paris-la-Défense | 01 42 91 21 00 | 01 42 91 22 00 | www.dadebehring.com | marketingfrance@dadebeh-ring.com |
| Diasorin | 11, rue Georges-Besse, 92160 Antony | 01 55 59 04 00 | 01 55 59 04 40 | www.diasorin.com | christian.barraud@diasorin.it |
| Dipsi Industrie | 70–86, avenue de la République, Vecteur Sud, 92325 Châtillon cedex | 01 49 65 67 20 | 01 49 65 67 29 | www.dipsi.com | bizemont@dipsi.com |
| Elitech France Sas | 305, allées de Craponne, 13300 Salon-de-Provence | 04 90 17 54 50 | 04 90 17 54 51 | www.biotech international.com | a.degaillande@ldhgroup.com |
| Elvetec service | 6, rue Henri-Becquerel, ZI MI Plaine, BP 224, 69744 Genas | 04 72 22 43 00 | 04 72 22 43 70 | www.espacelabo.com | elvetec@elvetec.fr |
| Eurobio | 7, avenue de la Scandinavie, 91953 Les Ulis cedex B | 01 69 07 94 77 | 01 69 07 95 34 | www.eurobio.fr | adv@eurobio.fr |
| Fumouze Diagnostics - Sofibel | 110–114, rue Victor-Hugo, 92686 Levallois-Perret cedex | 01 49 68 43 25 | 01 49 68 43 22 | www.fumouze.fr | fumouze@sofibel.fr |
| GE Health Care Europe GmbH (anciennement Amersham Biosciences) | Rue René-Razel, Parc Technologique de Saclay, 91898 Orsay cedex | 01 69 35 67 00 | 01 69 41 96 77 | www.gehealthcare.com/lifesciences | isabelle.henry@ge.com |
| Greiner Bio One | 3–7, avenue du Cap Horn, Les Ulis, 91941 Courtabœuf | 01 69 86 25 25 | 01 69 86 25 32 | www.gbo.com | accueil@gbo.com |
| Groupe Servibio | 103, rue Henri-Barbusse, 92190 Meudon | 01 46 26 42 81 | 01 45 34 25 20 | www.servibio.com | servibio@wanadoo.fr |
| Ingen | Sogaris 203, Bât. G1, 94654 Rungis cedex | 01 46 87 11 42 | 01 46 87 12 31 | www.ingen.fr | ingen@ingen.fr |
| International Microbio | Parc d'activités, Allée d'Athènes, 83870 Signes | 04 94 88 55 00 | 04 94 88 55 05 | www.intmicrobio.com | im@intmicrobio.com |
| Interscience | 30, chemin du Bois des Arpents, 78860 Saint-Nom-La-Bretèche | 01 34 62 62 61 | 01 34 62 43 03 | www.interscience.fr | info@interscience.fr |
| Inverness Medical France | 19, rue Lambrechts, 92400 Courbevoie | 01 41 99 92 92 | 01 41 99 92 95 | | info@inverness fr.com |
| Iris Diagnostics France | 38, avenue Division Leclerc, 95170 Deuil-La-Barre | 01 39 64 13 25 | | www.irisdiagnostics.com | |
| IUL, S.A. | Torrent de l'Estadella, 22 08030 Barcelona, Espagne | +34 93 274 0232 | +34 93 274 0144 | | |
| KIESTRA Lab Automation BV | Marconilaan 6, 9207 JC Drachten Pays-Bas | +31(0) 512–510710 | +31(0) 512–524585 | www.kiestra.nl | |
| Labo Moderne | 37, rue Dombasle, 75015 Paris | 01 45 32 62 54 | 01 45 32 01 09 | www.labomoderne.com | info@labomoderne.com |
| Labobasi | 2121, chemin Saint-Bernard, Parc Scientifique, technologique de Sophia Antipolis, 06220 Vallauris | 04 93 00 66 30 | 04 93 00 66 39 | www.labobasi.com | alain.labobasi@wanadoo.fr |
| LGC Promochem | 6, rue Alfred-Kastler, BP 83076, 67123 Molsheim cedex | 03 88 04 82 82 | 03 88 04 82 90 | www.lgcpromochem.com | christine.nguyen@lgcpromo-chem.com |
| Lustiner France | 4, square Denis Papin, BP 4, 78331 Fontenay le Fleury cedex | 01 34 62 00 63 | 01 34 62 00 67 | www.lustiner.com | lustiner.france@wanadoo.fr |
| Oxoid & Remel | 6, route de Paisy, BP 13, 69571 Dardilly cedex | 04 72 52 33 70 | 04 78 66 03 76 | www.oxoïd.com www.thermofischer.com | oxoid.fr@thermofischer.com |
| Promega France | 24, chemin des Verrières, Parc des Verrières, 69260 Charbonnières-les-Bains | 04 37 22 50 00 | 04 37 22 50 15 | www.promega.com | fr_custserv@fr.promega.com |
| Pyrosequencing/ Biotage SARL | 19, avenue d'Italie, 75013 Paris | 01 43 31 35 49 | 01 43 31 35 21 | www.biotagebio.com | stanislas.marin@eu.bio-tage.com |
| Réactifs RAL | Site Montesquieu, Bordeaux Technopolis, 33651 Martillac cedex | 05 57 96 04 04 | 05 57 96 04 05 | www.reactifs ral.fr | commercial@reactifs ral.fr |

