

MANUEL DE MICROBIOLOGIE

TRAVAUX PRATIQUES - PARTIE SPÉCIALE
MÉDECINE GÉNÉRALE, SECTION FRANÇAISE

Auteur principal : Assis. Univ. Dr. Mihaela-Diana Popa
Auteur secondaire : Axel Balogh de Manko-Bük
Coordonnateur : Prof. Dr. Monica Licker



UMFT

Universitatea de
Medicină și Farmacie
„Victor Babeș”
din Timișoara

UNIVERSITATÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
“VICTOR BABEŞ” TIMIŞOARA

MANUEL DE MICROBIOLOGIE
TRAVAUX PRATIQUES - PARTIE SPÉCIALE
MÉDECINE GÉNÉRALE, SECTION FRANÇAISE

Auteurs: Assis.Univ. Dr. Mihaela-Diana Popa
Axel Balogh de Manko-Bük

Coordonnateur: Prof. Dr. Monica Licker

Editura „Victor Babeş”
Timișoara, 2019



Editura „Victor Babeș”

Piața Eftimie Murgu 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: *evb@umft.ro*

www.umft.ro/editura

Director general: Prof. univ. dr. Dan V. Poenaru

Director: Prof. univ. dr. Andrei Motoc

Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Referent științific: Prof. univ. dr. Codruța Șoica

Indicativ CNCIS: 324

© 2019 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-786-141-9

ISBN vol. 2: 978-606-786-143-3

Table des matières

| | |
|--|----|
| 1. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACTÉRIES DU GENRE STAPHYLOCOCCUS | 6 |
| 1.1) Le diagnostic bactériologique pour <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 |
| 1.2) Staphylocoques coagulase négative (SCN) | 11 |
| 1.3) Les infections nosocomiales à <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline .. | 12 |
| 2. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACTÉRIES DU GENRE STREPTOCOCCUS | 13 |
| 2.1) <i>Streptococcus pyogènes</i> (le Streptocoque de groupe A) : | 13 |
| 2.2) <i>Streptococcus agalactiae</i> (le Streptocoque de groupe B) | 16 |
| 2.3) <i>Streptococcus viridans</i> | 17 |
| 2.4) <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 18 |
| 2.5) Le genre <i>Enterococcus</i> | 20 |
| 3. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACTÉRIES DU GENRE NEISSERIA 22 | |
| 3.1) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 22 |
| 3.2) <i>Neisseria Meningitidis</i> | 24 |
| 4. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACILLES À GRAM POSITIF AEROBIES | 27 |
| 4.1) Le genre <i>Corynebacterium</i> : | 27 |
| 4.2) Le genre <i>Listeria</i> | 29 |
| 4.3) Le genre <i>Bacillus</i> | 30 |
| 5. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES GERMES DE LA FAMILLE DES ENTEROBACTERIACEAE | 32 |
| 5.1) Le genre <i>Salmonella</i> | 32 |
| 5.2) Le genre <i>Shigella</i> | 35 |
| 5.3) Le genre <i>Escherichia</i> | 36 |
| 5.4) Le genre <i>Klebsiella</i> | 41 |
| 5.5) Le genre <i>Proteus</i> | 43 |
| 6. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACILLES À GRAM NÉGATIF, NON-FERMENTATIFS | 46 |
| 6.1) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 46 |
| 6.2) <i>Acinetobacter baumannii</i> | 49 |
| 7. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES INFECTIONS AVEC D'AUTRES TYPES DE BACILLES À GRAM NÉGATIFS, AEROBIES | 51 |
| 7.1) Le genre <i>Campylobacter</i> | 51 |
| 7.2) <i>Helicobacter pylori</i> | 53 |
| 7.3) Le Genre <i>Haemophilus</i> | 56 |
| 8. LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE POUR LES INFECTIONS PODUITES PAR DES GERMES ANAEROBIES | 60 |
| 8.1) <i>Clostridium botulinum</i> | 60 |
| 8.2) <i>Clostridium tetani</i> | 61 |
| 8.3) <i>Clostridium difficile</i> | 62 |
| 9. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES GERMES DU GENRE MYCOBACTERIUM | 64 |
| 9.1) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 10. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES INFECTIONS PRODUITES PAR DES BACTÉRIES SPIRALÉES..... | 68 |
| 10.1) <i>Treponema pallidum</i> | 68 |
| 10.2) <i>Borrelia</i> | 71 |
| 11. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES MYCOPLASMES..... | 73 |
| 11.1) <i>Mycoplasma spp.</i> | 73 |
| 12. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR CHLAMYDIA TRACHOMATIS..... | 77 |
| 12.1) <i>Chlamydia trachomatis</i> | 77 |
| 13. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES INFECTIONS PRODUITES PAR LES LEVURES: | 80 |
| 13.1) Le genre <i>Candida</i> :..... | 80 |
| 14. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES INFECTIONS VIRALES :..... | 83 |
| 14.1) Le H.I.V :..... | 83 |
| 14.2) Les virus hépatiques:..... | 85 |
| Bibliographie: | 88 |

1) LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACTÉRIES DU GENRE *STAPHYLOCOCCUS*

1.1) Le diagnostic bactériologique pour *Staphylococcus aureus*

Dans la **famille** des *Micrococcaceae* on groupe les quatre genres suivants : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* et *Stomatococcus*.

Le **genre** *Staphylococcus* comprend 42 espèces : *S.aureus*, *S.capitis*, *S.auricularis*, *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.haemoliticus*, *S.saprophyticus*, etc.

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique. Ils sont disposés en amas irréguliers qui présentent l'aspect caractéristique de grappes de raisins. Ils ne sont pas mobiles et non sporulés, de plus, ils sont généralement non capsulés et catalase positifs. Leur croissance est plus rapide et abondante en aérobiose.

Espèce : *S.aureus*

Signification clinique : *S.aureus* est la cause d'infections de gravité variable, avec diverses localisations, en fonction de la porte d'entrée.

S. aureus est l'exemple même de la bactérie pyogène. Les infections superficielles cutanées, sous-cutanées et muqueuses comprennent les furoncles, panaris, impétigos, abcès, cellulites ou lymphangites. Toutes les atteintes cutanées (plaies traumatiques ou chirurgicales, brûlures, ulcères) sont des facteurs favorisant ces infections. De même que le diabète, les thérapies immunosuppressives ou les corticothérapies, et les déficits de l'immunité cellulaire. *S. aureus* est également responsable d'infections de la sphère ORL (sinusites, otites, angines, mastoïdites).

Les infections profondes surviennent soit par extension directe d'une infection superficielle, soit par diffusion par le sang de la bactérie à l'origine de septicémie. Ainsi, *S. aureus* est la principale cause d'ostéomyélites, mais peut également être responsable de méningites, d'endocardites, arthrites, abcès pulmonaires ou abcès cérébral. La staphylococcie maligne de la face est un syndrome secondaire à un furoncle de l'aile du nez.

Voici quelques exemples d'infections causées par *S.aureus* :

-L'impétigo : c'est une infection superficielle de la face et des membres, qui affecte les jeunes enfants, avec des macules, vésicules, pustules, sur un fond érythémateux ; l'association de *S. aureus* avec un Streptocoque est possible (20%).

-Les folliculites : ce sont des infections purulentes dans les follicules pileux, tandis que **l'orgelet** est situé au niveau des paupières.

-Les furoncles : représentent le développement d'une infection au niveau des glandes sébacées, avec une collection considérable de pus et tissus nécrotiques, accompagnés de douleurs.

-Les carboncles : représentent la propagation de l'infection à plusieurs glandes pilo-sébacées et au tissu sous-cutané profond.

-L'hydrosadénite : c'est une infection localisée au niveau des glandes sudoripares axillaires, périnéales, ou aux niveau des parties génitales.

-La mastite : c'est une infection de la glande mammaire chez les femmes pendant l'allaitement, avec des nodules érythémateux et formation d'un abcès.

-L'infection post-chirurgicale ou post-traumatique de la plaie est associée à un œdème local, douleur et accumulation de pus.

-Bactériémie et l'endocardite : 50% des cas sont acquis à l'hôpital, après des interventions chirurgicales, utilisation d'un cathéter intraveineux contaminé. Souvent associées à la diffusion secondaire septique, habituellement dans l'endocardite aiguë ou des infections graves, avec une mortalité d'environ 50%.

-La pneumonie et l'empyème pulmonaire sont fréquents chez les âges extrêmes.

-L'ostéomyélite et l'arthrite septique sont des résultats de la diffusion secondaire septique des infections à staphylocoques vers d'autres sites, souvent post-traumatique.

Chez les enfants, au niveau des zones métaphysaires des os longs.

Chez les adultes, elle est plus fréquente dans la région vertébrale. L'arthrite septique survient après infiltration intra-articulaire.

-Suppuration des séreuses : pleurésie, méningite, péritonite, phlegmon péri-néphrétique,

-Septicémie avec la possibilité de localisations secondaires (septicopyoémies) atteignant électivement l'os, le rein, le poumon.

-Les infections associées à la diffusion de toxines spécifiques.

-Les manifestations digestives sont dues à la production d'entérotoxines et peuvent revêtir deux formes :

L'entérococolite staphylococcique, maintenant exceptionnelle, observée après l'administration d'antibiotiques à large spectre, mal absorbés au niveau de l'intestin, qui sélectionne une flore abondante de staphylocoques entérotoxiques.

Les toxi-infections alimentaires dues à l'absorption de l'entérotoxine préalablement produite dans des aliments contaminés et/ou mal conservés.

L'incubation est courte, de 1 à 6 heures, en général 3 heures après le repas. Le malade aapyrétiqye présente d'abord des vomissements, puis des douleurs abdominales, des diarrhées et parfois un collapsus cardio-vasculaire.

Il existe 6 types antigéniques (A, B, C, C₁, D, E) d'entérotoxine, utilisés pour le diagnostic de toxi-infection alimentaires.

L'entérotoxine est thermostable et non attaquée par les sucs digestifs, et son action sur la muqueuse digestive va entraîner des vomissements et des diarrhées profuses, et cause parfois une déshydratation importante.

Les exfoliatines sont responsables de lésions bulleuses généralisées : syndrome de la peau ébouillantée chez les jeunes enfants, de la maladie de Ritter chez les nouveau-nées et de l'impétigo bulleux.

-Le syndrome de choc toxique staphylococcique se caractérise par une fièvre avec hypotension artérielle, érythrodermie desquamation diffuse ou limitée et, de façon variable, par l'existence de diarrhée, céphalée, frissons et conjonctivite. Ce syndrome a été observé sous forme épidémique chez des femmes en période menstruelle utilisant des tampons ayant un fort pouvoir d'absorption. D'autres sites colonisés par des souches de *S. aureus* productrices de cette toxine peuvent être à l'origine de chocs survenant chez les hommes et les femmes.

Chez les malades atteints de SIDA, le tableau clinique peut être sensiblement différent, avec prédominance de lésions érythémateuses extensives chroniques et défaillances multiples d'organes.

Le diagnostic de laboratoire pour les infections produites par *S.aureus* est généralement bactériologique, le diagnostic sérologique n'ayant pas de réelle valeur en pratique.

La récolte du produit pathologique se fait en fonction de la localisation de l'infection :

- Infections cutanées : récolte de pus.
- Infections des séreuses : récolte de liquide pleural.
- Infections urinaires : récolte d'urine.
- Septicémie : récolte de sang.
- Infection alimentaire : récolte de matières fécales.
- Angine : récolte d'exsudat nasal et pharyngien.

La récolte du produit pathologique se fait **avant** l'administration d'un traitement antibiotique (risque de fausser les résultats de l'examen de laboratoire).

L'examen direct, macroscopique : met en évidence une suppuration « jaune crème ». À l'échelle microscopique, sur étalement de pus avec coloration Gram on remarque des leucocytes majoritairement détruits et des cocci avec un diamètre de 0,5-1 μm , Gram positifs, disposés en grappe, intra ou extra cellulaire.

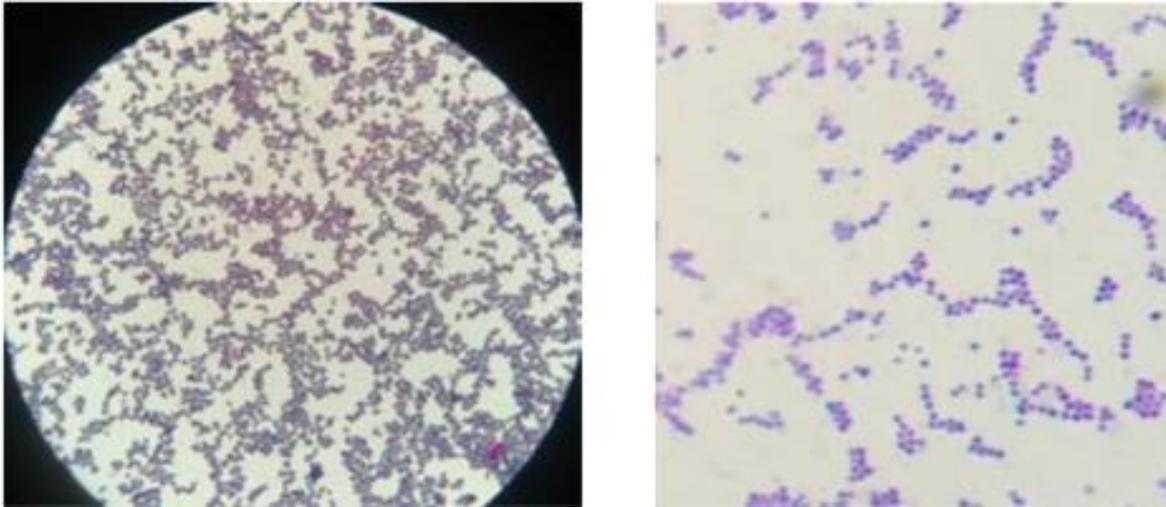


Figure 1 : *Staphylococcus* sp. : Examen microscopique – coloration Gram

L'identification des microorganismes existants dans le sang se réalise par hémoculture. Les milieux de culture chromogènes sont utilisés principalement pour les diagnostics de routine, avec pour but de réduire le temps et les ressources utilisés par méthode classique. L'identification se base sur les caractéristiques morfo-tinctoriales, culturelles et des tests de pathogénicité.

Caractères culturels : Sur gélose sang, *S.aureus* produit des colonies caractéristiques, faciles à reconnaître : rondes bombées, lisses avec des marges régulières, hémolytiques et pigmentées (couleur jaune sur milieu solide Chapman, ce qui signifie qu'elles hydrolysent le mannitol : mannito-positive).

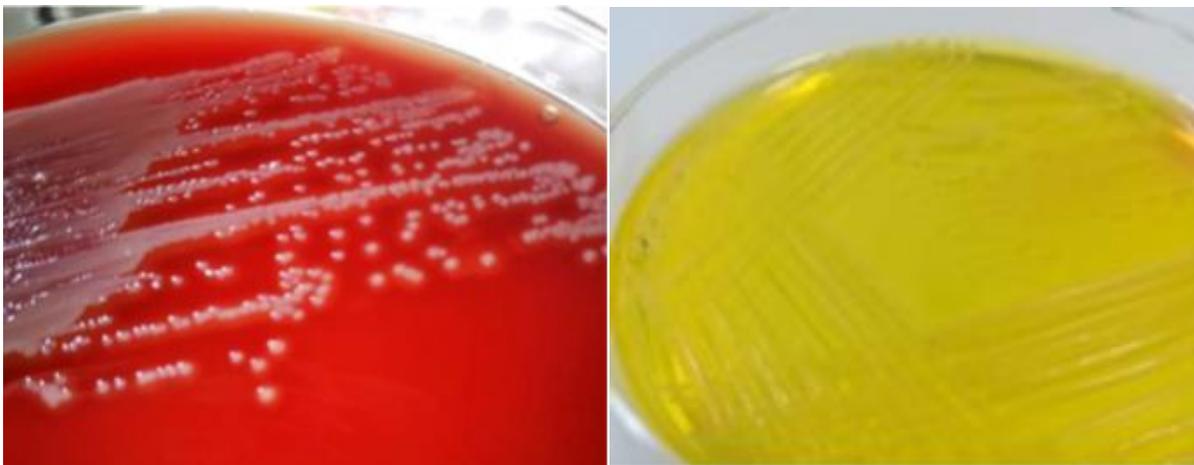


Figure 2 : *S.aureus* sur milieu gélose-sang et sur milieu Chapman.

Tests de pathogénicité in vitro:

- **Les hémolysines** s'identifient sur gélose sang. Le *S.aureus* élabore 5 types d'hémolysines.

Les plus importantes sont : l'hémolysine α , qui produit une hémolyse incomplète, et l'hémolysine β qui détermine une zone d'hémolyse complète autour des colonies.

- **La coagulase** : *S.aureus* sécrète deux coagulases : une liée et une libre, qui entraînent la coagulation du plasma, on observe une zone d'agglutination sur milieu gélose enrichi au sang et à l'aide d'un kit («PASTOREX-STAPH-PLUS») utilisant des particules de latex sensibilisées.

- **La catalase** : quelques colonies de Staphylocoques, sur des milieux non enrichi au sang, s'émulsionnent au contact d'une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2). La libération de bulles de gaz indique la présence de catalase.

- **La fermentation du mannitol** : sur milieux Chapman, les Staphylocoques mannito-positifs font virer la couleur du milieu de rose/rouge au jaune.

La sensibilité aux antibiotiques :

La croissance de la résistance de *S.aureus* aux antibiotiques est en constante augmentation depuis les années 1950-60, L'utilisation d'un antibiogramme est devenue obligatoire pour tous les types d'infections à *S.aureus*.

Les antibiotiques utilisés pour tester la sensibilité de *S.aureus* à la chimiothérapie anti-infectieuse sont :

- β -lactamine : Pénicilline, pour l'identification des types producteurs de beta-lactamase et la Cefoxitine pour l'identification des types méthicilline-résistants (SARM) ; Le *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est l'un des plus importants agents pathogènes nosocomiale. La résistance à la méthicilline implique la résistance à tous les bêta-lactamines (y compris céphalosporines de la génération I-IV et des carbapénèmes), sauf Céphalosporines de 5-ème génération. Un seul agent est utilisé pour détecter ce phénotype antimicrobien - Céfoxitine, qui est plus stable que la méthicilline en conditions de conservation, permettant une détection plus facile des espèces résistantes. Selon les normes CLSI et EUCAST, les résultats des tests à la Cefoxitine sont rapporté pour Oxacillin.

- Glycopeptides : Vancomycine, Teicoplanine (utilisés comme antibiotiques de réserve pour le SARM),

- Macrolides, Lincosamide, Streptogramine B (pour l'identification des types au phénotypes MLSB) : Érythromycine, Clindamycine,

- Aminoglycosides : Gentamycine,

- Trimetoprim/Sulfaméthoxazole,

- Fluoroquinolone : Ciprofloxacin, Moxifloxacin,
- Linezolid (utilisé comme antibiotique de réserve dans le cas de SARM).
- Rifampicine,
- Tétracycline (optionnel).

1.2) Staphylocoques coagulase négative (SCN)

Quelques mots sur *Staphylococcus epidermidis*, *schleiferi* et *lugdumensis* :

Signification clinique : *S.epidermidis* appartient à la flore commensale, habituelle, des téguments de l'organisme.

Il devient accidentellement pathogène, étant impliqué dans l'étiologie des endocardites subaiguës, pour les patients à qui l'on a posé des prothèses valvulaires ou à la suite d'autres interventions sur le cœur. Il peut aussi être impliqué dans les méningites et il est le germe qui compromet le plus fréquemment les prothèses de hanche.

S.schleiferi et *S.lugdumensis* colonisent le matériel d'implant, les cathéters, les tubes de drainages. Les deux espèces se trouvent rarement sinon en petite quantité sur les téguments sains.

- *S.lugdumensis* est responsable d'infections sévères (endocardites sur valves naturelles et artificielles, septicémies, abcès cérébraux, infections profondes des tissus, etc).
- *S.schleiferi* apparaît moins fréquemment dans le milieu hospitalier et a un rôle moins important dans les infections humaines.
- *S.haemolyticus*, peut être impliqué dans les endocardites valvulaires, septicémies, péritonites, infections du tractus urinaire et des plaies.
- *S.saprophyticus* est impliqué dans les infections du tractus urinaire chez la jeune femme active sexuellement.

Les staphylocoques coagulase-négatifs (SCN) sont pris en considération seulement dans le cas où ils sont isolés comme flore prédominante où en culture pure d'urine, LCR, liquide synovial, hémoculture (en principe stériles).

À l'heure actuelle, de nombreuses entreprises ont mis sur le marché divers kits (API Staph), systèmes automatisés (Vitek 2 compact) ou tests de biologie moléculaire (PCR) permettant d'identifier les espèces de staphylocoques (coagulase positif/négative) avec une grande précision.

1.3) Les infections nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

La résistance des staphylocoques aux antibiotiques est en constante augmentation, le taux d'incidence des SARM est plus élevée en Europe centrale, orientale et méridionale et plus faible dans les pays du nord de l'Europe. La transmission se fait généralement par voie manu-portée.

La Vancomycine, Teicoplanine et Linezolide sont des antibiotiques de réserve pour SARM.

La stratégie de maîtrise de la diffusion comprend 3 étapes :

- Identification des malades infectés ou colonisés,
- Isolement géographique et technique,
- Traitement de l'infection.

2) LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACTÉRIES DU GENRE STREPTOCOCCUS

Classification :

1. En fonction du **type d'hémolyse** qu'ils produisent sur la gélose au sang de mouton, les streptocoques sont classés dans :

- Streptocoque β -hémolitique (hémolyse complète, claire) : *Str. Pyogènes*,
- Streptocoque α' -hémolitique (hémolyse incomplète, brumeuse),
- Streptocoque α -hémolitique (verdâtre) : *Str. pneumoniae* et le group viridans,
- Streptocoque sans hémolyse.

2. D'après **la nature du polysaccharide** pariétal antigénique (classification de Lancefield) les streptocoques sont classés en 19 groupes, définis par des lettres : A, B, C ... U. D'autres streptocoques ne possèdent pas ce polyoside C : ce sont les streptocoques non groupables, sont le plus souvent commensaux.

2.1) *Streptococcus pyogènes* (le Streptocoque de groupe A) :

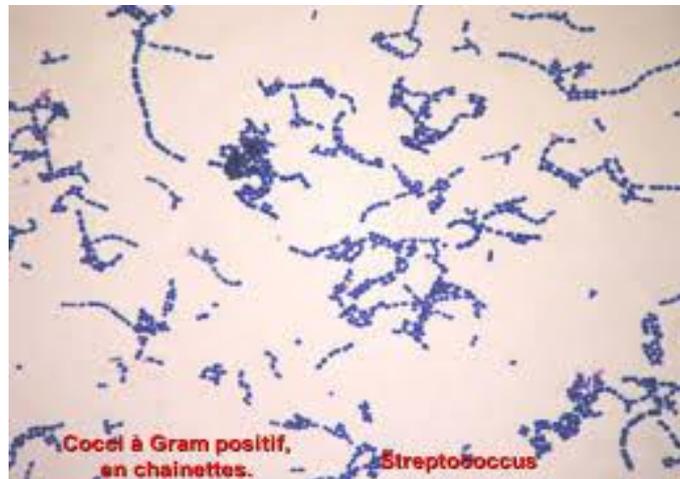


Figure 3 : Cocci à Gram positif regroupés typiquement en chaînettes plus ou moins longues.

Attention : *Str.pneumoniae* (pneumocoque) est regroupé en diplo.

Manifestations cliniques :

Les streptocoques sont responsables de nombreuses infections.

Infections suppurées :

- La pharyngite streptococcique associée au streptocoque du groupe A, peut être asymptomatique ou accompagnée de maux de gorge, de maux de tête, de fièvre et de nausées.

- La sinusite, l'amygdalite et l'otite moyenne, la pneumonie.

- La fièvre scarlatine est une autre infection suppurée.

Elle peut se définir comme une pharyngite streptococcique, associée à un érythème.

- L'impétigo est une infection suppurée qui affecte la peau. Il se forme de petites vésicules qui se transforment rapidement en croûtes de couleur miel au niveau du visage.

- L'érysipèle, dont le principal responsable est *Str. pyogenes*.

Infections systémiques :

Les infections systémiques dans lesquelles *Str. pyogenes* est parfois impliqué :

La bactériémie, la méningite, l'ostéomyélite et l'arthrite.

Complications post-streptococciques :

Les complications post-streptococciques consistent en des réactions auto-immunes et sont des affections post-infectieuses.

Les complications post-streptococciques sont : le rhumatisme articulaire aigu (RAA), la glomérulonéphrite aiguë (GNA), la chorée de Sydenham et l'érythème noueux.

Prélèvement :

Sera pratiqué en fonction du type d'infection :

- Prélèvement de gorge pour une angine.

- Prélèvement au niveau des lésions cutanéomuqueuses.

- Liquides d'épanchements.

- Hémocultures.

Culture :

L'isolement peut être fait sur gélose au sang.



Figure 4 : Culture pure de *Str.pyogenes* sur gélose sang, hémolyse bêta et test de sensibilité à la bacitracine.

Examen direct :

Cocci à Gram positif en chaînettes. Ce dernier ne présente aucun intérêt pour les prélèvements de gorge, car les streptocoques commensaux sont très nombreux.

L'identification du streptocoque du groupe A, repose sur l'hémolyse de type bêta et surtout sur le groupage antigénique qui est indispensable.

L'hémolyse bêta doit être très grande (2 à 3mm), car il existe des espèces de streptocoques (*Str.milleri*) qui possèdent l'antigène de groupe A, C ou F, mais qui ont une hémolyse bêta très petite (0,5).

Pour déterminer le groupe, il est possible d'effectuer **le test à la bacitracine** ou d'utiliser **des méthodes basées sur la réaction Ag-Ac**.

Le test à la bacitracine c'est une méthode simple et largement utilisée qui différencie les streptocoques du groupe A, sensibles au reste des groupes (hors groupe A) résistants à la bacitracine.

La détermination du groupe peut être fait par des réactions de précipitation ou d'agglutination. Ces réactions antigène-anticorps nécessitent un contact direct entre le groupe Ag (polysaccharide et C) et Ac homologue (sérum anti-groupe A, anti-groupe B, etc.). La méthode latex agglutination c'est une réaction d'agglutination sur la lame, mais dans laquelle des anticorps spécifiques du groupe ont un support des particules inertes de latex-polystyrène. Il existe actuellement un certain nombre de sociétés qui produisent également des kits qui identifient les principaux groupes de streptocoques impliqués dans la pathologie humaine (A, B, C, D, F, G).

Des kits API Strep (bio Mérieux) sont aussi disponibles, permettant l'identification d'un grand nombre de streptocoques /entérocoques et utilise 20 tests biochimiques miniaturisés. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture, puis encore l'identification est obtenue avec l'aide du logiciel dédié à l'identification des kits API.

Le système Vitek 2 compact (bio Mérieux) pour l'identification et le test de sensibilité aux chimiothérapie anti-infectieuse des streptocoques à l'aide des cartes VITEK® 2 GP (pour identification) et AST-ST01 respectivement (pour tester la sensibilité des souches de *S. pneumoniae*, streptocoques bêta-hémolytiques, streptocoques viridans) dans les 18 à 24 heures.

L'antibiogramme :

On ne réalise pas d'antibiogramme sur le streptocoque du groupe A isolé de la gorge ou de prélèvement cutané, car ce streptocoque est universellement sensible à la pénicilline.

Chez les personnes allergiques à la Pénicilline, on utilise l'Érythromycine, la Vancomycine ou la Tétracycline.

Diagnostic indirect :

Il permet de porter un diagnostic de complication post-streptococcique. L'infection streptococcique initiale ayant pu être négligée ou inaperçue, on recherchera l'élévation du titre des anticorps antistreptolysines O.

Le test ASLO représente la méthode habituelle de sérodiagnostic des infections à streptocoques produites par les sérogroupes A, C, G. Il s'agit d'une réaction de neutralisation in vitro basée sur la propriété des anticorps ASLO de supprimer l'effet lytique de l'antigène (streptolysine O) sur le système hématologique (globules rouges de lapin). Il peut également être réalisé sur la lame par une réaction latex agglutination.

Les antistreptolysines O (ASLO) qui à l'état normal ne dépassent pas 200UI/ml, atteignent ou dépassent **800UI/ml**. Une variation significative du titre entre deux prélèvements effectués à 7 ou 15 jours d'intervalle a une grande valeur diagnostique. Cependant le taux d'ASLO peut rester normal malgré un tableau clinique post-streptococcique (GNA secondaire à un impétigo). Il faut alors rechercher l'élévation du titre des anti-streptodornases, ces dernières peuvent être recherchées isolément ou de façon groupée avec les ASLO et les anti-streptokinases.

2.2) *Streptococcus agalactiae* (le Streptocoque de groupe B)

Str.agalactiae est un germe commensal de l'intestin, du vagin, de l'urètre et des voies respiratoires.

Signification cliniques : *Str.agalactiae* peut être la cause d'infections sévères du nouveau-né (septicémie néonatales avec détresse respiratoire). La contamination ayant lieu lors de l'accouchement avec la flore du tractus génital maternel.

Chez la jeune femme, il provoque des infections urogénitales. Chez les personnes immunodéprimées, des infections respiratoires, urinaires, septicémies, méningites, endocardites et myocardites aiguës.

Prélèvement : En général, on récolte des sécrétions vaginales, cervicales et le LCR.

Isolement et identification : Se fait sur gélose sang et gélose chocolat. Après ensemencement, on incube 24 heures à 37°C en aérobie ou dans une atmosphère avec CO₂. L'identification se base sur les caractères culturels et la structure antigénique.

Caractères culturels : Sur gélose sang, les streptocoques du groupe B développent de grandes colonies avec hémolyse variable.

Structure antigénique : L'identification du groupe se fait par screening et réaction Antigène-Anticorps (abrégé Ag-Ac), qui sera alors positive pour le groupe B.

Sensibilité aux antibiotiques : le test de sensibilité est obligatoire, principalement en raison du fait de l'augmentation des résistances aux antibiotiques (Macrolides et Tétracyclines).

L'association Pénicilline-Aminoside est synergique.

2.3) Streptococcus viridans

Les Streptocoques viridans sont aussi dénommés « Streptocoques oraux », ils sont commensaux de la cavité buccale, pharynx, de l'intestin, de la peau et des voies génitales.

Signification clinique : Il est parmi les espèces qui jouent un rôle étiologique prédominant dans la formation de caries dentaires et les paradontopathies, comprenant aussi *Str.mutans*, *Str.sanguis*, *Str.anginosus* (*Str.milleri*).

Ils sont fréquemment identifiés comme agents étiologiques des endocardites subaiguës. Diffusés dans la circulation à l'occasion d'une extraction dentaire, d'une opération dans la sphère ORL ou maxillo-faciale.

Le diagnostic d'une endocardite subaiguë est fait par hémoculture.

Le diagnostic de laboratoire de ces infections est bactériologique et effectué seulement quand les germes sont isolés de liquides organiques normalement stériles.

L'isolement se fait par ensemencement de produits biologiques sur gélose sang. On observe les caractères culturels après incubation à 37°C pendant 24h.

On observe alors des colonies de petite taille, avec hémolyse α (verdâtre = « viridans ») qui suggère la présence de *Str.viridans* ou du pneumocoque.

Pour préciser le diagnostic on réalise un test à **l'Optochine** (viridans y est insensible), on peut aussi utiliser une galerie API.

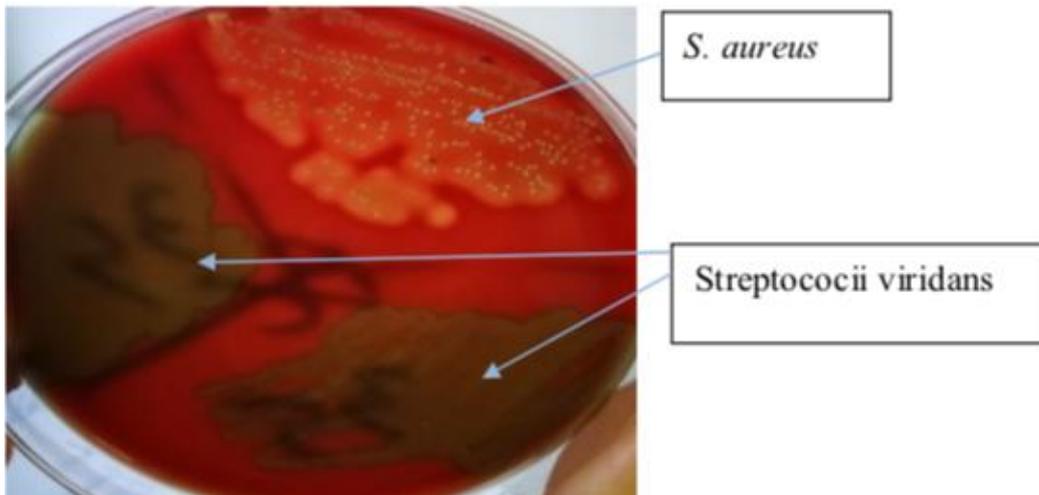


Figure 5 : Culture de *S.aureus* et *Str.viridans* sur milieu gélose-sang.

2.4) *Streptococcus pneumoniae*

Il est commensal des voies respiratoires supérieures chez l'homme.

Significations cliniques :

Une fois encapsulé, il devient responsable d'infections broncho-pulmonaires, d'infections de la sphère ORL, de méningites purulentes, d'endocardites, de péritonites, arthrites et conjonctivites.

Prélèvement :

Varié en fonction de la localisation de l'infection :

- Expectations
- Prélèvement des voies respiratoires basses
- Pus d'otites
- LCR
- Sang

Examen direct :

L'observation après coloration de Gram est primordiale, vu que la morphologie des diplocoques à Gram positif, encapsulés, est caractéristique.

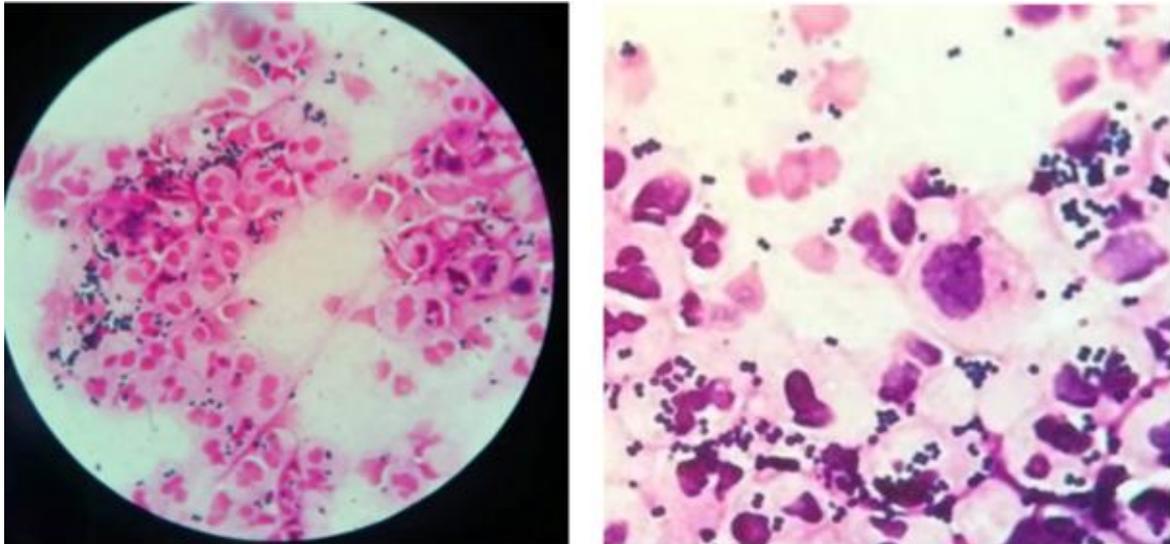


Figure 6 : *Str.pneumoniae* : Examen microscopique, coloration Gram

La culture :

Sur le milieu enrichi au sang, la culture est réalisée rapidement afin d'éviter la lyse des bactéries.

L'identification sur des caractères culturels.

Sur les milieux enrichi au sang le pneumocoque développe de petites colonies lisses, mucoïde, environ 1 mm de diamètre, avec la zone de α hémolyse autour. Les jeunes colonies sont bombées. Ces aspects culturels sont également présents chez les streptocoques viridans et nécessite des tests de différenciation: **le test d'optochine.**

Le test d'optochine: au milieu de la zoneensemencée, on dépose un disk d'optoquine, puis incubé pendant 24 heures à 37 ° C. Le test est positif (les germes sont sensibles à l'optochine) si autour du disque la culture est inhibée sur une surface minimale de 20 mm. C'est un test très spécifique, ce qui différencie les pneumocoques (sensibles) des *Str. viridans* (résistants aux optochine).



Figure 7 : Le test d'optochine

Le sérotypage est réalisé seulement dans un but épidémiologique.

Antibiogramme :

Il est nécessaire de réaliser un antibiogramme et de déterminer la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) à la pénicilline. Les diamètres d'inhibition des souches de pneumocoques intermédiaires ou résistantes à la Pénicilline G sont très variables et celles-ci peuvent être considérées sensibles à la Pénicilline G suivant la valeur de la CMI.

Une détermination précise de la CMI peut être faite par le E-test (utilisation de bandelettes imprégnées d'antibiotique). Les souches sont classées en fonction de la sensibilité à la Pénicilline G comme suit:

Sensibles : CMI < 0,1 Mg/l.

Intermédiaires : 0,1 < CMI < 1 mg/l.

Résistantes : CMI > 2 mg/l.

Résistance croisée à un certain degré avec d'autres bêta-lactamines.

Des techniques immunologiques permettent de mettre en évidence les antigènes pneumococciques dans les produits biologiques (LCR, liquides pleuraux, urines). Ces techniques manquent de sensibilité et leur intérêt est de plus en plus discuté.

2.5) Le genre *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* est rentré récemment dans la taxonomie. Il inclut 12 espèces dont 10 qui ont été isolées dans des infections humaines. Il faisait auparavant partie du genre *Streptococcus* du groupe D.

Ces bactéries se trouvent essentiellement dans l'intestin et passent dans l'environnement.