| Fournisseur | Adresse | Téléphone | N° de fax | Site Internet | Adresse e-mail |
|---|---|---|---|---|---|
| Sartorius | 4, rue Émile-Baudot, 91127 Palaiseau cedex | 01 69 19 21 00 | 01 69 20 09 22 | www.sartorius france.fr | service.client@ sartorius.com |
| Siemens Healthcare Diagnostics | 9, boulevard Finot, Immeuble Grand Angle, 93200 Saint-Denis cedex 2 | 01 49 22 31 00 | 01 69 79 05 35 | www.siemens.com/ diagnostics | marie.treboute@ siemens.fr |
| Sobioda | 97, rue Lavoisier, 38330 Montbonnot-Saint-Martin | 04 76 61 02 02 | 04 76 61 91 81 | www.sobioda.com | info@sobioda.com |
| Tebu Bio SAS | 39, rue de Houdan, BP 15, 78612 Le-Perray-en-Yvelines cedex | 01 30 46 39 00 | 01 30 46 39 11 | www.tebu bio.com | france@tebu bio.com |
| Tecan France SAS | 26, avenue Tony-Garnier, 69007 Lyon | 04 72 76 04 80 | 04 72 76 04 99 | www.tecan.com | tecan.France@ tecan.com |
| The Binding Site | 14, rue des Glairaux, BP 226, 38522 Saint-Égrève | 04 38 02 19 19 | 04 38 02 19 20 | www.bindingsite.fr | info.bindingsite.fr |
| TREK Diagnostic Systems Magellan biosciences | 982 Keynote Circle, Suite 6, Cleveland, OH 44131, États-Unis | 800.871.8909 | 216.351.5456 | www.magellanbio.com | |

Des références d'autres fournisseurs peuvent être trouvées dans :

- l'*Annuaire des laboratoires de biologie médicale* (www.direct-biologie.com), 41e éd. Paris : Elsevier Masson ; 2011 ;
- le *Guide de la biologie médicale*, Spectra Biologie, Presse Communication International ; 2010.

CHAPITRE

# 47 Ouvrages et documents de référence

## OUVRAGES


Avril JL. Dictionnaire pratique de bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 1982.

Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 2000.

APPIT. In : Pilly E, editor. Montmorency. 2ME ed. 2006.

Barrow GI, Feltham RKA. Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria. 3rd ed. Cambridge : Cambridge University Press; 2003.

Bébéar C. Mycoplasmes et Chlamydiae. Paris : Elsevier; 2002.

Berche P, Gaillard JL, Simonet M. Bactériologie. Les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion, Médecine-Sciences; 1988.

Bingen E. Méningites bactériennes communautaires. Paris : Elsevier; 2001.

Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2e ed. New York : Springer Science; 2005.

Brisou J. Enzymologie bactérienne. Paris : Masson; 1971.

Buttiaux R, Beerens H, Tacquet A. Manuel des techniques bactériologiques. 4e éd Paris : Ed. Médicales Flammarion; 1974.

Carbonnelle B, Denis F, Marmonier A, Pinon G, Vargues R. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Paris : SIMEP; 1987.

Cimolai N. Laboratory diagnosis of bacterial infections. New York–Basel : Marcel Dekker Inc; 2001.

Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Antibiogramme. 2e ed. Paris : ESKA; 2006.

Courvalin P, Leclercq R, Rice LB. Antibiogram. Paris : ESKA; 2010.

Cumitech. Séries de monographies (44 à ce jour) pour les techniques de laboratoire. Washington DC : ASM Press; .

Dabernat H, Petitjean O, Schlemmer B, Stahl JP, Weinbreck P. Infectiologie de A à Z. Paris : Arnette; 1997.

Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Paris : Lavoisier; 2007.

Delost MD. Introduction to diagnostic microbiology. A text and workbook. St Louis : Mosby Year Book; 1997.

Denis F. Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. Paris : John Libbey Eurotext; 2004.

Denis F, Perronne C. Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques. Paris : Elsevier; 2004.

Direction Générale de la Santé – Comité technique des vaccinations. Guide des vaccinations. 2e éd Saint-Denis : INPES; 2006.

Dolivo M, Henry-Suchet J, Orfila J, Eb F. Maladies transmissibles par voies sexuelles. 2e éd Paris : Masson; 1997.

Eyquem A, Alouf J, Montagnier L. Traité de microbiologie clinique. Padoue : Piccin; 1998.

Fabry J. Maîtrise des infections nosocomiales de A à Z. Health & Co–Editions Rillieux-Crépieux; 2004.

Fischetti VA, Novick RP, Ferreti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Gram-positive pathogens. 2nd ed. Washington : ASM Press; 2006.

Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Précis de bactériologie clinique. 2e éd Paris : ESKA; 2007.

Gaudelus J. Vaccinologie. Paris : Doin; 2008.

Grancher T, Jeanne G. Biologie des liquides d'épanchement. Lyon : bioMérieux; 2006.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore : Williams & Wilkins Co; 1994.

Isenberg HD. Essential procedures for clinical microbiology. Washington : ASM Press; 1998.

Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gerard A. De l'antibiogramme à la prescription. 2e éd Lyon : bioMérieux; 2003.

Le Minor L, Veron M. Bactériologie médicale. 2e éd Paris : Flammarion Médecine-Sciences; 1990.

Lontie M, Vandepitte J. Atlas de microbiologie médicale. Paris : Maloine; 1977.

Murray PR, Baron EJO, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington : ASM Press; 2007.

Plotkin SA, Orenstein WA, Offit P. Vaccines. 5th ed. Saunders; 2008.

Raoult D. Dictionnaire de maladies infectieuses. Paris : Elsevier; 1998.

Remic (Référentiel en microbiologie médicale). 4e éd Société Française de Microbiologie; 2010.

Riegel P, Archambaud M, Clave D, Vergnaud M. Bactéries de culture et d'identification difficile. Lyon : bioMérieux; 2006.

Struthers JK, Westran RP. Clinical bacteriology. Washington : ASM Press; 2003.

Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. 2 volumes. Washington : ASM Press; 2011. 2314 pages.

DOCUMENTS

Anonyme. Alerte, investigation et surveillance des infections nosocomiales ; le réseau Raisin 2001-2010. N° Spécial. BEH 26 avril 2011 ; 15-16-17: 177–204.

L'annuaire des laboratoires de biologie médicale. 41e ed. Paris : Elsevier-Masson ; 2011.

Denis F, Mounier M. Les infections nosocomiales. Rev Prat 2009 ; 59 : 1459–65.

Guide de la biologie médicale. Spectra Biologie 2010 ; .

Mounier M, Pestourie N, Ploy MC, Denis F. Les détergents et les désinfectants ; rôle en médecine (1re partie). Antibiotiques 2009 ; 11 : 177–84.

Mounier M, Pestourie N, Ploy MC, Denis F. Les détergents et les désinfectants ; rôle en médecine (2e partie). Antibiotiques 2009 ; 11 : 234–42.

ONERBA (Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques). Rapport d'activité 2008. Décembre 2010.

Philippon A. Des agents très spéciaux en bactériologie. Cahier de Formation. Biologie Médicale BIOFORMA 2007 ; 40.