Les infections à *Enterococcus* surviennent le plus souvent dans un environnement hospitalier, en postopératoire. La transmission peut se faire d'un patient à l'autre, ou par les mains du personnel soignant.

Parmi les espèces habitant l'homme, *E.faecalis* et *E.faecium* constituent le groupe des Entérocoques qui ont la capacité de se développer sur milieu NaCl 6,5%.

L'isolement se fait sur gélose-sang, les colonies sont petites, avec une hémolyse variable.

L'identification se base sur la structure antigénique (polysaccharide de groupe D) et sur les caractères biochimiques.

En microscopie on voit des cocci à Gram positifs, en chainettes.

Les Entérocoques sont naturellement **résistants** face aux Céphalosporines de troisième génération, Clindamycine, Triméthoprim-sulfaméthoxazole et Aminoglycosides (ils sont plus résistants que les streptocoques).

Les suivants sont testés:

- sensibilité aux pénicillines
- niveau élevé de résistance aux aminosides
- sensibilité aux glycopeptides
- sensibilité au linézolide
- sensibilité à la tigécycline
- sensibilité aux fluoroquinolones, nitrofurantoïne - si les entérocoques ont été isolés de l'urine.

Il y a une augmentation continue du pourcentage de souches d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* résistant à la vancomycine (phénotype VRE). La résistance à la vancomycine est de nature plasmidique, fournie par les gènes *vanA* et *vanB* et peuvent poser des problèmes de contrôle des infections nosocomiales, en raison de la transmission de la résistance et d'autres souches.

L'identification au niveau des espèces est importante car il existe des espèces (*E. gallinarum*) avec résistance naturelle à la vancomycine.

Et dans le cas même où ils seraient sensibles à la Vancomycine ou à la Pénicilline, aucun de ces antibiotiques ne peut atteindre une concentration sérique suffisante et efficace dans les infections graves, comme par exemple dans les endocardites.

Dans ce cas, on opte pour une association de Pénicilline, ou de Vancomycine, avec un Aminoglycoside. La résistance n'empêche pas la synergie.

3. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACTÉRIES DU GENRE *NEISSERIA*

La famille *Neisseriaceae* comprend 15 genres, parmi lesquels : *Neisseria*, *Eikenella*, *Kingella*, etc.

Les *Neisseria* sont des cocci, à Gram négatifs, immobiles, non-sporulés, réniforme, habituellement disposés en diplo, les concavités étant face-à-face. De la même façon que pour les pneumocoques, les espèces pathogènes possèdent une capsule, mais elle n'est visible que sur les préparations fraîches. En culture, ce sont des germes qui ont de grandes exigences nutritionnelles et besoin d'une température optimale, comprise entre 35 et 37°C. Ce sont des germes oxydase et catalase positifs.

Les *Neisseria* sont des bactéries commensales des muqueuses de l'homme et de l'animal, sauf *Neisseria gonorrhoeae*, qui ne fait jamais partie de la flore normale.

3.1) *Neisseria gonorrhoeae*

Grande pathogène, aérobie.

Localisation : Muqueuses des voies génitales de l'homme et de la femme (germe strictement humain). Agent des gonococcies, transmission sexuelle.

Pouvoir pathogène :

Chez l'homme : Épididymite, urétrite, prostatite.

Chez la femme : Bartholinite, cervicite, salpingite.

Sa **transmission** est essentiellement directe.

Il peut être responsable d'infections extra-génitales : une conjonctivite purulente chez le nouveau-né.

Et il peut être à l'origine d'autres infections (complications) : Septicémie, arthrite, myocardite.

Diagnostic bactériologique :

Prélèvement :

-Chez l'homme :

En phase d'infection aiguë : Prélèvement d'une goutte purulente avant la miction.

En phase d'infection chronique : Prélèvement de sécrétions urétrales.

-Chez la femme :

Prélèvement au niveau du méat urétral, des glandes de Bartholin et au niveau du col utérin.

Éventuellement : Prélèvements de sécrétions pharyngées, anales et de liquide articulaire.

Examen direct : Les frottis seront colorés par la méthode de Gram (ou au bleu de méthylène). On observera des Gonocoques présents sous forme de cocci à Gram négatifs, immobiles et disposés en diplocoques, ils peuvent aussi présenter une capsule et des fimbriae, qui leur permettent de s'attacher aux épithéliums de revêtement des muqueuses.

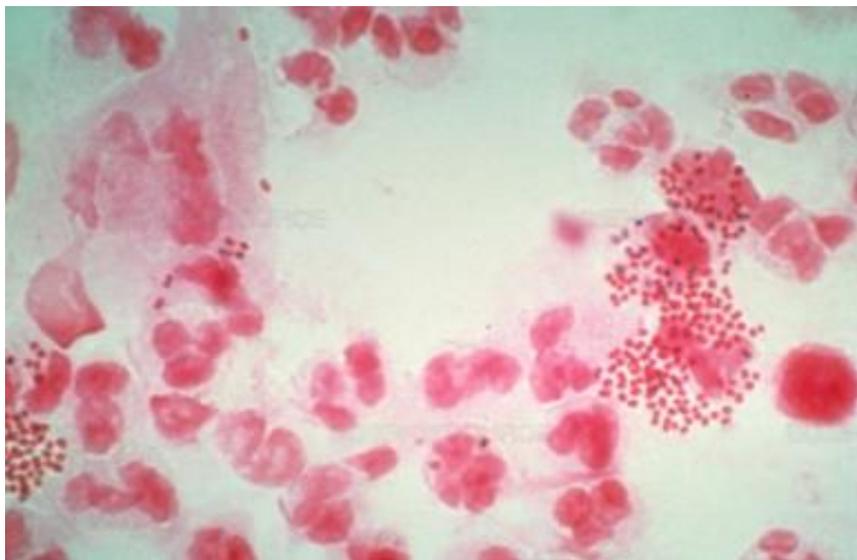


Figure 8 : *Neisseria gonorrhoeae* – Examen microscopique du produit pathologique.

On notera la présence de polynucléaires altérés, les germes peuvent être intracellulaires ou extracellulaires. La présence de germes intracellulaires est très évocatrice.

L'isolement se fait sur une gélose chocolat avec des facteurs de croissance et des antibiotiques (Vancomycine, Colistine, Nystatine), auxquels le gonocoque présente naturellement une résistance, pour empêcher le développement d'autres germes.

Dans une atmosphère contenant 10 % de CO₂ de 24 à 48 heures, à 37°C. On peut aussi utiliser un milieu sélectif Martin-Lewis, NYC-agar.

Identification de colonies fines, petites et transparentes. L'identification sera faite sur le caractère oxydase-positif, par la vérification de la morphologie des germes, par la fermentation des sucres (seulement le glucose), et par réaction Ag-Ac.

Sensibilité : Les Gonocoques ont développé une résistance pour la Pénicilline, Aminosides (Spectinomycine) et une sensibilité réduite aux Tétracyclines.

Les antibiotiques les plus efficaces sont : les Phénicolols, les Fluoroquinolones et les Céphalosporines.

3.2) *Neisseria Meningitidis*

Conditionnel pathogène, aérobic, *N.meningitidis* peut être isolée du pharynx de personnes saines (15%).

Localisation : Dans le rhinopharynx, seulement chez l'Homme.

Voie de transmission aérienne, à courte distance.

Pouvoir pathogène :

Septicémie : Après avoir adhéré aux muqueuses du rhinopharynx, les méningocoques se disséminent par voie sanguine, constituant la deuxième étape de la maladie et provoquant ainsi une septicémie. Le tableau clinique de cette septicémie peut se compliquer et donner la **Méningococcémie fulminante** (syndrome de Waterhouse-Friderichsen).

Elle peut s'associer aux chocs infectieux, purpura extensif induit par la coagulopathie.

-Méningite à Méningocoques (méningite cérébrospinale).

Diagnostic bactériologique :

Prélèvement : On peut prélever le liquide céphalo-rachidien. Le LCR doit rapidement être transporté au laboratoire en évitant tout contact avec le froid. On peut récolter du sang (hémoculture) ou encore un exsudat naso-pharyngien (au niveau de la porte d'entrée).

Examen macroscopique :

L'aspect du liquide est typiquement trouble et rarement xanthochromique (jaune ou clair).

Examen microscopique :

On observe le sédiment, obtenu par centrifugations du LCR, avec une coloration Gram.

On utilise la numération des éléments cellulaires : normalement, le LCR contient moins de 2 éléments/mm². En cas d'infection, quelques centaines d'éléments cellulaires sont retrouvés avec une majorité de polynucléaires altérés. Et la présence caractéristique de cocci Gram négatifs disposés en diplo, et avec une forme de rein, de grain de café.

Isolement : Elle se base sur la culture sur un milieu gélose-sang, placée en aérobic et en atmosphère riche en CO₂, pendant 24 à 48 heures, à 37° C.

Le sang pour hémoculture est ensemencé directement sur les flacons d'hémoculture avec de milieu liquide. Les flacons positifs sont signalés de manière audible et visuelle. Les flacons sont surveillés toutes les 10 minutes, ce qui permet la détection immédiate des flacons positifs. Le protocole de surveillance est de 7 jours, mais le développement de microorganismes il peut parfois être détecté après seulement 8 heures.

Identification : L'observation de colonies transparentes et oxydase-positif est évocatrice, mais on peut aussi compter sur la morphologie caractéristique en microscopie. Sur la gélose - chocolat, les colonies sont gris-opaques. L'identification est basée sur les caractères culturels, biochimiques (fermentation du sucre) et le test positifs de l'oxydase.

Les tests d'identification rapide sont ceux de la biologie moléculaire (PCR). D'autres méthodes rapides d'identification reposent sur: l'immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux anti-méningocoques et les méthodes EIA (immuno-dosage enzyme) ou contre-immunoelectrophorèse (CIE).

On peut aussi utiliser le **sérogroupe** par agglutination, pour des raisons épidémiologiques.

Sensibilité :

Dans le traitement de la méningite, on administre des bêta-lactamines, auxquelles

les méningocoques ont maintenu leur sensibilité. Les céphalosporines de troisième génération (ceftriaxones et céfotaxime) sont préférées au début de la maladie. Cependant, il a été signalé de façon sporadique que certaines souches produisant Bêta-lactamase. Le meropenème est utilisé dans les formes sévères et pendant la méningococcémie. Le chloramphénicol est administré aux personnes allergiques au bêta-lactamines.

La prophylaxie de contact est à la rifampicine (pendant deux jours). En variante, la ceftriaxone ou la ciprofloxacine peuvent être administrées.

Un vaccin efficace extrait des méningocoques a pu être réalisé pour les sérogroupes A et C. En revanche, aucun vaccin n'a été conçu pour le séro groupe B, bien qu'il soit le plus fréquent en Europe.

4. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACILLES À GRAM POSITIF AEROBIES

4.1) Le genre *Corynebacterium* :

Famille : *Actinomycetaceae*

Genre : *Corynebacterium*

Espèce : *C. diphtheriae*

Grande pathogène (donne la diphtérie), bacille Gram positif, non-sporulés, aérobic ou anaérobic facultative, immobile, catalase-positive et aspect caractéristique de lettres majuscules chinoises.

Localisée au niveau de l'arbre respiratoire et la peau, seulement chez l'Homme.

Voie de transmission : aérienne, à courte distance.

Pouvoir pathogène :

La diphtérie est une toxi-infection produite par *Corynebacterium diphtheriae*, qui se manifeste par une lésion à la porte d'entrée: le plus souvent au niveau des amygdales, où elle produit un exsudat fibreux adhérent : «la pseudo-membrane» associé à un phénomène toxique général.

Complication après diffusion au pharynx:

- Asphyxie possible,
- Syndrome toxique
- Prostration
- Paralysie
- Myocardite

Il existe aussi des formes cutanées

Diagnostic bactériologique :

Prélèvement : On prélève les fausses membranes.

Culture:

On ensemence sur gélose sang et sur milieu sélectif au tellurite de potassium (Tindsale et Gundel-Tietz), afin d'éviter la croissance de la flore oropharyngée. C'est une culture rapide de 18 à 20 heures à 37° C. En aérobie ou anaérobie facultative.



Figure 9 : *Corynebacterium* spp. milieu gélose sang.

Examen microscopique :

On observe des bacilles Gram positifs non sporulés, non capsulés et groupés en lettres majuscules.

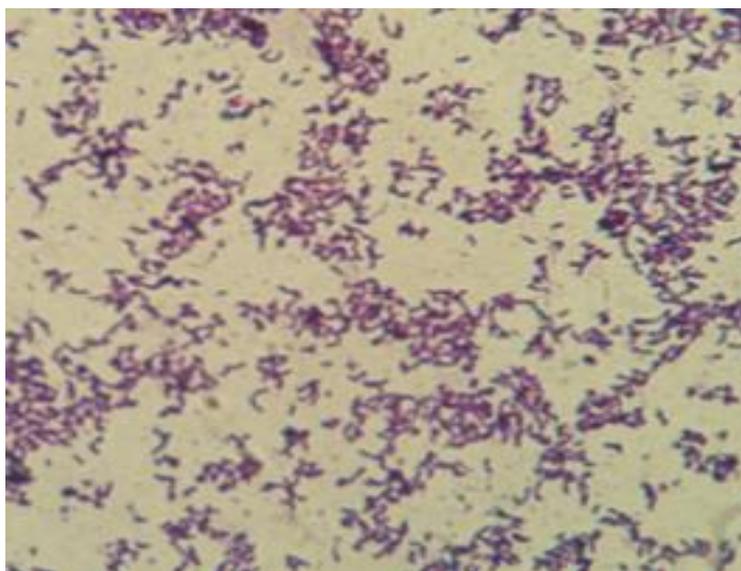


Figure 10 : *Corynebacterium* sp. – Examen microscopique.

Identification :

Sur gélose sang, on note l'apparition de colonies blanches, gris-perlé, certaines sont entourées d'une petite zone d'hémolyse.

Pour la toxine, nous utilisons l'inoculation au cobaye, ou in vitro par test d'Elek. La précipitation en arc confirme le diagnostic.

Sensibilité :

Ont distingué deux types de traitements:

- Curatif: Par une injection de sérum antidiphtérique puis d'antibiotiques (Pénicilline, Vancomycine, Erythromycine) afin d'arrêter la synthèse de toxine.
- Prophylactique: Vaccin avec une anatoxine brute (efficace à 100%) DTcoq, DTP (diphtéro-tétano-pertusis) : tri-vaccination diphtérie et tétanos et toux convulsive.

4.2) Le genre *Listeria*

Les germes du genre *Listeria* sont des bacilles courts à Gram positifs, aérobies, non-sporulés, présentent des flagelles au nombre de 1 à 5, qui leur assurent une mobilité caractéristique « en pirouette ».

Ils sont largement répandus dans la nature.

Signification clinique : Les infections aux germes du genre *Listeria* apparaissent sous forme de cas sporadiques ou d'épidémie.

Les dernières données épidémiques suggèrent que la listériose, toxi-infection alimentaire, est le plus fréquemment transmise par les aliments contaminés comme: le fromage, le lait, les choux, les volailles.

La plus grave forme de listériose est la forme materno-fœtale, qui peut se traduire par une septicémie avec 40-50% de mortalité.

Le diagnostic de laboratoire est bactériologique, mais le diagnostic sérologique a un intérêt dans le contexte épidémiologique.

Prélèvement : en fonction de la forme et de la localisation de l'infection : LCR, sang, liquide amniotique, fragments tissulaires, sécrétions vaginales, respiratoires, aliments, etc.

Isolement: L'ensemencement sur milieu gélose-sang, direct ou enrichi, à partir du produit pathologique, permet de voir des colonies petites, rondes, lisses et translucides.

On peut aussi faire des tests biochimiques: pour la catalase (catalase positif) et l'hémolyse (béta-hémolytique).

L'examen microscopique direct du produit pathologique (LCR) permettrait d'observer des bacilles courts, Gram positifs, avec une mobilité caractéristique. Mais il peut mener à confusion et il est nécessaire de faire un diagnostic différentiel avec les Streptocoques, *Corynebacterium* ou *H.influenzae*. Donc la confirmation par ensemencement sur milieu sélectif est obligatoire.

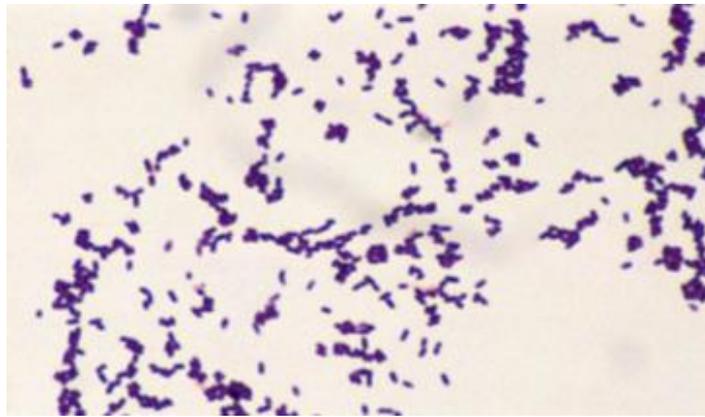


Figure 11 : *Listeria* spp. – Examen microscopique coloration Gram.

Sensibilité in vitro à la Pénicilline, Ampicilline, Gentamicine, Erythromycine, tétracyclines, Rifampicine, Chloramphénicols. On a constaté que la plupart ont seulement une action bactériostatique, on préférera alors une association de deux antibiotiques.

4.3) Le genre *Bacillus*

Famille : *Bacillaceae*

Genre : *Bacillus*

Espèce : *B. anthracis*

Localisation : Germes ubiquitaires très répandus dans la nature (sol, eau) et les animaux (surtout les herbivores). Cette bactérie est fréquente dans les produits laitiers et carnés.

Pouvoir pathogène :

Pour les hommes c'est une pathogène obligatoire (il ne fait pas partie de la flore normale de l'organisme), agent de « l'anthrax » ou « maladie du charbon ».

Transmission : Par blessures cutanées (95%), par inhalation ou par consommation de viande d'un animal contaminé sans traitement thermique suffisant.

Personnes à risque : Les personnes en contact avec les animaux atteints ou leurs produits éleveurs, fermiers, vétérinaire.

Symptômes : Petite vésicule "pustule maligne", escarres nécrotiques noirâtres, septicémie, bronchopneumonie pour la forme respiratoire et pour la forme gastro-intestinale (rare) on note des vomissements, douleurs abdominales, diarrhées sanglantes.

Diagnostic bactériologique :

Prélèvement : Expectorations, vomissement, et biopsie cutanée.

Examen direct : Bacille Gram positif de grande taille, aéro-anaérobie facultatif, capsulés, disposé en chaînes courtes.

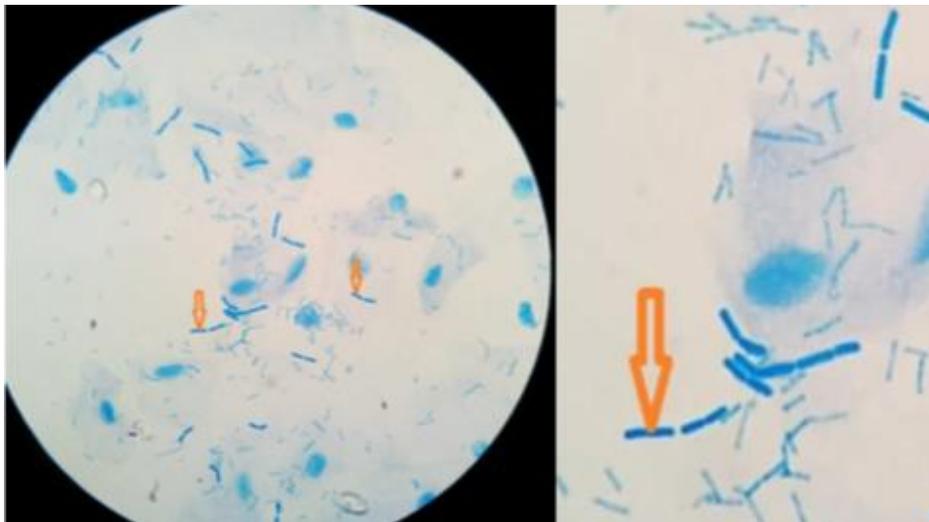


Figure 12 : *Bacillus* spp. – Examen microscopique, coloration avec bleu de méthylène.

Isolement et culture : Sur milieu gélose au sang pendant 24h.

Identification : Sur le milieu de culture, on peut observer des grandes colonies avec des bords irréguliers. Non-hémolytiques, comparées avec une « tête de méduse ».

Sensible : À la Pénicilline, Érythromycine, Gentamicine, Tétracycline et Chloramphénicol.

La vaccination des animaux dans les zones endémiques est utile pour protéger les personnes à risque professionnel augmenté.

5. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES GERMES DE LA FAMILLE DES ENTEROBACTERIACEAE

5.1) Le genre *Salmonella*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : Les salmonelles sont très largement répandues dans la nature, leur réservoir s'étend à tout le règne animal.

On trouve tous les types sérologiques des Salmonelle dans le catalogue de Kaufmann White – Le Minor.

Il existe 5 groupes de Salmonelle :

- Groupe A : *S.paratyphi A*
- Groupe B : *S.paratyphi B*, *S.typhimurium*, *S.heidelberg*, *S. agona*, *S. derby*
- Groupe C : *S.paratyphi C*, *S.concorde*, *S.thompson*, *S.bovismorbificans*, *S. newport*.
- Groupe D : *S.typhi*, *S.enteritidis*
- Groupe E : *S.anatum*, *S.london*

Localisation : Les Salmonelles dites « Salmonelles majeures » sont propres à l'Homme : *S.typhi*, *S.paratyphi A*, *S.paratyphi B*, *S.paratyphi C*.

Les Salmonelles ubiquistes se trouvent principalement chez les animaux (volailles) et peuvent contaminer l'Homme. Elles sont responsables des toxi-infections alimentaires (*S.enteritidis*, *S.typhimurium*).

Pouvoir pathogène :

Grande pathogène.

Le mode de transmission de la bactérie Salmonelle, est dans la majorité des cas, oral. Elle affecte d'abord le tube digestif entraînant un gonflement intestinal qui après complication provoquera une infection par voie sanguine (septicémie) ou par voie lymphatique (fièvre typhoïde).

Comme toutes les bactéries Gram négatif, les salmonelles présentent le **LPS** qui est un des de virulence de ce germe. Le lipide A libérera plusieurs cytokines dont le TNF sera la cause principale du choc septique.

Les salmonelles sont responsables de différentes formes cliniques :

-Les formes digestives :

Les toxi-infections alimentaires suite à la consommation d'aliments contaminés par une salmonelle, cela peut être mortel chez les sujets immunodéprimés.

-La fièvre typhoïde :

Seules les espèces *S.typhi* et *S.paratyphi A, B et C*, peuvent provoquer la fièvre typhoïde.

La fièvre typhoïde commence par une contamination orale. Après 14 jours d'incubation, l'infection commence par une température ascendante et des diarrhées. À la phase d'état apparaît une septicémie avec une fièvre élevée. Il peut y avoir des complications du genre : cardio-vasculaire (collapsus), digestives (hémorragies, perforation).

Les septicémies :

Toutes les salmonelles peuvent entraîner des septicémies.

Diagnostic bactériologique:

Prélèvement : La nature du prélèvement dépend de la localisation de l'infection. Mais avant d'isoler sur un milieu solide, il est obligatoire d'utiliser des milieux enrichis liquides, qui ont pour rôle de favoriser le développement des salmonelles, au détriment de la flore d'association (milieux Muller-Kauffmann et Leifson liquide).

La coproculture : est la méthode utilisée lors de toutes les infections digestives de salmonellose et dans la fièvre typhoïde. C'est la seule méthode permettant de rechercher les porteurs de germes.

L'hémoculture : est positive dans 90% des fièvres typhoïdes débutantes non traitées.

Les Salmonelles sont des bacilles Gram négatifs, presque toujours mobiles, sans disposition particulière.

- Sur gélose simple ou gélose-sang, les colonies sont transparentes.
- Sur milieu SS, les colonies de salmonelles sont semi-transparentes, avec un centre noir et elles produisent du H₂S.
- Sur milieu Mac Conkey, les colonies sont semi-transparentes et lactose-négatives.

Diagnostic indirect :

La recherche des anticorps anti-typho-paratyphique (Sérodiagnostic de Widal et Félix) se fait par **agglutination**.

Identification : En général sur milieu gélose simple ou gélose-sang, apparition de colonies fines, petites et transparentes. L'identification sera faite :

Sur le caractère oxydase-négatif, lactose-négatif, catalase-négatif, par la vérification de la morphologie des germes et par la fermentation des sucres (glucose) et la production de H₂S.

L'identification basée sur des tests biochimiques peut être effectuée sur des galeries manuelles ou des cartes automatiques.

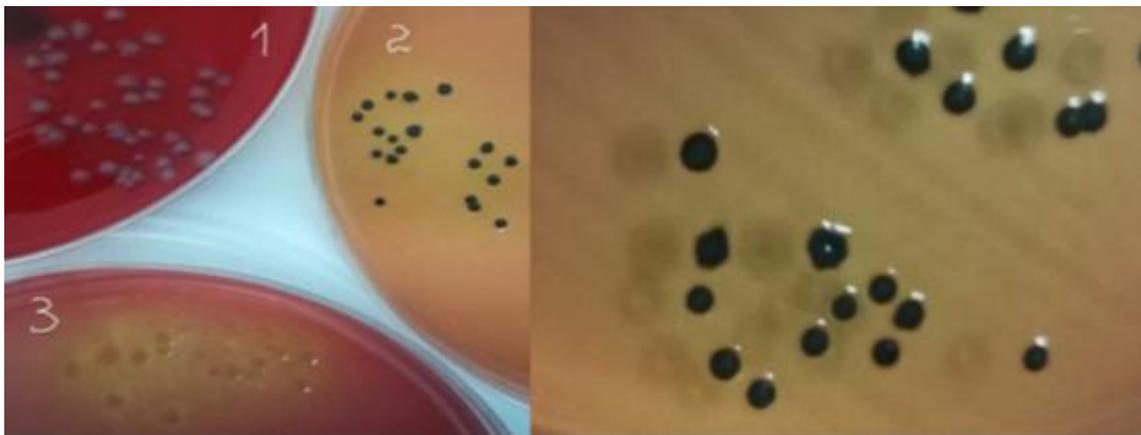


Figure 13 : *Salmonella* spp. : 1. gélose-sang – 2. SS – 3. Mac Conkey

Le groupe et le type de *Salmonella* peuvent être identifiés sur la base de la structure antigénique selon le schéma Kauffman White, chaque espèce ayant la formule antigénique indiquée à base de fractions antigènes somatiques "O" communs (qui sont à la base de la division de salmonelles en groupes, désignés par grosses lettres de l'alphabet) et sur les fractions antigéniques spécifiques au type "H" (la base de la division des groupes en types). Pour identifier une souche, la technique de l'agglutination de la lame est utilisée.

Sensibilité :

Il est essentiel de procéder à un antibiogramme pour déterminer le type d'antibiotique à utiliser en raison des diverses résistances (BLSE) de cette bactérie.

Les antibiotiques les plus efficaces actuellement sont : Chloramphénicol, les fluoroquinolones, les céphalosporines de 3ème génération.

5.2) Le genre *Shigella*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : Le genre *Shigella* comprend des bacilles de petite taille, Gram négatifs, immobiles (ne présentent pas de flagelles), non-sporulés, aérobies/anaérobies facultatives.

Il existe 4 sous-groupes sérologiques de shigella, en se basant sur l'antigène somatique O :

- Groupe A : *Sh.dysenteriae* avec 13 sérotypes (*Sh.shigae*, *Sh.schmitzi*, etc.).
- Groupe B : *Sh.flexneri* avec 6 sérotypes et 2 variantes x, y.
- Groupe C : *Sh.boydii* avec 18 sérotypes.
- Groupe D : *Sh.sonnei* avec 1 sérotype.

Localisation : Les *Shigella* sont des germes très pathogènes, spécifiques du tube digestif chez l'espèce humaine.

Pouvoir pathogène :

Hautement pathogène. Les infections à *Shigella* ont de nombreux facteurs :

- **Le pouvoir invasif :** Les souches au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse colique peuvent provoquer, dans la majorité des cas, des troubles digestifs. Après cette invasion du tractus digestif, les bactéries se multiplient au niveau intracellulaire, causant alors des diarrhées purulentes et sanglantes.
- **La dysenterie bacillaire :** La forme la plus grave est donnée par *Shigella dysenteriae* de type 1 (*Sh.shigae*). Elle cause chez l'espèce humaine une colite infectieuse (avec répercussions épidémiques, voire endémiques), avec une brève période d'incubation d'environ 24h.

Après, apparaît le syndrome dysentérique, avec des glaires muco-sanglantes et des ténésmes, associés à des atteintes neurologiques causées par la shigatoxine. Il faut ajouter à cela une très grave déshydratation.

Il se peut que l'évolution puisse entraîner la mort chez les sujets immunodéprimés.

La shigatoxine est une protéine codée par des gènes chromosomiques et présentant des correspondances structurelles et fonctionnelles avec les toxines « Shiga-like » des *E. coli* entérohémorragiques (ECEH).

Transmission par les matières fécales (maladie des mains sales).

Diagnostic biologique :

Prélèvement : Il se fait par une coproculture où l'on recherche les hématies, les leucocytes qui sont caractéristiques d'un processus invasif.

Isolement : Il se fait lors de la phase aiguë de la maladie et confirme l'évidence clinique, chose qui est difficile lors des infections chroniques. Sur milieux de culture sélectifs ADCL, SS, Mac Conkey et XLD.

Microscopie optique : Les *Shigella* sont des bacilles Gram négatifs, immobiles.

Identification : Apparition de petites colonies fines, aux bords réguliers, convexes et transparentes. L'identification sera faite sur le caractère oxydase négatif, catalase-négatif, lactose-négatif, par la fermentation des sucres (xylose, glucose), et par la vérification de la morphologie des germes. L'identification basée sur des tests biochimiques peut être effectuée sur des galeries manuelles ou des cartes automatiques.

Sensibilité :

Le phénotype sauvage est sensible à tous les antibiotiques actifs sur les entérobactéries.

Toutefois, ces bactéries peuvent acquérir des résistances grâce aux transferts plasmidiques multiples.

5.3) Le genre *Escherichia*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Le genre *Escherichia* inclut beaucoup d'espèces, parmi lesquelles une seule a un réel intérêt médical : *Escherichia coli*.

C'est un bacille Gram négatif, court, non-sporulé, non-capsulé généralement mobile. Il est aérobie/anaérobie facultatif.

Il fait partie de la flore normale de l'intestin chez l'homme, l'animal, représentant 80% de la flore résidente du colon.

Le nouveau-né estensemencé lors de l'accouchement, par contact avec la flore cutanée périnéale maternelle.

Pouvoir pathogène :

Pathogène “opportuniste”.

La bactérie *Escherichia coli* est inoffensive en temps normal, mais dès lors que l'organisme est immunodéprimé, elle devient un redoutable agent pathogène donnant lieu à divers types d'infections:

-Infections urinaires autrement nommées “colibacilloses”: Celles-ci touchent surtout les femmes, en raison de leur anatomie. En effet, chez la femme, l'anus se trouve à proximité des voies urinaires, qui sont donc facilement colonisables par les bactéries. Les infections urinaires basses (cystite, urétrite) peuvent, si elles ne sont pas traitées, évoluer vers une infection urinaire haute, c'est-à-dire touchant le rein, pouvant causer ainsi une pyélonéphrite.

-Septicémies et méningites : Les *Escherichia coli* sont isolées dans 20% des septicémies et représentent 45% des septicémies dues aux bacilles à Gram négatif.

Les méningites sont rares, mais graves et affectent surtout les nourrissons.

-Infections intestinales: On reconnaît 4 types d'*Escherichia coli* donnant lieu à des infections intestinales:

- ***E.coli* entéropathogènes (ECEP)** : Responsables de la gastro-entérite du nourrisson. Elles étaient la cause de nombreuses épidémies, mais se font plus rares de nos jours. Elles sont capables de se fixer aux entérocytes, de supprimer les villosités et de sécréter une toxine létale (vérotoxine) pour certaines cellules.

- ***E.coli* entéro-invasives (ECEI)** : Ressemblent à *Shigella* par leurs caractères biochimiques, antigéniques et par leur pathogénicité. Codées par un plasmide ces bactéries envahissent les cellules du gros intestin et provoquent des réactions inflammatoires donnant parfois lieu à des ulcères.

- ***E.coli* entérotoxinogènes (ECET)**: Elles possèdent des fimbriae (CFA : Colonisation Factor Antigen) leur permettant de se fixer aux entérocytes et de libérer des toxines dérégulant le mécanisme d'excrétion/absorption de ces cellules. Ces bactéries engendrent souvent des diarrhées chez les enfants et les touristes dans les régions chaudes à hygiène déficiente.

- ***E.coli* entérohémorragiques (ECEH)** : Bien qu'elles soient non-invasives, elles causent des diarrhées hémorragiques en produisant de puissantes cytotoxines « Shiga-like », pouvant se compliquer en un syndrome hémolytique-urémique.

Autres infections :

- Cholécystites aiguës ou chroniques.
- Ictères infectieux.
- Péritonites.
- Urétrites.
- Prostatites.
- Salpingites.
- Infections post-chirurgicales (chirurgies coliques).

Voie de transmission : *Escherichia coli* peut se transmettre à l'homme par contact direct avec des personnes infectées, avec des animaux contaminés ou avec l'environnement, contaminé par leurs excréments. Mais également par consommation d'aliments souillés, comme la viande hachée, crue ou mal cuite, le lait cru, les salades et les légumes.

La transmission hospitalière est manu-portée.

Diagnostic bactériologique :

Dans les infections urinaires, le diagnostic bactériologique repose sur la mise en évidence à l'examen microscopique d'une réaction cellulaire de défense contre l'infection (présence de polynucléaires) et en culture d'un nombre élevé d'*E.coli*.

L'uroculture quantitative est la seule méthode permettant d'établir avec certitude le diagnostic d'infection des voies urinaires. Il fait la différence entre une infection des voies urinaires et une contamination avec des germes saprophytes, établissant l'efficacité du traitement anti-infectieux.

L'ensemencement se fait par des poignée bactériologique calibré.

Deux poignées calibrées (l'un de diamètre interne de 5 mm et l'autre de 2,5 mm) sont utilisées donc le volume chargé en urine homogénéisée (non diluée) représente respectivement 0,01 ml et 0,001 ml. La petite poignée est ensemencement sur gelose sang et la grande sur le Mac Conkey. Les boîtes sont incubées à 37 ° C jusqu'au lendemain. Le nombre de germes / ml d'urine est obtenu en multipliant le nombre de colonies par 100 (respectivement 1000) et ensuite la moyenne arithmétique est faite.

Interprétation des résultats:

- $<10^3$ UFC / ml ($<1\ 000$ germes / ml d'urine) est une bactériurie non significative.
- 10^4 (10 000 germes / ml d'urine) contamination possible des voies urinaires inférieures, se recommande de répéter l'uroculture,
- $10^4 - 10^5$ UFC / ml (entre 10 000 - 100 000 germes / ml d'urine), suspicion d'infection urinaire, le résultat est discutable en fonction du contexte et des germes identifiés, l'uroculture peut être répétée,

• ($\geq 10^5$ UFC / ml ($\geq 100\ 000$ germes / ml d'urine), l'infection des voies urinaires est certaine si une seule espèce microbienne est isolée.

NOTE: Le seuil significatif pour une infection urinaire produit par les entérobactéries, *Pseudomonas*, entérocoques est 10^5 UFC / ml, pour les staphylocoques de 5×10^4 UFC / ml et pour *Candida* 10^4 UFC / ml. L'identification de plusieurs espèces microbiennes implique la contamination de l'échantillon et est indiquée répétez l'uroculture.

Dans **les infections locales** autres qu'urinaires (péritonites...), le diagnostic est fait selon les procédés habituels : prélèvement aseptique, examen microscopique pour la recherche d'une réaction inflammatoire et de bacilles à Gram négatif, culture (anaérobie facultative), identification et antibiogramme.

L'isolation des germes à partir des matières fécales (**coproculture**) se fait sur au moins deux milieux : un milieu faiblement sélectif (Mac Conkey) et un milieu modérément sélectif (ADCL ou XLD).

Sur milieu Mac Conkey et ADCL, qui ont un indicateur de pH rouge-neutre (rouge en milieu acide, incolore en milieu basique), *E.coli* présente des colonies rondes, de type S, de couleur rouge et avec un diamètre d'environ 2-3 mm. L'étude de la structure antigénique de ces souches a montré une correspondance entre différents sérotypes et le potentiel pathogène entéral (ECEP, ECEI, ECET, ECEH).

L'identification basée sur des tests biochimiques peut être effectuée sur des galeries manuelles ou des cartes automatiques.



Figure 14 : *E.coli* : culture sur milieu Mac Conkey (lactose-positif).

En microscopie optique : *Escherichia coli* est un bacille à Gram négatif, mobile ou immobile, et possède parfois une capsule. Elle présente des fimbriae qui lui confèrent des propriétés de mobilité, d'adhésion et donc de pathogénicité.

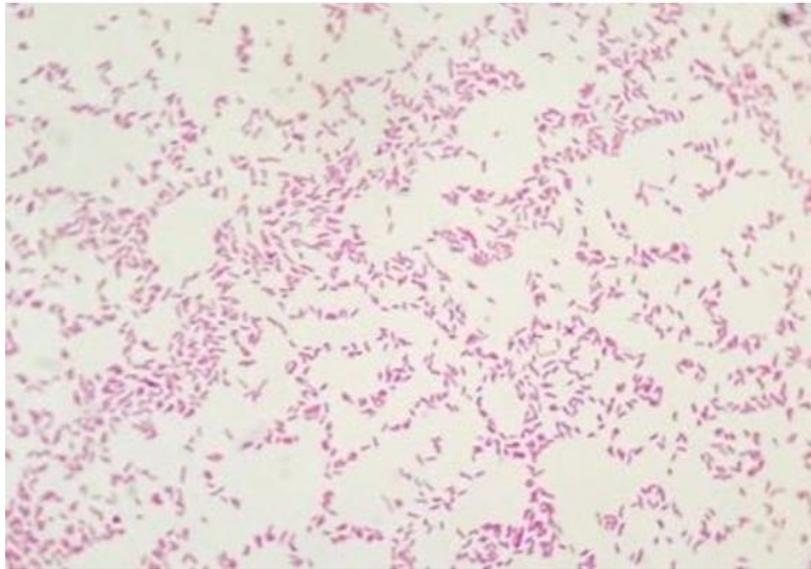


Figure 15 : *E.coli* : Examen microscopique, coloration de Gram

Sensibilité aux antibiotiques:

E.coli est naturellement sensible à la majorité des antibiotiques (bêta-lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones), mais il arrive qu'elles acquièrent des résistances par transfert de plasmides.