# Index


**A**

Abcès cérébraux, 203
*Abiotrophia*, 314
Accréditation, 157
*Achromobacter*, 378, 380
Acides nucléiques, 44
*Acidovorax*, 375, 377
*Acinetobacter*, 382
*Actinobaculum*, 572
*Actinomyces*, 203, 207, 443, 444, 572
Adénopathies, 202
ADH, 24
ADN
– amplification, 45
– extraction, 44
*Aeromonadaceae*, 361
*Aeromonas*, 366
*Afipia*, 411
Agglutination, 36
*Aggregatibacter*, 407
*Agrobacterium*, 378, 380
*Alcaligenes*, 378, 380
Aminosides, 595
Anaérobies, 183, 203, 207, 209, 565
– bacilles à Gram
– – négatif, 573, 578
– – positif non sporulés, 569
– – positif sporulés, 569
– cocci, 578
– milieux d'isolement non sélectifs, 567
– milieux gélosé
– – en tube, 568
– – sélectif, 567
– milieux liquides, 567
*Anaerococcus*, 578
Angine
– de Vincent, 215
Antibiogramme
– associations d'antibiotiques, 591
– catégorisation clinique, 588
– causes d'erreur, 590
– diffusion en milieu gélosé, 587
– lecture interprétative, 590
– techniques
– – automatisées, 590
– – génotypiques, 591
Antibiotique, instauration et surveillance d'un traitement, 585
Antibiotiques
– dosage des
– – chromatographiques, 605
– – immunologiques, 603
– – microbiologiques, 603
– suivi thérapeutique des
– – PK/PD, 595
Antigènes, 317
– extractibles, 35
– solubles, 35, 163, 327
– urinaires, 423
*Arcanobacterium*, 444, 572
– *haemolyticum*, 446
*Arcobacter*, 429, 430
Arthrites septiques, 209
Arthrobacter, 444, 446
Ascite, 210
ASIC, 603
Aspiration endotrachéale, 190, 192
Assistance médicale à la procréation, 265
Association fusospirillaire, 217
Assurance qualité, 110
*Atopobium vaginae*, 572
Automates, 27
– d'hémocultures, 68
– d'identification et d'antibiogramme, 67
– de coloration, 65
– de cytologie urinaire et de détection de la bactériurie, 67
– de détection des mycobactéries, 70
Automatisation, 65

**B**

ß-hémolyse, 441
ß-lactamines, 597
BAAR, 507
Bacille(s)
– à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies, 331
– à Gram négatif non fermentaires, 368
– à Gram positif, 443
– de la lèpre (de Hansen), 534
*Bacillus*, 443, 473
*Anthracis*, 470, 472, 474
– *cereus*, 471, 474
Bacitracine, 306
Bactéricidie, 585, 587
Bactéries
– à potentiel épidémique, 118, 122, 126
– à potentiel infectieux, 118
– multirésistantes, 117–119
– spiralées, 475
Bactériostase, 585, 586
Bactériurie, 184, 185
*Bacteroides*, 573
*Balneatrix*, 378
Bandelettes réactives, 181
*Bartonella*, 200, 202
– détection moléculaire, 57
– *henselae*, 411
BCYE, 423
*Bergyella*, 378
*Bifidobacterium*, 572
Bile, 313

Bile-esculine, 306
Bordetella
– détection moléculaire, 55
– *pertussis*, 220
– bronchiseptica, 386
*Borrelia*, 476
– *afzelii*, 478
– *burdorferi*, 477, 478
– *burgdorferi*, 203, 209
– *garinii*, 478
– *recurrentis*, 478
Borréliose de Lyme, 477, 478
Bouillon
– NaCl à 6,5 %, 306
– nitrate, 358
*Branhamella*, 321
– *catarrhalis*, 321
*Brevibacterium*, 444, 446
*Brevundimonas*, 375, 377
Brossage distal bronchique protégé, 191, 192
*Brucella*, 411, 413
Brûlures, 201
*Burkholderia*, 376
– *cepacia*, 375

C
Cadavre, diagnostic microbiologique sur, 131
CAMP-test, 307, 460
*Campylobacter*, 169, 210
– *coli*, 429
– *concisus*, 431
– *curvus*, 431
– *fetus*, 429, 431
– *gracilis*, 431
– *jejuni*, 429, 430
– *lari*, 430
– *rectus*, 431
– *showae*, 431
– *upsaliensis*, 430
*Capnocytophaga*, 200, 410
Capsule, 8
*Cardiobacterium*
– *hominis*, 407
– *valvarum*, 407
Catalase, 21
Cathéter, 205
– distal protégé, 191, 192
– technique
– – de Cléri, 207
– – quantitative de Brun-Buisson, 207
– – semi-quantitative de Maki, 206
*Cedecea*, 353
Cellulite, 202
Cétrimide, 15
Chambre implantable, 205
Charbon, 470
*Chlamydia*, 207
– *pneumoniae*, 545, 546, 549, 551, 553
– *psittaci*, 545, 546, 549, 552
– *trachomatis*, 37, 56, 210, 223, 225, 253, 545–547, 551, 552
– – détection moléculaire, 56
*Chlamydophila pneumoniae,* détection moléculaire, 56
*Chryseobacterium*, 378
Citrate, 26
*Citrobacter*, 348
*Clostridium*, 58, 201, 565
– *difficile*, 38, 122, 172, 568, 573
– – détection moléculaire, 58
– *perfringens*, 201, 569
CMI, 586
CNR, 616
Coagulase, 26, 290
Cofrac, 113
*Collinsella*, 572
Coloration, 475
– acridine orange, 144
– argentique, 476
– auramine, 517
– bleu de méthylène, 9
– Fontana-Tribondeau, 494
– Gimenez, 554, 559
– Gram, 10
– granulations métachromatiques, 452
– Macchiavello, 555
– May-Grünwald-Giemsa, 7
– Moeller, 12
– PAS, 468
– Stamp, 555
– Warthin-Starry, 475
– Ziehl-Neelsen, 11, 516
*Comamonas*, 375, 377
Compte d'Addis, 180
Confinement, 96
Conjonctivite, 224
Contre-immunoélectrophorèse (CIE), 35
Contrôle(s)
– internes de qualité (CIQ), 114
– microbiologique des tissus et des cellules à usage thérapeutique, 275
*Coprobacillus*, 572
*Corobacterium*, 572
Corynébactéries, 205
*Corynebacterium*, 443
– *diphtheriae*, 444, 446, 451
– *jeikeium*, 446, 447
– *seminale*, 446
– *urealyticum*, 446, 447
*Coxiella*
– *burnetii*, 210, 553
Cristaux, 181
*Cronobacter*, 351
Cylindres, 181
Cytochrome oxydase, 21
Cytologie, 243

D
DAEC, 167
Déchets, 103, 104
Déclaration obligatoire, 614
Dépistage des porteurs de germes à potentiel infectieux ou multirésistants, 117
*Dermabacter*, 444
– *hominis*, 446

Désulfhydrase, 25
Dialyse péritonéale, 210
Diarrhée, 167
Diphtérie, 444
Dispositif intra-utérin, 207
DNAse, 26
*Dysgonomonas*, 411

**E**
EAggEC, 167
Eau peptonée, 358
ECBU, 179
*Edwardsiella,* 348
Effet postantibiotique, 596
*Eggerthella,* 572
EHEC, 167
*Ehrlichia,* 562
EIEC, 167
*Eikenella corrodens,* 200, 409
Électrophorèse capillaire, 610
*Empedobacter*, 378
Encre de Chine, 8, 300
Endocardite
– à hémocultures négatives, 149
– à hémocultures positives, 149
Endocervicite, 240
Endocol, 242
Endophtalmie, 223, 226
Ensemencement
– des milieux liquides, 20
– des milieux solides
– – en boîte de Petri, 19
– – en tube, 20
– en spirale, 20
– en stries, 19
– méthodes des quadrants, 19
– technique du râteau, 20
*Enterobacter*, 351
*Enterobacteriaceae*, 331
Entérobactéries BLSE, 120
*Enterococcus*, 59, 313, 315
Entérocoques résistants à la vancomycine, 123
EPEC, 167
Épididymite, 235
Épiglottite, 215
Épreuve de l'antigène tamponné, 420
Érysipèle, 202
*Erysipelothrix rhusiopathiae*, 453
Escarres, 201
*Escherichia*, 336
– *coli*, 58, 203
– – entérohémorragique, détection moléculaire, 58
– *coli* O157 H7, 15, 169, 172–175
Esculine, 23
ETEC, 167
Ethmoïdite, 219
*Eubacterium*, 569
*Ewingella*, 353
Examen microscopique, 5
– analyse cytologique, 6
– analyse qualitative, 7
– analyse quantitative, 6
– après coloration, 9
– après réaction d'immunofluorescence, 12
– bactériologique, 8
– direct à l'état frais, 8
Expectoration, 190, 192