En fonction de leur résistance naturel aux bêta-lactamine ont été décrites:

- un phénotype sécréteur de **pénicillinase** (avec résistance aux amino et carboxi pénicillines),
- un phénotype sécréteur de **céphalosporinase** (avec résistance aux amoxi/clavulanat et céphalosporines des générations I, II),
- un phénotype sécréteur de **bêta-lactamases à large spectre** (BLSE) (résistance aux pénicillines, céphalosporines des générations I à IV, étant sensibles aux carbapénèmes). En milieu hospitalier, *E.coli* BLSE peut être répandu fréquemment, ce qui rend aléatoire le succès des thérapies à de nombreuses bêta-lactamines, y compris les Céphalosporines de troisième génération.
- un phénotype producteur de **carbapénémase** (avec résistance aux carbapénèmes: imipenème, méropénème, étant sensibles aux antibiotiques de réserve par exemple colistin).

5.4) Le genre *Klebsiella*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : Le genre *Klebsiella* comprend des bacilles à Gram négatifs, courts, immobiles, capsulés, disposés en diplo dans le sens de la longueur et aérobie facultative.

Localisation : Au niveau de la flore intestinale et muqueuses des voies respiratoires de l'homme et des animaux.

Pouvoir pathogène :

Pathogène "opportuniste"

On reconnaît 7 types de *Klebsiella* dont 4 jouent un rôle important dans la pathologie humaine : *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *K.ozenae*, *K.rhinoscleromatis*.

Voie de transmission : Les bactéries *Klebsiella* peuvent être transmises par contact cutané avec des objets ou des surfaces contaminés.

La possibilité d'une transmission fécale a également été avancée. La bactérie *K.rhinoscleromatis* peut être transmise par sécrétions aéroportées (contact prolongé). Aussi, la bactérie *K.granulomatis* est transmise sexuellement.

Les *Klebsiella* présentent une capsule leur offrant une résistance à la phagocytose, ainsi qu'une endotoxine thermostable mise en évidence dans les selles des enfants atteints par l'entérite.

K.pneumoniae : Est l'espèce la plus fréquemment isolée du genre, et est souvent la cause d'infections nosocomiales chez les personnes immunodéprimées et âgées. Elle cause également des infections respiratoires basses, des plaies chirurgicales, des voies urinaires ou une bactériémie.

K.oxytoca : Diffère de la bactérie précédente seulement par la production d'indole, mais elles sont toutes les deux impliquées dans des infections similaires.

K.rhinoscleromatis (associée au rhinosclérome) : Est caractérisée par une rhinite chronique hypertrophique avec des lésions granulomateuses.

K.ozenae (associée à l'Ozène) : Cause des maladies inflammatoires chroniques avec des suppurations muqueuses et fétides et accompagnées d'une atrophie de la muqueuse nasale, qui peut donner lieu à une perte de l'odorat.

Diagnostic bactériologique :

Le prélèvement se fait principalement dans les voies respiratoires (échantillons naso-pharyngés) et dans les voies urinaires, mais peut se faire également dans les voies génitales et dans le sang (en fonction de la localisation de l'infection).

Après **isolement** de la bactérie sur milieu gélose sang, des colonies apparaissent rondes, bombées, d'aspect muqueux, en 18 heures d'incubation et à 37°C. Les colonies sont lactose positif sur les milieux utilisés pour les entérobactéries qui contiennent du lactose (Istrati-Meitert), mais deviennent lactose négatif après 24 heures. C'est le phénomène de « caméléonage » qui peut aussi s'observer sur milieu Mac Conkey.

L'identification basée sur des tests biochimiques peut être effectuée sur des galeries manuelles ou des cartes automatiques.

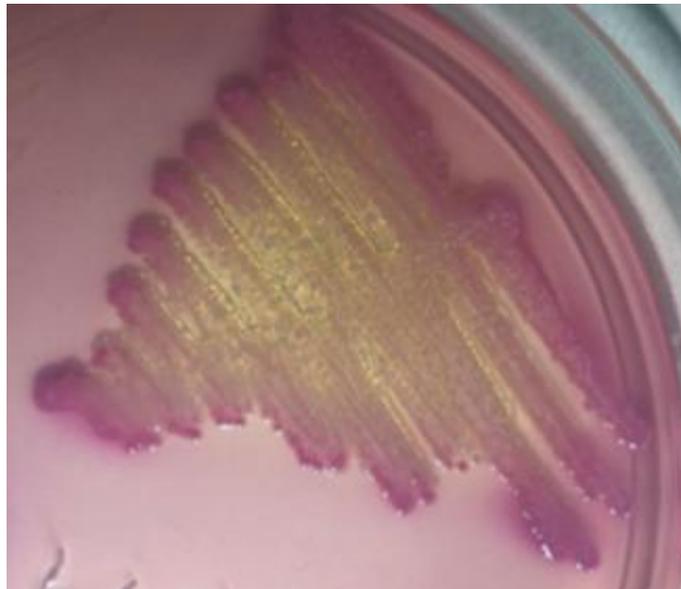


Figure 16 : *Klebsiella* spp. : milieu Mac Conkey - phénomène de « caméléonage ».

En microscopie optique, *Klebsiella* est un bacille à Gram négatif, disposé en courtes chainettes (ou diplo dans le sens de la longueur), immobile, et possède une capsule.

Sensibilité aux antibiotiques:

Le phénotype sauvage est caractérisé par un faible niveau de résistance à: amino et carboxi-penicilines (activité restaurée par les inhibiteurs de bêta-lactamase), chloramphénicol, tetracycline, streptomycine, biseptol.

Le phénotype producteur de bêta-lactamase montre une résistance augmentée à: amino, carboxi et ureido-penicilines (y compris à l'association avec les inhibiteurs de bêta-lactamases) et céphalosporines de première génération.

Les autres phénotypes de résistance sont similaires à ceux décrits dans *E. coli*. Les souches hospitalières sont généralement multirésistantes aux antibiotiques. Pour la sélection des patients colonisés avec des souches BLSE, un milieu sélectif chromogène de type gélose BLSE peut être utilisé, et pour les souches producteur de **carbapénémase**, la gélose CRE.

5.5) Le genre *Proteus*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Localisation : *Proteus* est une bactérie commensale du tube digestif chez les humains et les animaux.

En général très répandue dans la nature, surtout où il existe de la matière organique en décomposition (sol, eau, viande altérée), étant donné qu'elle participe aux processus de putréfaction.

C'est un bacille Gram négatif, court, très mobile, non-sporulé, non-capsulé, sans disposition particulière, aérobie et anaérobie-facultatif.

Pouvoir pathogène :

Il existe 8 espèces de *Proteus*, mais seulement 3 espèces ont une importance médicale:

- *Proteus vulgaris*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus penneri*

Elles sont toutes les trois responsables d'infections urinaires et de plaies cutanées.

Pathogène "opportuniste", on rencontre également la bactérie *Protéus* dans :

- Les pathologies de l'oreille moyenne
- La mastoïdite pouvant être dans certains cas à l'origine de surdité
- Les septicémies

- La méningite
- La survenue d'abcès cérébral
- Infections respiratoires

La pathogénicité vient de la multiplication et la production d'endotoxines.

Voie de transmission : Les bactéries du genre *Proteus* peuvent causer des infections lorsqu'elles quittent l'intestin. Elles peuvent aussi être transmises par des cathéters contaminés (notamment par des sondes urinaires) cependant, leur mode de transmission spécifique n'a pas encore été déterminé.

Diagnostic bactériologique :

On effectue des prélèvements en fonction de l'infection : urine, exsudat de plaies, sang, et aussi de liquide céphalo-rachidien.

- Après isolement de la bactérie sur bouillon, celle-ci forme un film de surface et dégage une odeur désagréable de putréfaction, elle est donc facile à reconnaître.
- Sur gélose sang, on observe un phénomène d'invasion, en forme d'ondes concentriques, les souches différentes ne se mélangent pas et va apparaître la ligne de délimitation de Diènes.
- Sur gélose inclinée, on observe le phénomène d'escalade.
- Sur milieu sélectif lactosé, *Proteus* se développe sous la forme de colonies lactose-négatives et de couleur noire au centre. Les germes lactose-négatifs produisent de l'hydrogène sulfuré (H_2S), uréase et FAD (phénylalaninedésaminase).



Figure 17 : *Proteus* sp. : Phénomène de la ligne de Diènes – milieu gélose-sang.

En microscopie optique les *Proteus* sont des bacilles aérobies à Gram négatif, courtes aux extrémités arrondies, mobiles, non sporulées et non capsulées.

On peut aussi chercher les antigènes somatiques O et les antigènes flagellaires H. Les sérotypes de *Proteus* OX2, OX19, OXK présentent des parentés antigéniques avec les Rickettsies.

Sensibilité aux antibiotiques:

L'antibiogramme est obligatoire pour chaque souche isolée. Les espèces du genre *Proteus* sont généralement sensibles aux céphalosporines, aux Aminoglycosides et à l'Imipénem (Béta-lactamines) à large spectre.

Les phénotypes de résistance sont similaires à ceux décrits dans *E. coli*. Malheureusement, la colistine ne peut être administrée dans le traitement des infections causées par des souches multi-résistantes, car ils sont naturellement résistants à la colistine.

6. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES BACILLES À GRAM NÉGATIF, NON-FERMENTATIFS

6.1) *Pseudomonas aeruginosa*

Famille : *Pseudomonadaceae*

Genre : *Pseudomonas*, qui comprend des bacilles à Gram négatifs, strictement aérobies, non-fermentatifs, non-sporulés et sans disposition caractéristique. Ils sont mobiles, oxydase-positifs, lactose-négatifs et ne fermentent pas la glucose.

Ces germes représentent le pourcentage le plus élevé de non-fermentatifs isolés en laboratoire. Ils possèdent d'importants facteurs structurels et des toxines qui augmentent leur virulence.

Localisation : *P.aeruginosa*, aussi appelé « Bacille Pyocyanique », se trouve dans l'environnement (sol, eau, terre), dans les hôpitaux au niveau des endroits humides (pots de fleurs, équipements de respiration artificielle, etc.).

Le portage permanent humain (téguments, intestins) est d'environ 6% chez les personnes saines, 38% chez les personnes hospitalisées pour une période plus longue et 78% chez les personnes immunodéficientes.

Pouvoir pathogène :

P.aeruginosa est le germe pathogène "opportuniste" par excellence, produisant des infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter, car il a à disposition une grande variété de facteurs de virulence (fimbriae, exopolysaccharides, lipopolysaccharide, elastase, protéase, phospholipase C, glycolipide, exotoxine A, exoenzyme S).

Il peut être impliqué dans des infections pulmonaires chez les sujets atteints de :

- Fibrose kystique, pneumonies chroniques, qui évoluent souvent vers la destruction totale des poumons,
- Chez les patients immunodéprimés, il peut occasionner septicémies mortelles, mais aussi des bronchopneumonies bilatérales typiques avec la formation des micro-abcès et nécrose tissulaire,
- Endocardite, dans le cas de prises des drogues par voie intraveineuse,
- Infection de la cornée, de l'oreille (infection du canal externe de l'oreille, otite moyenne chronique),
- Infections des brûlures, des plaies chirurgicales (risque de bactériémie),
- Infections gastro-intestinales, des voies urinaires, méningites, etc.

Voie de transmission: Introduction accidentelle dans un organe ou contamination de la peau ou des muqueuses par les mains et objets du personnel soignant. Il peut aussi être transmis par la ventilation, les produits de nettoyage, etc.

Diagnostic bactériologique: Le diagnostic pour les infections au bacille pyocyanique est bactériologique. Isolement à partir d'un produit pathologique. Cependant, en dehors d'un contexte clinique correspondant, il n'est pas obligatoirement impliqué comme agent causal d'une infection. Donc il faut faire attention: si dans l'exsudat pharyngien d'un patient qui suit un traitement antibiotique, l'on isole *P.aeruginosa*, il serait une erreur de lui ajouter un traitement antibiotique supplémentaire, contre ce germe. Il a pu s'installer suite à la sélection produite par l'antibiothérapie antérieure, et se développer à cause du manque de flore normale concurrente.

Prélèvement : en fonction de la localisation de l'infection.

Isolement:

Le bacille peut être isolé sur des milieux de culture habituels: gélose simple ou gélose sang. Mais le milieu se choisit en fonction du produit récolté :

- Les produits normalement stériles s'ensemencent sur gélose-sang,
- Le sang pour l'hémoculture sera ensemencé dans un flacon dont la composition favorise le développement de germes aérobies,
- Les matières fécales s'ensemencent sur milieux sélectifs.

Incubation en aérobie et à 42°C.

Identification : L'identification est basée sur des caractères morphologiques, culturels, la réaction de l'oxydase est positive, la croissance à 37-42°C.

- Sur gélose simple, on notera la présence de pigments caractéristiques en fonction des souches: Piocianine (bleu), Pioverdine (vert), Piorubine (rouge), Piomélanine (noir). La culture a d'habitude une odeur de fleurs d'acacia.
- Sur gélose-sang, les colonies sont grandes, grises, hémolytique et peut parfois avoir un éclat métallique, qui représente les zones d'autolyse.
- Sur les milieux lactosés, les colonies sont lactose-négatives.

L'identification des souches achromogènes est basée sur les tests biochimiques. Il y en a un sur le marché grande variété de kits disponibles permettant l'identification basée sur des tests biochimiques:

- manuel: API 20NE (Biomérieux),
- Automatique: spectrométrie de masse Vitek2 GN, MicroScan, ou MALDITOF.

Examen microscopique: On observe des bacilles à Gram négatif, non-sporulés, non-capsulés, avec un flagelle polaire, mobiles et peuvent être isolés, en paire ou en courtes chaînes.

La différenciation avec d'autres espèces se base sur les caractères biochimiques.

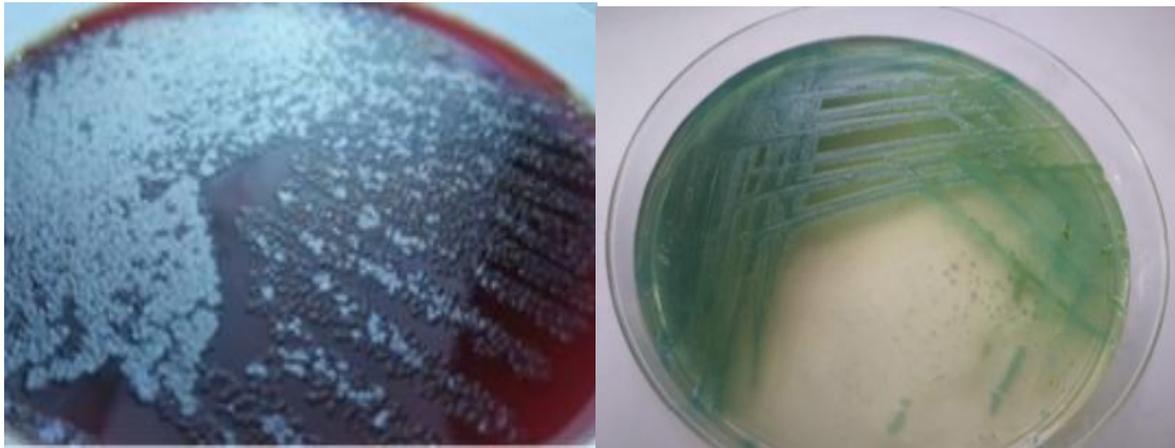


Figure 18 : *P.aeruginosa* : culture sur gélose-sang « éclat métallique » ; culture sur milieu CHROMagar UTI, production d'un pigment vert.

Sensibilité : *Pseudomonas aeruginosa* est redouté pour sa multi-résistance. La réalisation de l'antibiogramme est donc indispensable.

Les antibiotiques actifs anti-*Pseudomonas* sont:

- pénicillines antipseudomonas (ticarcilline, pipéracilline),
- carbapenemes: Imipenem, Méropenem,
- céphalosporines de III-ème génération (cefoperazone, ceftazidim).
- céphalosporines de IV-ème génération (cefepime, cefpirome).
- aztreonam.

P.aeruginosa est naturellement résistant aux Amino-pénicillines, à l'association Amoxicilline avec Acide Clavulanique et aux Céphalosporines de première et deuxième générations.

De plus en plus d'hôpitaux à travers le monde ont commencé à signaler une augmentation alarmante de la prévalence souches résistantes au carbapénème. Pour ces souches, la colistine semble être l'antibiotique réserve.

La résistance acquise aux bêta-lactamines est liée à des gènes plasmidiques, transposables, de type pénicillinase. Pour les Aminosides la résistance est liée à des phénomènes d'imperméabilité, de mutation de la cible ribosomale ou de l'inactivation enzymatique. Pour les Fluoroquinolones, c'est la Ciprofloxacine qui présente la meilleure activité actuellement. Dans les infections graves on associe un Aminoglycoside avec une bêta-lactamine.

6.2) *Acinetobacter baumannii*

Le Genre *Acinetobacter* comprend des bacilles Gram négatifs de forme coccique, bacillaire ou encore coco-bacillaire, aérobies et oxydase-négatifs.

Les germes de ce genre sont immobiles, fréquemment encapsulés, et se développent bien sur la majorité des milieux de culture.

Localisation: Ils sont largement répandus dans la nature (sol, eau, lait, aliments) et dans le milieu hospitalier (ventilation, humidificateurs, cathéters).

A.baumannii est le représentant typique du genre. Les infections causées par cette espèce sont associées à une mortalité et une morbidité élevées, du fait que sa virulence et sa résistance sont relativement hautes, en comparaison avec d'autres espèces.

Signification clinique : Les problèmes engendrés par *Acinetobacter*, dans le milieu hospitalier, sont rencontrés chez les patients en état critique, dans les unités de thérapie intensives, et en particulier chez les patients avec des lésions cutanées ou des brûlures étendues (polytraumatismes). Il produit 1 à 3% de toutes les infections nosocomiales.

On peut retrouver *Acinetobacter* dans les pneumonies, infections des tissus mous, des plaies, de l'œil, du tract urinaire, péritonites et méningites secondaires à des septicémies.

Diagnostic bactériologique : De la même façon que pour le bacille pyocyanique, un simple isolement à partir d'un produit pathologique peut suffire, et sans contexte clinique correspondant, il n'est pas forcément impliqué en tant qu'agent causal d'une infection.

Le prélèvement du produit pathologique se fait en fonction de la localisation de l'infection : expectorations, pus, urine, sang, LCR.

L'examen direct du produit a une valeur indicative seulement si le produit récolté est théoriquement stérile. Sur les préparations de Gram, on va observer des PMN et la présence de bacilles ou coco-bacilles à Gram négatifs.