**F**
Facteur
– affinité pour le fibrinogène, 290
– V, 394, 396
– X, 394, 396
Fibroaspiration, 190, 192
Fièvre
– de Malte, 413
– de Pontiac, 422
– Q, 557
– récurrente, 481
– – endémique à tiques, 478, 482
– – épidémique à poux, 478, 481
*Finegoldia*, 578
*Flavobacterium*, 378, 380
Flore
– bactérienne
– – ante mortem et post mortem, 129
– – résidente ou endogène, 129
– de Döderlein, 456
Fluoroquinolones, 600
*Francisella*, 202, 390
– *tularensis*, 203
FTA, 496, 497
Furoncles, 202
*Fusobacterium*, 573, 577
– *necrophorum*, 578

**G**
Gants, 100
*Gardnerella vaginalis*, 572
GBEA, 109
Gélose
– au sang cuit, 15
– au sang frais, 14
– chromogène, 16
– CLED, 14
– Columbia, 14
– Columbia CNA, 299
– DNAse, 299
– Hektoen, 15
– HTM, 19
– MacConkey au sorbitol, 15
– Mueller-Hinton, 588
– nutritive, 14
– pour *Bordetella pertussis*, 15, 386
– pour *Brucella*, 15, 386
– pour campylobactéries, 15, 432
– pour *Clostridium difficile*, 15
– pour *Corynebacterium diphtheriae*, 15, 447
– pour *Escherichia coli* O157 H7, 15
– pour légionelles, 15, 423
– pour *Neisseria* pathogènes, 15
– pour *Pseudomonas*, 15, 405
– pour *Salmonella* et *Shigella*, 15
– pour *Staphylococcus aureus,* streptocoques hémolytiques et entérocoques, 16, 447
– pour staphylocoques, 16

– pour *Yersinia enterocolitica*, 16, 401
– TCBS, 363
– tryptone soja, 14
– viande-foie, 20
– Wilkins Chalgren, 19
Génotypage, 55
GISA, 295
Glycopeptides, 602
Gonocoque, 207
*Granulicatella*, 314
Griffures, 200
Guillain-Barré, syndrome de, 431

**H**

HACEK, 404
*Haemophilus*, 394
– *ducreyi*, 253
*Hafnia*, 351
*Helicobacter*, 429
– *helmannii*, 436
– *pylori*, 41, 59, 434
Hémocultures, 67
– acheminement, 144
– examen microscopique, 144
– flacons, 139
– incubation des flacons, 144
– milieux, 139
– négatives, 147
– nombre et volume, 143
– positives, 145
– prélèvements, 141
– repiquages, 144
– systèmes, 140
Hémolyse, 302, 313
Hémolytique et urémique, syndrome, 167, 173, 337, 340
HGISA, 295
Hippurate de sodium, 306
Humeur aqueuse, 226
Hygiène, 100

**I**

Identification moléculaire, 55
Immunocapture sur membrane, 36
Immunochromatographie, 36
Immunofluorescence (IF), 35
Impétigo, 202
Incidents transfusionnels, 269
Infection(s)
– du site opératoire, 201
– oculaires, 223
Informatique, 79
Internet, 87

**K**

Kauffmann-White, schéma de, 345
Kératites, 223
*Kingella*, 409
– *kingae*
– – détection moléculaire, 57
*Klebsiella*, 253, 350
– *granulomatis*, 253
*Kluyvera*, 348

**L**

*Lactobacillus*, 455, 569
Lactose, 23
Lancefield, groupe de, 306
Latex, 26
LCR
– analyse
– – bactériologique, 162
– – biochimique, 159
– biologie moléculaire, 163
– examen
– – macroscopique, 159
– – microscopique, 160
LDC, 24
Lécithinase, 26
*Leclercia*, 350
*Legionella*
– *pneumophila*, 39, 421
Légionelles
– détection moléculaire, 56
Lemierre, syndrome de, 216
*Leminorella*, 350
*Leptospira*, 476, 487
Leptospirose, 488
Lésions granulomateuses, 202
Leucocyturie, 180, 184, 185
Lipase, 25
Liquide(s)
– amniotique, 258
– articulaires, 209
– ascite, 209
– bronchoalvéolaire, 191, 192
– céphalorachidien, 263
– dialyse péritonéale, 209
– gastrique, 257, 258
– péricardique, 209, 210
– péritonéaux, 209
– pleuraux, 209
*Listeria*, 458
Listériose, 458
Lymphogranulomatose vénérienne, 548

**M**

Maladie
– griffes du chat, 411
– légionnaire, 422
– Lyme, 203
– Whipple, 467, 468
MALDI-TOF, 69
Masques, 100
Matériels, 205
Mélitine, 420
Méningite, 159
Méningocoque, 329
Métabolisme
– glucidique, 22
– lipidique, 25
– protéique, 24
Méticilline, 294
*Micrococcaceae*, 287
*Micrococcus*, 287
*Micromonas*, 578