L'isolement peut se faire sur tous les milieux car c'est un germe sans grandes exigences nutritives, avec des possibilités métaboliques illimités.

La majorité des souches d'*Acinetobacter* peuvent être facilement cultivées sur des milieux simples, formant des colonies lisses, avec un diamètre d'environ 2mm, pouvant être pigmenté en jaune pâle, voire gris. L'incubation se fait à 37°C.

L'identification se fait grâce aux caractères culturels.

Les colonies du genre *Acinetobacter* sont de type S, mucoides, 1-2mm de diamètre, la plupart du temps sans pigment, sinon jaune-gris.

Réaction oxydase-négative, ne fermentent pas le glucose, catalase-positifs et lactose-négatif.

Pour la différenciation des espèces, l'identification se fait sur caractères culturels et biochimiques. Pour confirmation, des produits commerciaux tels que les systèmes automatiques microtest - API et Vitek sont utilisés, lesquels permettent une identification basée sur des tests biochimiques ou par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Sensibilité : *Acinetobacter* est sensible à la aminoglycosides et céphalosporines de troisième et quatrième génération.

En revanche, les germes sont résistants aux pénicillines et aux céphalosporines de première et deuxième génération.

Les infections à *A.baumannii* sont souvent sévères et difficiles à traiter, du fait du taux élevé de résistances aux principales classes d'antibiotiques.

Le type multi-résistant (MDR) présente une résistance à plus de deux classes d'antibiotiques sur les 5 suivantes :

- céphalosporines (ceftazidime ou cefepime),
- carbapénèmes (imipénèm ou meropenem),
- ampicilin/sulbactam,
- fluoroquinolone (ciproflaxine ou levoflaxine),
- aminoglycosides (gentamycine, tobramycine ou amikacine).

Les souches extensiv-résistant (XDR) conserve la sensibilité à la Colistine, qui est l'antibiotique de réserve.

Les souches pan-résistant, (PDR) sont résistant à toutes les classes d'antibiotique. Ils sont particulièrement isolés des sections soins intensifs.

7. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES INFECTIONS AVEC D'AUTRES TYPES DE BACILLES À GRAM NÉGATIFS, AÉROBIES

7.1) Le genre *Campylobacter*

Pathogènes, microaérophiles « peuvent vivre dans des conditions d'anaérobiose ».

Famille: *Campylobacteriaceae*

Genre : *Campylobacter*, il comprend 17 espèces, dont la plus importante en pathologie : *Campylobacter jejuni*.

D'un point de vue morphologique, les germes du genre *Campylobacter* sont des bacilles à Gram négatif, non-sporulés, de forme spiralée, incurvés ou en forme de lettre « S ». Ils ont un seul flagelle polaire à une des deux extrémités, ce qui leur confère une mobilité caractéristique.

Ce sont des microorganismes microaérophiles, certaines espèces peuvent se développer même dans des conditions aérobies ou même anaérobies.

Localisation: Les infections à *Campylobacter* sont en réalité des zoonoses. La maladie peut prendre un caractère professionnel.

Pouvoir pathogène :

Les infections les plus courantes causées par *C.jejuni* sont les gastro-entérites avec: maux de tête, fièvre, douleurs abdominales, diarrhées parfois sanglantes (surtout dans le secteur pédiatrique).

Peut causer des infections extraentérales, des septicémies chez les personnes qui présentent un déficit immunitaire, causées par *C.fetus*.

C.jejuni est considéré la cause du syndrome de Guillain-Barré (SGB) : Paralysie du système nerveux périphérique.

Voie de transmission :

- Les excréments d'animaux ou des malades qui peuvent contaminer l'eau, le sol et les légumes,
- Les aliments provenant d'animaux malades (lait non pasteurisé, viande insuffisamment cuite),

Nosocomial :

- Contact interpersonnel (le partage des toilettes),
- Par l'accouchement, de la mère à l'enfant,
- Transfusions sanguines,
- Transmission sexuelle.

Diagnostic bactériologique : Le diagnostic est bactériologique et sérologique

Prélèvement : On récolte les matières fécales (le plus souvent), les vomissements, plus rarement le sang, mais on peut aussi prélever des produits alimentaires (viande).

Isolement:

Les espèces du genre *Campylobacter* ont des exigences de culture particulières et nécessitent des conditions spéciales. L'incubation se fait toujours en micro-aérophilie (85% N, 5% O₂ et 10% CO₂) 48-72 heures à une température optimale de 42 °C ou 37°C, selon les espèces.

L'étalement de *Campylobacter* peut se faire sur des milieux nutritifs enrichis, comme par exemple : bouillon Brucella, milieu Preston et milieu Park-Sanders.

Il peut se faire sur milieu non-sélectif gélose-chocolat, utilisé en coproculture, et il peut se faire sur milieu sélectif, utilisant des antibiotiques, de type Skirrow (agar, sang de cheval, antibiotiques) ou Karmali.

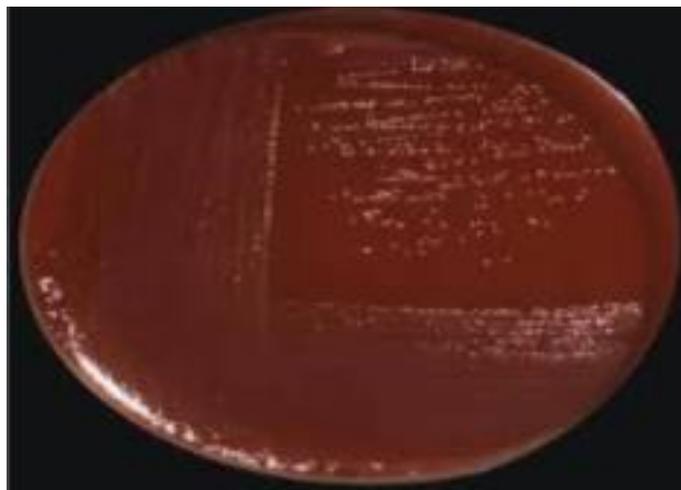


Figure 19 : *Campylobacter* spp. : Culture

Examen microscopique :

On observe des bacilles à Gram négatifs, non-sporulés de forme spiralée ou recourbée en forme de la lettre S. Elles ont un seul flagelle polaire et sont reconnaissables grâce à leur aspect en « ailes de mouette ». On peut aussi utiliser un microscope à fond sombre ou à contraste de phase.

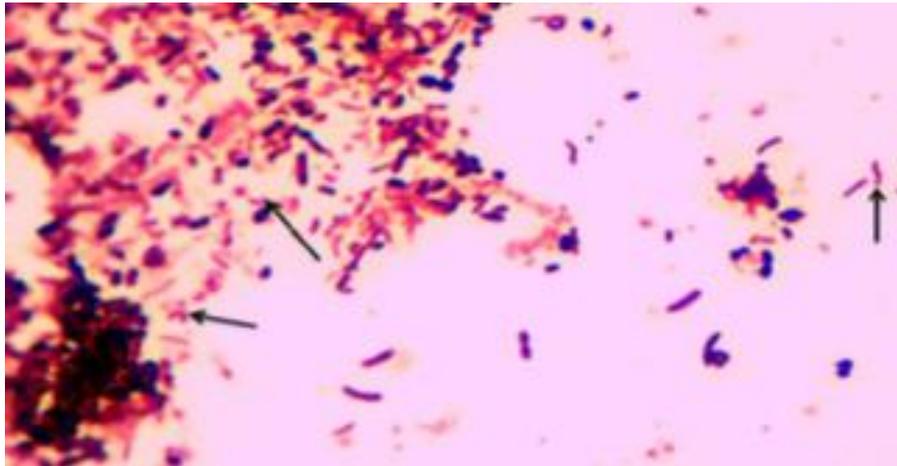


Figure 20 : *Campylobacter* spp. : Examen microscopique

Identification: Se fait en fonction des caractéristiques morphologiques et culturelles. Catalase et oxydase-positive, micro-aérophile, ne produit pas d'uréase. L'identification des caractères biochimiques peut se faire à l'aide d'une galerie biochimique de type API-CAMPY ou test rapide d'identification d'antigènes à partir des matières fécales.

Le diagnostic sérologique se fait par la mise en évidence d'un niveau élevé d'anticorps anti-*Campylobacter*. La réaction de fixation du complément chez *Campylobacter fetus* et immunoenzyme (EIA) pour *Campylobacter jejuni*, met en évidence une augmentation du niveau d'anticorps anti-*Campylobacter* et indique généralement une infection récente ou en cours. L'antigène majeur du genre est le lipopolysaccharide et l'hétérogénéité sérologique de *C.jejuni* est déterminée par plus de 90 antigènes somatiques polysaccharidiques O et 50 antigènes capsulaires K et flagellaires H.

Sensibilité :

Campylobacter est sensible à : Érythromycine, Tétracyclines, Chloramphénicol, Nitrofurantoïne, Aminosides, Clindamycine.

L'antibiotique de choix pour une gastro-entérite est l'Érythromycine.

L'antibiogramme est recommandé.

7.2) *Helicobacter pylori*

Famille : *Helicobacteraceae*

Genre : *Helicobacter*.

Ces germes ressemblent d'un point de vue morphologique, aux germes du genre *Campylobacter*. Ce sont des bactéries à Gram négatif, incurvés ou spiralés, présentant 4 à 6 flagelles sur l'un des pôles de la bactérie.

Helicobacter pylori est l'espèce caractéristique du genre, associée aux gastrites, ulcères gastriques et carcinomes gastriques.

Localisation: Cette espèce vit exclusivement dans la muqueuse gastrique de l'homme.

Pouvoir pathogène :

Helicobacter pylori produit une protéase lui conférant des propriétés d'altération de la muqueuse gastrique, ce qui empêche l'acide gastrique de se répandre correctement. Elle produit également une uréase, lui permettant de survivre facilement dans l'environnement très acide de l'estomac, cette enzyme sécrétée transforme l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone.

L'ammoniac étant toxique pour les cellules épithéliales, elle va, avec l'aide d'autres enzymes (protéase, catalase...), endommager la surface des cellules épithéliales, enclenchant de ce fait le processus de formation d'ulcères.

Helicobacter pylori cause plusieurs maladies plus ou moins graves selon les individus :

- Une dyspepsie non ulcéreuse,
- Des ulcères gastriques et/ou duodénaux,
- Des gastrites chroniques,
- Une malabsorption de la vitamine B12,
- Des cancers (cancer de l'estomac, adénocarcinome...).

Helicobacter serait l'un des principaux facteurs de risque du cancer gastrique.

Dans l'organisme, les germes peuvent persister pendant des mois, ou même toute la vie. Les individus infectés développent une réponse immunitaire de longue durée.

Voie de transmission :

La transmission est essentiellement interhumaine, par voie féco-orale ou oro-oral, la contamination se fait par un contact direct avec la salive infectée par des régurgitations ou lors des vomissements.

La transmission par les selles, suite à un contact par l'intermédiaire des mains ou encore à cause de l'eau et d'aliments contaminés, est plus rare et se rencontre plutôt dans les pays en voie de développement où l'hygiène est déficiente.

Diagnostic bactériologique :

Il met en jeu des méthodes invasives et non-invasives.

Les méthodes invasives de diagnostic reposent sur l'obtention de biopsies gastriques, obtenues par fibroscopie.

- **Examen histologique:** Il consiste à détecter des bactéries spiralées qui se forment en surface après coloration par Hématoxyline-Éosine-Safran (HES) ou Giemsa.

- **Culture :** Elle nécessite des conditions particulières de transport de la biopsie et un broyage. Elle est effectuée sur un milieu enrichi, contenant des antibiotiques et maintenu 7 jours à 37°C en atmosphère micro-aérobie. L'identification de *H.pylori* est basée sur des tests biochimiques (oxydase-positif, catalase-positif, uréase-positifs). Elle permet l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

- **Test à l'uréase :** C'est un test spécial pour cette bactérie. Il est basé sur la production abondante d'uréase par *H.pylori*. Une biopsie, où ces bactéries sont présentes, est mise dans un milieu contenant de l'urée. Elles vont l'hydrolyser en libérant de l'ammoniaque, ce qui augmente le pH et fait virer un indicateur en une heure.

- **Microscopie optique :** Les *Helicobacter* sont des mobiles à Gram négatif, elles ont une forme spiralée et possèdent 4 à 6 flagelles situés à l'un de ses pôles.

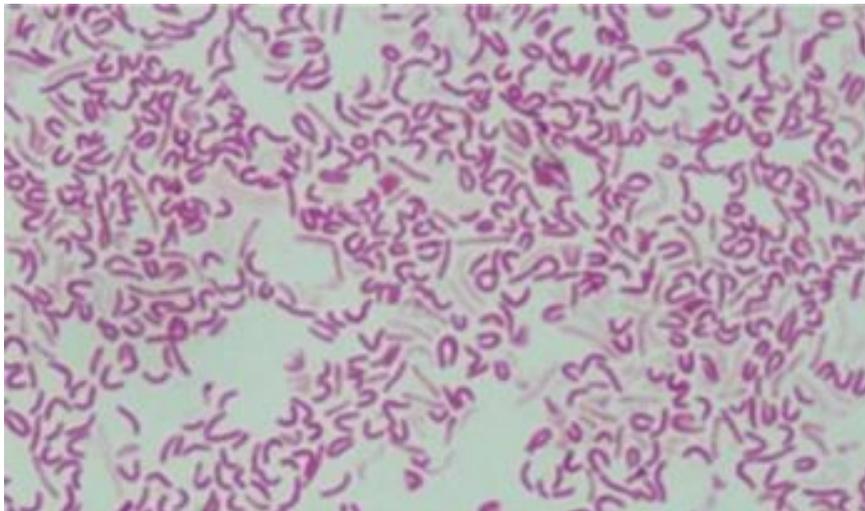


Figure 21 : *H.pylori* : Examen microscopique, coloration de Gram.

Les méthodes non invasives sont les suivantes:

H. pylori peut également être diagnostiqué par des réactions antigène-anticorps:

- **Identification des anticorps anti-*H. pylori*** dans les sérums des patients. Il est le plus couramment utilisé ayant des dosages immuno-chromatographiques ou

immunoenzymatiques rapides sont disponibles. Le résultat négatif exclut l'infection et le positif ne montre pas si l'infection est récente.

- **Identification des antigènes de *H. pylori*** dans les fèces par des tests immunochromatographiques rapides ou par PCR.

- **Le test respiratoire à l'urée:** Le test consiste à faire ingérer au patient une solution d'urée marquée au carbone radioactif.

Si la bactérie est présente, l'urée est transformée en ammoniac et gaz carbonique radio-marqué. Ce dernier passe alors dans le sang et est éliminé dans l'air expiré.

Deux prélèvements d'air sont effectués (il faut expirer fortement dans un récipient approprié) :

- Le premier après avoir bu la moitié de la solution préparée,

- Le second, 30 minutes après avoir bu la seconde moitié de la préparation.

-**PCR :** Identification des antigènes d'*H.pylori* dans les matières fécales.

Sensibilité aux antibiotiques:

Le traitement consiste à éradiquer la bactérie avec la « triple thérapie ». Pour cela, on associe deux antibiotiques actifs: Amoxicilline et Tétracycline (ou Clarithromycine, qui est un macrolide) et un anti-acide afin d'inhiber la pompe à protons : Oméprazole.

Helicobacter pylori présente une résistance naturelle à Cefsulodin (Céphalosporine de troisième génération), à l'acide Nalidixique, Sulfonamide, Trimetoprim, Vancomycine.

7.3) Le Genre *Haemophilus*

Le genre *Haemophilus* comprend des bactéries à Gram négatifs, avec une morphologie variée, du cocobacille au filament (on retiendra la forme cocobacille). Anaérobie facultatif, immobile, non-sporulé et encapsulé lorsqu'ils sont isolés d'infections invasives.

Les germes de ce genre nécessitent une attention particulière pour la mise en culture : nécessitent le facteur X (hémine) et le facteur V (NAD), présents dans le sang (c'est de là que vient le nom du genre).

Localisation : C'est une bactérie isolée à partir des voies respiratoires supérieures chez l'homme. Les souches non-encapsulées sont commensales de la sphère ORL.

La capsule est le facteur de virulence le plus important, sur la base du polysaccharide capsulaire, on distingue 6 sérotypes de *H.influenzae* (a-f).

Signification clinique : *Haemophilus influenzae* est l'un des principaux agents étiologiques des méningites chez l'enfant : 93%, appartenant au biotype I et au sérotype capsulaire b (qui cause les infections les plus invasives). Il se peut qu'une infection évolue rapidement en laryngo-trachéite obstructive, nécessitant une intubation chez l'enfant, voire une trachéotomie. La transmission est par voie respiratoire.

Le diagnostic de *Haemophilus* est bactériologique.

Diagnostic bactériologique :

Le prélèvement se fait en fonction de la localisation de l'infection (sang, LCR, pus, sécrétion conjonctivale, auriculaire, aspiration trachéo-bronchique). Il est nécessaire de transporter immédiatement le sang et le LCR.

Isolement : Le LCR s'ensemence sur un milieu qui contient des facteurs de croissance X et V. On recommande un ensemencement du produit sur un milieu gélose-chocolat et en parallèle sur un milieu gélose sang, sur lequel il y a une souche de *S.aureus*, qui va produire le facteur V et favoriser la croissance de la souche de *Haemophilus* : c'est phénomène de « satellitisme ».

Pour d'autres produits pathologiques on peut utiliser un milieu gélose-chocolat. Les colonies sont de type S ou M et leur diamètre double de 24 à 48h, comparées à des gouttes de rosée. Elles ne sont pas hémolytiques.

Certains prélèvements n'étant pas stériles on peut utiliser des milieux semi-sélectifs (avec Vancomycine). Incubation à 35-37°C avec 5-10% CO₂.

L'examen direct : le LCR doit être rapidement centrifugé et le sédiment observé au microscope après coloration de Gram. On observera des germes gram négatifs, pléomorphes: bacilles courts, longs ou filamenteux.



Figure 22 : *H.influenzae* : Examen microscopique

Identification : Le phénomène de satellitisme (croissance autour des colonies de *Staphylocoques*) est un test préliminaire d'identification.

Pour l'identification de *Haemophilus*, il faut utiliser des disques de facteur X, V et XV et observer le développement des bactéries autour de ces disques :

- *H.influenzae* croît autour du disques XV.
- *H.parahaemolyticus* et *H.parainfluenza*, autour des disques V et XV.
- *H.ducreyi* croît autour des disques X et XV.

D'autres méthodes d'identification se basent sur des caractères biochimiques, la production d'indole, d'uréase.

On peut aussi chercher la structure antigénique pour les espèces encapsulées de *H.influenzae*, qui se divise en 6 sérotypes (a, b, c, d, e, f). Cela se fait par réaction d'agglutination sur lame.

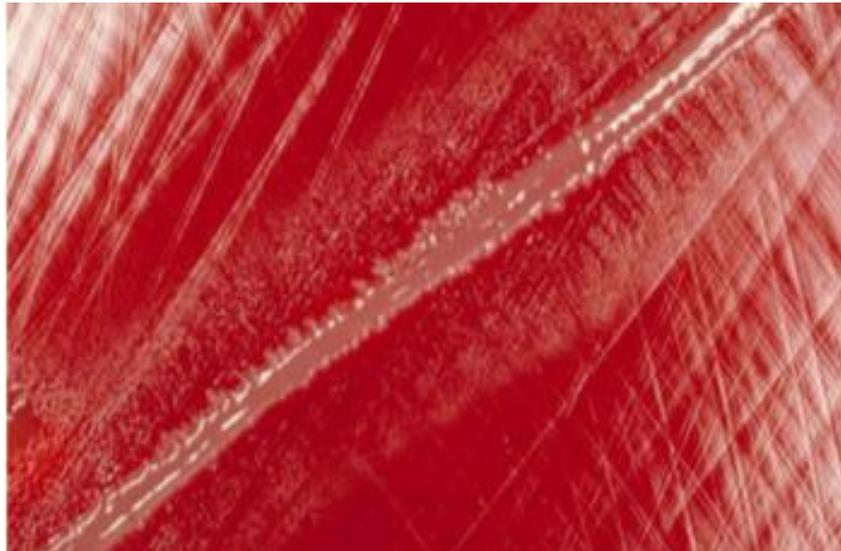


Figure 23 : *H.influenzae* : phénomène de satellitisme sur milieu gélose-sang.

Le diagnostic sérologique par méthode RIA ou ELISA. Cela permet aussi de vérifier l'apparition d'une réponse immune à la suite d'une vaccination.

Sensibilité : Il faut faire un antibiogramme, sur un milieu spécial HTM (*Haemophilus* Test Medium) les germes étant naturellement sensibles à l'Ampicilline, Chloramphénicol, Sulfonamide, Tétracyclines et Céphalosporines.

D'autres espèces d'*Haemophilus* :

- *H. aegyptius* peut être la cause d'une conjonctivite purulente (les yeux sont de couleur rose) et de la fièvre purpurique brésilienne,
- *H. aphrophilus* peut causer des endocardites et des pneumonies,
- *H. ducreyi* est l'agent étiologique d'une infection sexuellement transmissible, le chancre mou, plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes,
- *H. haemolyticus* a rarement été isolé à partir d'infections des voies respiratoires chez les enfants,
- *H. parainfluenzae* est isolé occasionnellement dans le cas des endocardites et urétrites.

8. LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE POUR LES INFECTIONS PODUITES PAR DES GERMES ANAÉROBIES

Les bactéries strictement anaérobies sont des microorganismes qui se développent en l'absence d'oxygène. Ces bactéries utilisent comme source exclusive d'énergie la fermentation.

Si la fermentation se produit en présence d'oxygène, il se forme des radicaux superoxydes très toxiques. Les bactéries strictement anaérobies, à l'inverse des bactéries aérobies, n'ont pas de superoxyde dismutase (qui transforme le radical superoxyde en eau oxygénée) et de catalase (qui décompose l'eau oxygénée en peroxyde d'hydrogène).

Ces bactéries ont un rôle important dans le maintien de l'équilibre écologique de la flore normale. Elles sont aussi impliquées dans l'étiologie de quelques infections.

La connaissance des bactéries anaérobies qui colonisent différents systèmes de l'organisme est essentielle, car la majorité des infections à germes anaérobies sont d'origine endogène, avec des bactéries qui font partie de la flore normale de l'organisme.

8.1) *Clostridium botulinum*

Hautement pathogène.

Genre : *Clostridium*

Espèce : *botulinum*

Localisation: Diverse (le sol, les intestins d'animaux, fruits, légumes et l'Homme).

Signification clinique : C'est un bacille Gram positif, anaérobie, sporulé.

Il est l'agent pathogène impliqué dans le botulisme, une intoxication alimentaire fatale, produite par l'ingestion d'aliments qui contiennent la toxine botulique (conserves de légumes, de poisson ou de viande).

La toxine est thermolabile mais résiste à l'action des sucs gastriques, arrive au niveau de l'intestin, puis entre dans la circulation générale, par voie lymphatique. Elle agit sur le système nerveux en bloquant la libération d'acétylcholine au niveau des synapses neuromusculaires. Il se produit alors la paralysie flasque de la musculature jusqu'à la paralysie des muscles respiratoires.

La pathogénicité chez l'homme n'est pas due à la bactérie elle-même, mais plutôt à sa toxine. L'intoxication survient après 18 heures de l'ingestion, causant des paralysies bilatérales et symétriques des muscles bucco-pharyngés et dysphagie. Cela étant accompagné de nausées, vomissements, constipation avec une température normale (en cas d'absence de surinfection).

Voie de transmission : Contamination par les aliments infectés.

Diagnostic de laboratoire : Il a pour rôle de confirmer le diagnostic clinique et de mettre en évidence la toxine botulique dans le sérum, matières fécales, contenu gastrique, mais aussi dans les aliments.

En microscopie optique on voit des bacilles Gram positif, avec des extrémités arrondies. Le clostridium est mobile et le spore lui confère une thermorésistance.

Sensibilité: (traitement)

Il est fait en service de réanimation, par l'injection d'antitoxine:

- Sérothérapie polyvalente puis monovalente.
- Insulinothérapie en un point différent de l'organisme.
- Traitement symptomatique: Réanimation (anti-cholinestérasique)

8.2) Clostridium tetani

Hautement pathogène.

Genre : *Clostridium*

Espèce : *tetani*

Localisation: Dans le sol, sous forme sporulée ou dans l'hôte, au niveau du tube digestif.

Signification clinique: *C.tetani* est germe non invasif, les spores restent au niveau de la porte d'entrée (blessures, brûlures...)

Après une incubation de 5 à 6 jours de diffusion de toxine, surviennent les contractures, la fièvre et complications respiratoires, voire l'asphyxie.

La toxine est composée de 2 éléments :

- Tétanolysine : hémolytique, nécrosante et cardiotoxique.
- Tétanospasmine: Fixation au niveau du cerveau et de la moelle épinière, bloquant les inhibiteurs des synapses des motoneurones.

Tous les mammifères sont sensibles au tétanos.

Voie de transmission : Par les traumatismes cutanés.

Diagnostic de laboratoire : Il a surtout pour vocation de confirmer le diagnostic clinique. Nous trouvons rarement les bacilles au niveau du point d'inoculation. La toxine peut être transformé en anatoxine par chauffage ou formalisation

En microscopie optique on voit des bacilles à Gram positif, strictement anaérobie. Elles sont mobiles, sporulées donnant aux bacilles un aspect de clou ou de baguette.

Sensibilité (traitement):

Utilisation de sérum anti-tétanique, anatoxine, Pénicilline G

Traitement préventif: Le vaccin DTP (dyphtro-tetano-pertusis) ou le DT coq. Le triple vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la toux convulsive. Il doit être administré par 3 injections cutanées à un mois d'intervalle entre elles. Il faut un rappel une année après, puis tous les 7 ans. Le vaccin est obligatoire.

8.3) *Clostridium difficile*

C'est un bacille Gram Positif, anaérobie, (sporulé et toxigène lorsque pathogène)

Localisation : Flore commensale.

Signification clinique : Il est l'agent étiologique des maladies diarrhéiques associées aux antibiothérapies. Il fait partie de la flore normale intestinale chez la personne saine ou chez le patient hospitalisé, produisant dans certaines conditions des infections du tractus digestif (bénignes ou graves). Il peut contaminer le milieu hospitalier et causer des épidémies nosocomiales.

Les facteurs de risque pour un infection à *C.difficile* sont : hospitalisations, les traitements prolongés avec des antibiotiques à spectre large, les interventions chirurgicales sur le tractus digestif, les affections du colon et rénales, la déficience immune, les chimiothérapies, l'âge avancé, etc.

L'infection se manifeste par des diarrhées aqueuses (plus de 15 par jour) pouvant être sanglantes ou purulentes, douleurs abdominales, diminution de l'appétit, du poids corporel, et fièvre.

Transmission : Il existe une possibilité de transmission interhumaine.

Diagnostic bactériologique :

Prélèvement : Matières fécales pour une coproculture (si les selles sont diarrhéiques)

Isolation : Sur milieu hautement sélectif, de type CCFA (Cycloserine-Cefoxitine-Fructos-Agar), incubation 48h.

Sur milieu chromogène de type ChromID, *C.difficile* forme des colonies noires et se développent en 24h.

L'identification se fait sur les caractères culturels, morpho-tinctoriaux et olfactifs. La confirmation de l'espèce se fait avec des tests biochimiques.

La détection des cytotoxines est réalisée par des tests de cytotoxicité in vitro sur des cultures cellulaires plus spécifique) ou la détection d'entérotoxine par des tests immunologiques, par des tests VIDAS®C difficile Toxine A & B (bioMérieux), test de type ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay). Pour la détection de la colonisation, il est recommandé de réaliser les tests de diagnostic combinés, qui ont une sensibilité maximale.

Sensibilité : Dans les infections sévères la thérapie spécifique consiste en l'administration de Métronidazole ou de Vancomycine. Pour le traitement de la forme bénigne, l'interruption de l'antibiothérapie est suffisante.

9. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES GERMES DU GENRE *MYCOBACTERIUM*

Famille : *Mycobacteriaceae*

Genre : *Mycobacterium*

Le genre *Mycobacterium* comprend des bacilles avec une forme filamenteuse, ils sont immobiles, peut être intracellulaire (macrophage), non-sporulés, non-capsulés, strictement aérobies.

La paroi cellulaire est formée principalement de lipides, raison pour laquelle les mycobactéries sont résistantes à une série d'antiseptiques et ne se colorent pas en Gram (mais en coloration Ziehl-Neelsen).

Une fois colorées, les bactéries ne peuvent plus être décolorées à l'alcool ou aux acides, c'est pour cela qu'on les qualifie de Bacilles-Alcool-Acido-résistants (BAAR).

Il existe plusieurs types de *Mycobacterium* :

-*Mycobacterium tuberculosis* (Bacille de Koch, BK), agent de la tuberculose

-*Mycobacterium afrikanum*

-*Mycobacterium bovis*

-*Mycobacterium leprae*

-*Mycobacterium avium*

***Mycobacterium bovis* :**

Agent de la tuberculose bovine se transmet à l'Homme après avoir bu du lait de vache contaminé. Le pouvoir pathogène est identique à celui du BK.

***Mycobacterium leprae* :**

Le responsable de la maladie de Hansen, ou la lèpre, qui est une infection granuleuse chronique humaine, infectant les tissus superficiels (la peau, les nerfs périphériques)

9.1) *Mycobacterium tuberculosis*

Grand pathogène.

Localisation :

La *Mycobacterium tuberculosis* est une bactérie pathogène propre à l'homme. Elle est transmise par voie aérienne en résistant au froid.

Pouvoir pathogène :

Le bacille de Koch est l'agent de la tuberculose.

C'est une maladie qui atteint principalement l'arbre respiratoire, elle peut aussi être extra-respiratoire dans les ganglions, les méninges, les articulations et les zones uro-génitales.

La forme contagieuse de la tuberculose est la forme pulmonaire cavitaire, les autres sont peu ou pas contagieuses.

La primo-infection peut évoluer:

- En guérison complète et spontanée après une période exsudative, malgré la présence d'un nombre important de bacilles et polynucléaires.
- En formation de tubercule qui se termine par une guérison lente par fibrose.
- En ramollissement du caséum et la formation d'une caverne avec multiplication bactérienne. Ce cas est défavorable.

De plus, la dissémination dans l'organisme peut causer la méningite et des infections uro-génitales.

Diagnostic biologique :

Il se réalise seulement dans un laboratoire de référence, avec un niveau 2 ou 3 de biosécurité.

Prélèvement : Pour les formes pulmonaires on prélève les crachats par expectoration. On recueille aussi les mucosités bronchiques par fibroscopie. Pour les formes non pulmonaires on prélève le LCR, le liquide pleural et le liquide articulaire, l'urine, fragments de ganglions, etc.

Culture : *Mycobacterium tuberculosis* est un bacille à croissance très lente qui dure de 2 à 6 semaines et sa culture nécessite des milieux spéciaux. Le milieu le plus utilisé est celui de Löwenstein-Jensen.

Examen microscopique : Les frottis seront colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen. Ce sont des bacilles aérobies, immobiles, non-sporulés, non-capsulés et disposés en amas ou en palissade irrégulière.

La technique de coloration Ziehl-Neelsen:

- le frottis sec et fixé est recouvert de 3-4 ml de fuxine;
- la lame est chauffée jusqu'à ce que les vapeurs soient émises, 3-4 fois en 5 minutes;
- le colorant est éliminé par lavage à l'eau du robinet à jet bas;

- la décoloration deux minutes faite par le couverture de la lame avec une solution d'acide chlorhydrique 3%;
- laver la lame à l'eau: le frottis doit rester presque incolore ou tout au plus avec une légère teinte rose;
- la lame est re-colorée avec une solution de bleu de méthylène à 1% pendant une minute.
- la lame est soigneusement lavée et séchée à la température ambiante

Le frottis est examiné au microscope avec l'objectif à immersion pendant au moins 10 minutes. Les bacilles se présentent sous forme de minces bâtons rouges, incurvés, disposés sous forme de piles ou généralement appariés en angle, rarement isolés, sur le fond bleu de champ microscopique. Le résultat sera exprimé en BAAR. Un résultat négatif ne peut être donné qu'après avoir examiné au moins 100 champs microscopiques (selon le nombre les bacilles visualisés sont notés BAAR +, ++, +++, etc.).

Les bacilles peuvent également être visualisés par examen microscopique à la lumière UV, en utilisant la technique coloration à froid avec un mélange d'auramine-rhodamine. Les bacilles apparaîtront fluorescents à l'arrière-plan noir de la préparation.

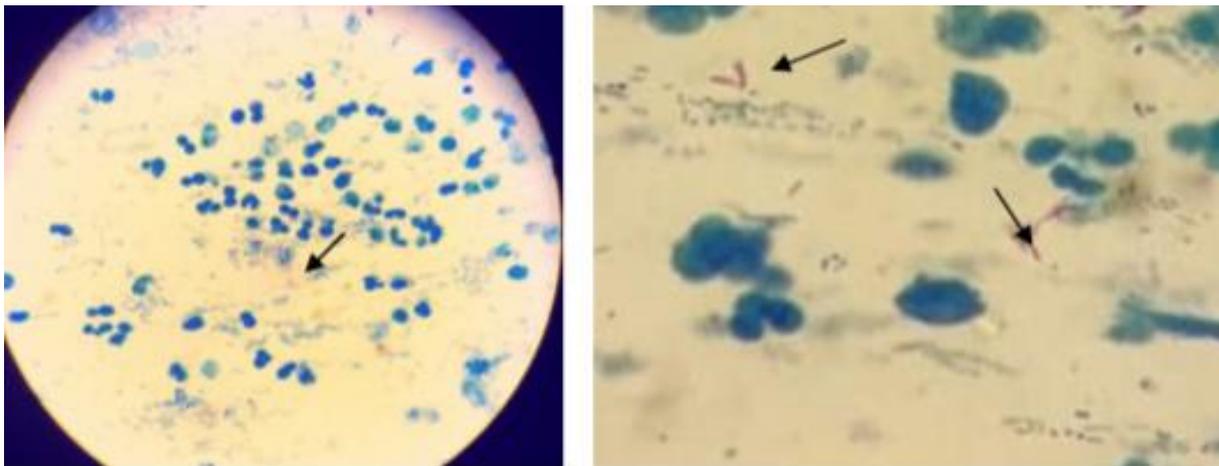


Figure 24 : *M.tuberculosis* : Examen microscopique, coloration Ziehl-Nielsen.

Identification :

Les colonies apparaissent après 2 à 4 semaines et sont blanc-ivoire, rugueuses et adhérentes au milieu. Elles grossissent lentement pour atteindre 3 à 4 mm après 2 à 3 mois. Elles ont alors un aspect de chou-fleur.

Il est maintenant possible de **diagnostiquer rapidement et précisément** les infections à *M. tuberculosis* en culture sur milieu liquide (Middlebrook), utilisé dans les systèmes de culture automatique Bactec, BacT / ALERT, et plus récemment chez nous, VersaTREK. Il y a aussi la possibilité d'identification par les tests de biologie moléculaire PCR, ou par tests rapides utilisés pour le dépistage (sur le système Xpert MTB / RIF).

Sensibilité :

- Traitement prophylactique :

Ce traitement consiste à l'injection du vaccin BCG (Bacille Calmette et Guérin) par voie intradermique.

- Traitement chimio-prophylactique :

Isoniazide pendant 6 mois

- Traitement curatif :

Étant donné que, dans chaque population microbienne, il existe des souches résistantes qui survivront au traitement, dans l'infection tuberculeuse, plusieurs chimiothérapies sont administrées en association, pour prévenir la survie de ces souches. Le bacille tuberculeux est sensible à l'isoniazide (INH), au pyrazinamide (PZA), à la rifampicine (RMP), éthambutol (EMB), streptomycine, éthionamide, etc. Actuellement, le traitement de la tuberculose est normalisé selon certains programmes nationaux.

En pratique, le traitement dure de 6 à 9 mois :

-Traitement de 6 mois : 2 premiers mois (INH, RMP, EMB, PZA) et 4 mois (INH, RMP).

-Traitement de 9 mois : 2 premiers mois (INH, RMP, EMB) et 7 mois (INH, RMP).

10. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES INFECTIONS PRODUITES PAR DES BACTÉRIES SPIRALÉES

10.1) *Treponema pallidum*

Famille : *Spirochaetaceae*

Genre : *Treponema*

Une partie des espèces de ce genre appartiennent à la flore normale de la muqueuse des voies respiratoires supérieures et de la muqueuse génitale chez l'espèce humaine.

Localisation : Seulement humaine.

Pouvoir pathogène :

Hautement pathogène, agent de la Syphilis : maladie vénérienne chez l'adulte, mais peut aussi se transmettre par le placenta de la mère au fœtus.

On distingue trois étapes :

- La Syphilis primaire : apparaît 15 jours après le contact infectant, se manifeste par l'apparition d'un chancre, sur la muqueuse génitale.
- La Syphilis secondaire : 45 jours après l'apparition du chancre, se développent des lésions sur les téguments et les muqueuses : « roséoles syphilitiques ».
- Syphilis tertiaire : qui apparaît après une période de latence, d'une à trente années, se manifeste par des lésions destructives au niveau du SNC, appareil circulatoire et divers organes.

Transmission : Maladie seulement humaine, à transmission habituellement horizontale, au cours des rapports sexuels, et de répartition mondiale.

Diagnostic bactériologique/serologique : Le diagnostic est direct (microscopie) ou indirect (le dosage des anticorps anti-Tréponème).

Prélèvement : Au niveau de toutes ulcérations ou érosions génitales ou anales. La recherche directe des tréponèmes se fait uniquement dans la sérosité prélevée sur les lésions primaires et secondaires.

Les prélèvements se font au niveau du chancre syphilitique, plus exceptionnellement, par ponction du ganglion lymphatique associé à la phase primaire et au niveau des plaques muqueuses à la phase secondaire.