Microscope à fond noir, 8
Milieu(x)
– à l'acétate, 359
– au citrate
– – de Christensen, 360
– – de Simmons, 359
– au KCN, 359
– au malonate, 359
– Baird-Parker, 26, 289, 299
– BCYE, 15
– Bordet-Gengou, 386
– *Brucella*, 567
– BSCA, 375
– CAP, 289
– Chapman, 16, 289, 299
– chromogènes, 16, 181, 289, 294, 306
– CIN, 401
– Clark et Lubs, 358
– CNA, 289
– culture, 13
– Hayflick, 540
– Hugh et Leifson, 22
– Karmali, 169
– Kligler-Hajna, 20, 358
– LKV, 568
– Loeffler, 447
– Löwenstein-Jensen, 518
– MacConkey sorbitol, 169
– Man, Rogosa et Sharpe (MRS), 456
– mannitol mobilité, 22, 358
– MGIT, 520
– Moeller, 359
– OFPBL, 376
– Regan-Lowe, 386
– sP-4, 540
– Sabouraud, 169
– Schiemann, 16
– Shepard, 540
– Sven Gard, 359
– Taylor, 359
– urée-indole, 358
– Worfel-Fergusson, 359
Mini-LBA, 191, 192
*Mobiluncus*, 572
Modes de transmission
– voie cutanéomuqueuse, 94
– voie orale, 94
– voie respiratoire, 94
*Moellerella*, 350
*Mogibacterium*, 572
*Moraxella*, 388
*Morganella*, 356
Morsures, 200, 394
Mort subite du nourrisson et de l'enfant, 132
Mucoviscidose, 194
MVLA, 61
– complexe de la tuberculose, 520
*Mycobacterium*, 202, 507
– *africanum*, 508, 519
– atypiques, 508, 522, 533
– *bovis*, 508
– *leprae*, 508
– *tuberculosis*, 58, 209, 210, 508
– – détection moléculaire, 55, 58
*Mycoplasma*, 56, 207
– *genitalium*, 538
– – détection moléculaire, 56
– *hominis*, 538
– *pneumoniae*, 538
– – détection moléculaire, 56
Mycoplasmes, 537
Mycose, 239
*Myroides*, 378, 380

**N**

*Neisseria*
– atypiques, 410
– *gonorrhoeae*, 223, 321
– – détection moléculaire, 56
– *meningitidis*, 37, 38, 41, 321, 325
– – détection moléculaire, 56
Neurosyphilis, 502
Nitrate réductase, 21
*Nocardia*, 202, 203, 443
Nucléase, 291

**O**

*Ochrobactrum*, 378, 380
ODC, 24
Œil, 223
OGM, 101, 102
*Oligella*, 388
ONPG, 169
Optochine, 307, 313
Orchiépididymite, 235
Organisation d'un laboratoire, 43
Ostéites, 203
Otite moyenne aiguë, 218
Oxacilline, 294, 316

**P**

*Pandoraea*, 375, 377
*Pantoea*, 351
*Pasteurella*, 200, 392
PCR, 45
– courbes d'intérêt, 51
– cycle seuil, 51
– en point final, 46
– en temps réel, 46
– universelle, 57
*Peptococcus*, 578
*Peptoniphilus*, 578
*Peptostreptococcus*, 578
Péritonites, 203
Phénylalanine désaminase, 24
Phlegmon de l'amygdale, 215
Placentoculture, 261
*Plesiomonas*, 361, 367
Pleurésies purulentes, 210
PNPG, 23
Ponction lombaire, 263
*Porphyromonas*, 573
Post mortem, microbiologie en, 129
Postes de sécurité microbiologiques (PSM), 97–99

Prélèvement(s), 5
– auriculaires, 218
– de gorge, 216
– génitaux, 229, 237
– nasal et rhinopharyngé, 219
– périphériques, 257, 258
– pharyngés, 215
– selles, 167
– sphère oropharyngée, 215
– urétral, 242, 252
– vaginal, 240, 242, 244
– vulvaire, 240, 243
*Prevotella*, 573
Produits sanguins, 269
*Propionibacterium*, 444, 572
– *acnes*, 205, 209
Prostatite, 186, 235
*Proteae*, 353
Protéine A, 290
Proteus, 356
Prothèse, 209
*Providencia*, 356
*Pseudomonas*
– *aeruginosa*, 201, 372
Pus
– examen direct, 200
– interprétation, 200
– milieux de culture, 200
– origine abdominale, 203
– prélèvements, 199
PYR, 307, 314
Pyroséquençage, 53

**Q**
Quotient inhibiteur résiduel, 603

**R**
*Rahnella*, 353
*Ralstonia*, 375, 377
*Raoultella*, 350
Résistance adaptative, 596
*Rhodococcus*, 444
– *equi*, 446
*Rickettsia conorii*, 558
Rickettsies, 558
Risque infectieux, 91
*Rochalimaea henselae*, 411
*Rothia*, 444
– *dentocariosa*, 446
Rouget du porc, 453

**S**
*Salmonella*, 125, 169, 210, 342, 344
SARM, 58, 119
Sécrétions
– trachéobronchiques, 189
Selles, 167
– examen
– – macroscopique, 168
– – microscopique, 168
– milieux d'incubation, 168
– recherche de leucocytes, 168
Séquençage
– *dye terminator sequencing*, 53
– mélange réactionnel, 52
– méthode de Sanger, 52
*Serratia*, 353
*Shewanella*, 378, 380
*Shigella*, 169, 210, 341
SHU. *Voir* hémolytique et et urémique, syndrome
Sinusite, 219
Skirrow, milieu de, 15
*Slackia*, 572
Sonde urétérale, 205
Spectrométrie de masse, 28
Sphère oropharyngée, 215
*Sphingobacterium*, 378, 380
*Sphingomonas*, 375, 380
Spirochètes, 475
*Staphylococcus*
– *aureus*, 126, 201, 287
– – détection moléculaire, 58
STEC, 174, 175
*Stenotrophomonas*, 375, 377
Stérilisation
– conditionnement, 76
– indications, 75
– nettoyage, 76
– prédésinfection, 76
– traçabilité, 77
– transport et stockage, 78
*Streptobacillus moniliformis*, 200
*Streptococcaceae*, 299
*Streptococcus*, 300
– *agalactiae (groupe B)*, 308
– *des groupes C et G*, 308
– – détection moléculaire, 58
– du groupe A, 216, 307
– du groupe D, 308
– oraux, 308
– *pneumoniae*, 39, 312
– – détection moléculaire, 57
– *pyogenes* (groupe A), 40, 201, 210, 308
Syphilis, 203
– diagnostic direct, 493
– diagnostic sérologique, 494
– traitement, 503
Système de management de la qualité (SMQ), 110

**T**
*Tatumella*, 356
TCBS, 169
TDA, 16
Test
– à l'uréase, 437
– Anton, 461
– au rose Bengale, 420
– Heilman, 593
– immobilisation des tréponèmes, 497
– Nelson et Mayer, 497
Toxine
– botulique, 572

– cholérique, 365
– diphtérique, 449, 453
TPHA, 496
*Trabulsiella*, 350
Trachome, 547
Transmission des résultats, 84
*Treponema*, 476
– *pallidum*, 253, 492
*Trichomonas vaginalis*, 239
*Tropheryma whipplei*, 467
– détection moléculaire, 57
Tryptophanase, 25
Tryptophane désaminase, 24
*Turicella*, 444
– *otitidis*, 446
Typage génétique, 59
Type respiratoire, 20

**U**
Ulcération, 201
– génitale, 229, 253
Ulcères gastriques et duodénaux, 434
*Ureaplasma*, 207, 538
Uréase, 26
Urétrite, 232
Urines, 179
– examen microscopique, 180
– interprétation, 184
– modes d'ensemencement, 184
– uroculture, 181

**V**
Vaginite bactérienne, 240
Vaginose bactérienne, 239
Validation, 81
*Varibaculum*, 572
VCAT, 15
VCN, 15
VCNT, 15
VDRL, 494
*Veillonella parvula*, 578
*Vibrio*
– *cholerae*, 361, 364
*Vibrionaceae*, 361
Vitré, 226
Voies biliaires, 203
VP, réaction de, 307

**W**
*Weeksella*, 378
*Wolinella*, 429
Wright, séroagglutination de, 418

**Y**
*Yersinia*, 210
– *enterocolitica*, 400, 403
– *pestis*, 400, 402
– *pseudotuberculosis*, 400
*Yokenella*, 350

**Z**
Zones confinées, 96