Examen microscopique:

C'est une bactérie à Gram négatif, anaérobie ou micro-aérophile, non enveloppés et non sporulés, mais peut être examiné par des techniques autres que la coloration de Gram :

- L'examen direct de la sécrétion d'ulcération, sur une préparation native entre la lame et la lame, au microscope avec un contraste de phase ou un microscope à fond sombre. Les tréponèmes apparaîtront lumineux sur le fond sombre de la préparation, effectuant divers mouvements caractéristiques de rotation du corps, de flexion, rotation, anté-flexion, etc. Le nombre de tréponèmes dépend du stade de la lésion et peut varier entre 1 et 50 / champ. Dans les conditions d'un examen correct, les chances de diagnostic sont de 95%.
- Les frottis fixes et colorés. Parmi les méthodes de coloration nous mentionnons:
 - Fontana - Tribondeau à base d'imprégnation à l'argent et dans lequel les tréponèmes apparaissent en noir sur un fond jaune. En général, il est plus souvent utilisé dans la coloration de préparations anatomo-pathologiques préparées lors de la nécropsie,
 - Giemsa étendue, dans laquelle les spirochètes apparaissent rose pâle (morphologie fine, filiforme spiralée, hélicoïdales),
 - immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine, qui est la méthode la plus spécifique d'examen direct.

La culture de tréponèmes pathogènes n'est pas possible.

La maladie expérimentale peut être pratiquée, mais pas habituellement, en inoculant le matériel récolté par voie intratesticulaire chez le lapin qui donnera une orchite tréponémique servant de réservoir de tréponème.

Diagnostic sérologique

Bien que la réponse immunitaire lors de la syphilis soit très complexe, le diagnostic sérologique représente la méthode de choix dans le diagnostic de la syphilis. Il est effectué aux trois étapes de l'évolution de la syphilis. Il existe 2 types de tests:

- non spécifique (avec rôle de dépistage)
- et spécifique (test de confirmation), avec une sensibilité plus faible dans la syphilis primaire, mais une sensibilité de 100% dans le secondaire.



Figure 25 : *T.pallidum*, examen microscopique avec coloration Fontana-Tribondeau (coloration spéciale sur base d'imprégnation argentique)

Diagnostic sérologique :

Indirect, il représente la meilleure méthode pour le diagnostic de la syphilis. Il existe des tests non-spécifiques et des tests spécifiques :

- Les tests non spécifiques: VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) et RPR (Rapid Plasma Reagin)

Mesure les anticorps Ig G et Ig M formés contre les lipides libérés par les cellules endommagées pendant le premier stade de la maladie et présent à la surface des tréponèmes. L'antigène utilisé pour ces tests est la cardiolipine. Les tests les plus couramment utilisés sont VDRL et RPR. Les deux mesurent la floculation de la cardiolipine en présence d'anticorps sériques du patient, sont rapides et efficaces

est positif tôt. C'est positif 4 à 6 semaines après l'infection, c'est-à-dire une à deux semaines après le début de l'ulcération.

- Les Tests spécifiques : TIT (Test d'immobilisation de tréponèmes), FTA-ABS (fluorescent antibody absorption), TPHA (Test d'hémagglutination passive), EIA (Enzyme immunoassay) et Western Blot IgM

Détecte les anticorps spécifiques aux antigènes tréponémiques. Les antigènes utilisés dans ces tests proviennent de spirochètes isolés de lésions testiculaires du lapin. Ils sont utilisés pour confirmer les résultats positifs du VDRL ou du RPR. Les tests spécifiques peuvent être positifs avant des tests non spécifiques ou rester positifs chez les patients atteints de syphilis tertiaire, pour lesquels les tests non spécifiques étaient négatifs. Il est également effectué sur des personnes avec sérologie négative à tests non spécifiques, mais avec des éléments épidémiologiques et cliniques préconisant la syphilis.

Sensibilité : Aux bêta-lactamines (pénicilline G), aux Tétracyclines et Doxyciline (si allergique à la Pénicilline G), aux Macrolides, mais il sont résistants aux Aminosides.

L'antibiotique de choix pour le traitement de la syphilis est la pénicilline. La sécrétion de beta-lactamase n'a pas été trouvée dans les souches de *T. pallidum*.

10.2) *Borrelia*

Famille : *Spirochaetaceae*

Genre : Les Spirochètes du genre *Borrelia* sont des bactéries à Gram négatif, spiralées (3-20 spirales, larges), grandes, mobiles (flagellées), non-capsulée, non-sporulées, avec une croissance lentes et de hautes exigences nutritives.

De plus, elles sont anaérobies ou micro-aérophiles.

Localisation: Essentiellement chez l'animal (mammifères, oiseaux, arthropodes).

Pouvoir pathogène : Les espèces du genre *Borrelia* sont responsables de deux maladies importantes : La borréliose de Lyme et la fièvre récurrente.

Voie de transmission : La fièvre récurrente est déterminée par *Borrelia recurrentis* et est transmise par les poux.

La maladie de Lyme (maladie de l'érythème migrant) est causée par *Borrelia burgdorferi* et est transmise par les tiques du genre Ixodes.

Diagnostic bactériologique : Le diagnostic est uniquement direct

Prélèvement : Examen direct à partir des maladies et de leurs lésions est possible, mais difficile. Le germe a pu être isolé sur des lésions cutanées, le sang, le LCR et le liquide articulaire

L'isolation peut se faire in vivo, en particulier sur les Arthropodes vecteurs. In vivo, on a réussi à cultiver *B.recurrentis* sur des milieux complexes (Kelly, Dodge) et *B.burgdorferi* sur milieu Kelly modifié). Les bactéries se développent en microaérophilie à un pH de 7,2 et à la température de 28-30°C. La croissance est lente : 2 à 3 semaines.

Examen microscopique : C'est la méthode de diagnostic la plus sensible pour la fièvre récurrente, les germes seront observés au cours de l'épisode fébrile et sur frottis de sang périphérique (coloration Giemsa ou Wright).

Pour la maladie de Lyme, on analysera le sédiment du LCR et le frottis sanguin en coloration acridine orange, Giemsa ou immunofluorescence directe.

Identification : On observe de longues (5-25µm) spirochètes spiralées avec 3 à 20 tours, elles sont flexibles, très mobiles, avec des mouvements de translation et de rotation. Les extrémités sont effilées.

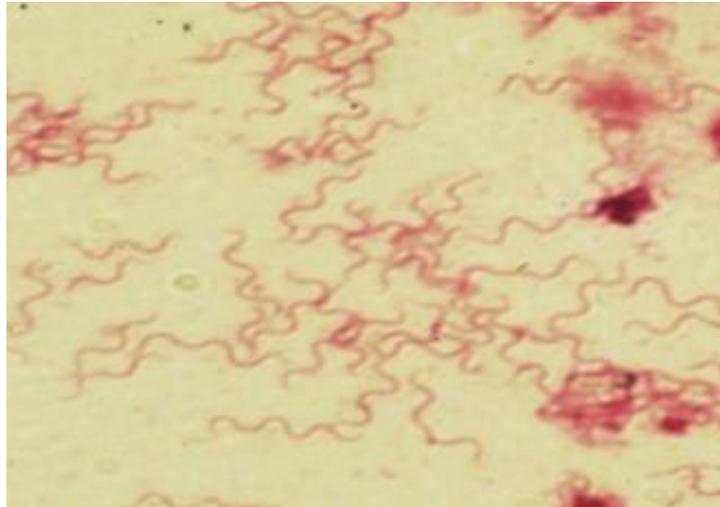


Figure 26 : *B.burgdorferi* – Examen microscopique coloration Fontana-Tribondeau

Diagnostic sérologique :

La valeur du diagnostic sérologique est réduite, du fait de fréquentes mutations antigéniques dans une même souche durant l'infection à *Borrelia recurrentis*.

Dans le cas de la Borreliose de Lyme, les tests sérologiques sont très importants pour la confirmation du diagnostic clinique. Ils détectent les anticorps spécifiques anti-Borrelia de type IgM et IgG.

On procède à un test EIA (Enzyme ImmunoAssay) ou IFA, si le résultat est positif, on doit confirmer la suspicion de la maladie par un test Western Blot.

Sensibilité :

Dans le cas de la fièvre récurrente, la Doxyciline est l'antibiotique de choix, mais est à éviter chez la femme enceinte et le jeune enfant. On préférera alors l'Erythromycine.

Dans le cas de la maladie de Lyme : Aminopénicilline (Ampicilline, Amoxicilline) ou des Cyclines (Minocycline, Doxycycline) et dans le stade tardif de la maladie: Ceftriaxone.

11. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES MYCOPLASMES

11.1) *Mycoplasma* spp.

Les Mycoplasmes constituent un groupe particulier de bactéries, encadrées dans la classe des *Mollicutes* et dans la famille *Mycoplasmataceae*.

Cette famille comprend 69 espèces de *Mycoplasma* et 2 espèces de *Ureaplasma*.

Ce sont des bactéries ubiquitaires étant isolées chez l'homme, les animaux, les insectes, les plantes, le sol, l'eau, etc.

- *Mycoplasma pneumoniae* : mycoplasme respiratoire ayant un fort pouvoir pathogène. Ne fait pas partie de la flore normale chez l'homme,
- *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* sont des mycoplasmes génitaux.
- Les espèces *Mycoplasma fermentans* et *Mycoplasma penetrans* ont été récemment trouvées chez des personnes atteintes de SIDA, mais leur rôle n'est pas encore bien défini.

Localisation : Les Mycoplasmes sont des bactéries commensales de l'humain et des animaux. Elles colonisent la surface muqueuse du tractus respiratoire ou génital, les yeux, les glandes mammaires et les articulations.

Le pouvoir pathogène des Mycoplasmes dépend de chaque espèce. Les infections sont dans 30 à 70% des cas asymptomatiques.

Mycoplasma pneumoniae: Cause majeure de pneumonies atypiques primaires.

- Infections respiratoires aiguës (bronchites),
- Infections ORL,
- Lésions cutanées,
- Manifestations hématologiques, neurologiques, cardiaques, pancréatiques, articulaires.

Mycoplasma hominis :

- Salpingites
- Vaginites
- Abscesses des glandes de Bartholin

Ureaplasma urealyticum:

- Urétrites
- Cervicites

Les Mycoplasmes génitaux provoquent des chorio-amniotites, des endométrites, des fièvres postpartum/postabortum et des infections néonatales.

Ces agents colonisent le vagin des femmes qui ont des contacts avec beaucoup de partenaires.

Voie de transmission : La transmission des Mycoplasmes est interhumaine et dépend de chaque espèce. *Mycoplasma pneumoniae* se transmet par contact prolongé avec des gouttelettes aéroportées provenant de personnes infectées par cette bactérie.

La transmission des Mycoplasmes génitaux a, quant à elle, lieu lors des relations sexuelles.

Diagnostic biologique :

Il se base sur l'identification de mycoplasmes à partir d'un produit biologique, et la mise en évidence d'un taux d'anticorps spécifiques dans le sérum.

Le prélèvement dépend de la localisation de l'infection (exsudat pharyngien, expectorations, sécrétions vaginales, cervicales, urétrales, urine, etc.)

Le diagnostic pour les Mycoplasmes génitaux est direct, par observation des cultures effectuées à partir d'un prélèvement vaginal ou urétral.

Le diagnostic pour *Mycoplasma pneumoniae* se fait par la mise en évidence du germe dans les prélèvements de gorge ou dans les lavages broncho-alvéolaires, quand il s'agit de formes sévères, et par la recherche d'anticorps sur les prélèvements sanguins.

Isolation :

L'ensemencement se fait sur des milieux spéciaux pour les mycoplasmes : liquides, solides, diphasiques.

Leur culture nécessite des milieux complexes, avec des conditions précises de température, pH et humidité.

Les milieux doivent contenir un milieu de base bouillon Martin dans lequel on ajoute des extraits de levures, du sérum sanguin, des facteurs de sélection (Pénicilline, bleu de méthylène) et de l'urée pour *U.urealyticum*. Les mycoplasmes peuvent se cultiver aussi sur des milieux cellulaires ou des œufs embryonnés.

L'identification se fait sur des caractères cultureux :

- Dans les milieux liquides, les mycoplasmes génèrent une turbidité caractéristique.
- Sur les milieux solides les colonies sont rondes, avec un centre entouré d'une zone plus claire. Cet aspect est caractéristique.

En microscopie : Les Mycoplasmes sont de petites bactéries polymorphes, non colorables par la coloration de Gram et difficilement visibles au microscope optique.

Elles ne possèdent pas de paroi et ont une extrémité effilée, structure filamenteuse spécialisée leur permettant d'adhérer aux cellules épithéliales et leur procurant leur pouvoir pathogène.

L'examen morphologique ne permet pas leur identification mais plutôt une orientation. L'examen microscopique ne se fait que s'il existe la possibilité d'utiliser les techniques d'immunofluorescence directe IF.

Pour l'identification : On se basera sur des caractères biochimiques :

- Métabolisation du glucose : *M.pneumoniae*
- Métabolisation de l'arginine : *M.hominis*
- Hydrolyse de l'urée : *U.urealyticum*

M.pneumoniae réduit le bleu de méthylène, c'est un caractère spécifique de l'espèce.



Figure 27 : Kit d'identification pour *Mycoplasma*

Le diagnostic sérologique s'effectue pour *M.pneumoniae* seulement :

- Réaction de fixation du complément pour les IgG.
- réaction ELSIA pour les IgM.

Sensibilité :

Le traitement se fait avec la Tétracycline ou l'Érythromycine, mais l'antibiotique de choix est la Clarithromycine.

U.urealyticum est résistant à la Tétracycline et *M.hominis* est résistant à l'Érythromycine et parfois à la Tétracycline.

De plus, en raison de l'absence de paroi les mycoplasmes sont toujours résistants aux bêta-lactamines.

12. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR CHLAMYDIA TRACHOMATIS

12.1) *Chlamydia trachomatis*

Famille : *Chlamydia*

Genre : Il en existe deux dans cette famille de bactéries : *Chlamydia* et *Chlamydophila*.

- *Chlamydia trachomatis*, agent du trachome,
- *Chlamydophila pneumoniae*,
- *Chlamydophila psittaci*, agent de la psittacose (Ornithose).

Localisation :

Les *Chlamydia* sont des bactéries parasites intracellulaires obligatoires. *Chlamydia trachomatis*, qui est transmise par contact direct et *Chlamydophila pneumoniae*, transmise par voie aérienne, sont propres à l'homme.

Par contre, *Chlamydophila psittaci*, qui est une zoonose, est aussi responsable de maladies chez des oiseaux et autres mammifères.

Pouvoir pathogène :

Chlamydia est le genre le plus fréquemment responsable des infections avec transmission sexuelle.

Les chlamydies sont incapables de synthétiser leur propre ATP et utilisent celui de la cellule eucaryote qu'elles parasitent. Beaucoup de personnes infectées par *Chlamydia* peuvent avoir une symptomatologie minime ou être asymptomatiques.

Chlamydia trachomatis est l'agent de maladies infectieuses ne touchant que l'Homme :

- Le Trachome, qui est une kératoconjonctivite folliculaire, rencontrée le plus souvent dans les pays chauds, sous développés. L'infection peut commencer de façon aiguë, et si elle n'est pas traitée, elle peut donner un pannus, avec cicatrisation ultérieure, de la cornée pouvant causer la cécité.
- Conjonctivite à inclusion, qui est une conjonctivite papillaire aiguë, purulente, qui atteint le nouveau-né pendant l'accouchement.
- Infection uro-génitale
- Lymphogranulomatose vénérienne.

Chlamydophila pneumoniae est à l'origine d'infections pulmonaires (sinusite, pharyngite, bronchite...)

Chlamydophila psittaci donne des infections respiratoires, intestinales, génitales. L'Homme s'infecte généralement par inhalation de poussières contenant le germe. Après la période d'incubation, qui dure de 1-3 semaines, débute l'ornithose avec de la fièvre, des céphalées et une pneumonie.

Diagnostic bactériologique :

Prélèvement :

Pour *Chlamydia trachomatis*, le prélèvement doit être effectué par un personnel qualifié et dépend de la localisation de l'infection (prélèvement de sécrétions vaginales, cervicales). Pour les *Chlamydophila psittaci* et *pneumoniae*, le prélèvement peut s'effectuer sur un exsudat pharyngien.

Récolte des sécrétions cervicales: à l'aide d'un spéculum vaginal, les parois vaginales sont enlevées pour visualiser le col de l'utérus. Le mucus est retiré avec un tampon, puis un autre tampon ou une brosse endocervicale est fermement inséré dans le col de l'utérus et rotation plusieurs fois à 360° pour obtenir un plus grand nombre de cellules épithéliales endocervicale.

La récolte de la sécrétion urétrale se fait avec un tampon mince, qui est inséré dans l'urètre sur 1 à 2 cm, il tourne pendant quelques secondes. Dans les infections urétrales chez les hommes, la chlamydia est constamment présente dans les sédiments du premier jet d'urine du matin. Mise en évidence de la chlamydia dans ce produit est un test de dépistage de l'infection à *Chlamydia* chez les hommes asymptomatiques.

Culture :

La culture des germes de *Chlamydia* est souvent difficile, car ces germes ont un développement intracellulaire. Ils présentent aussi un déficit en synthèse d'ATP. Ils se cultivent donc sur des cultures cellulaires d'animaux de laboratoire.

L'isolation sur des œufs embryonnés s'utilise aujourd'hui pour la production d'antigènes, destinés aux tests sérologiques.

Les méthodes de détection antigénique de la *Chlamydia* reposent soit sur la visualisation directe avec des anticorps monoclonaux fluorescents (immunofluorescence directe), soit sur la détection immunoenzymatique de composants de chlamydia solubilisés (tests immunoenzymatiques Elisa ou des tests immunoenzymatiques en phase solide). L'antigène de *Chlamydia* est extrait d'échantillons prélevés sur un endocol utérin (chez la femme), l'urètre ou du premier jet d'urine (chez les hommes). Il peut être détecté en moins de trois heures.



Figure 28 : Méthodes de détection antigénique de la *Chlamydia*

Il est également possible de mettre en évidence des **acides nucléiques** (amplification de séquences d'acide nucléique, d'ADN ou d'ARN). Chez l'homme, il s'agit du test le plus sensible et le plus recommandé pour la détection de *C. trachomatis* à partir d'un tampon urétral ou du premier jet urinaire. Pour le dépistage chez les femmes, les écouvillons vaginaux sont préférables aux échantillons d'urine.

Examen microscopique :

L'absence de peptidoglycane explique pourquoi on ne peut pas les observer en coloration de Gram, et pourquoi les bêta-lactamines sont inefficaces.

Pour *Chlamydia trachomatis* les frottis seront observés par technique d'immunofluorescence directe (IF), en marquant les anticorps monoclonaux anti-*C.trachomatis* avec un fluorochrome.

Sensibilité :

Les tests de sensibilités s'effectuent sur des cultures de cellules : pour l'Ampiciline, l'Amoxicilline et les Céphalosporines.

Les traitements contre *Chlamydia* sont : Tétracyclines, Macrolides, Azitromicine.

13. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES INFECTIONS PRODUITES PAR LES LEVURES:

13.1) Le genre *Candida* :

Les levures du genre *Candida* sont des parasites chez les humains et les animaux. *Candida albicans* est la principale espèce impliquée dans l'étiologie des mycoses systémiques (65-70%).

Signification clinique :

Une fois que les levures ont surpassé le système immunitaire de l'hôte, elles peuvent causer une large variété de candidoses cutanées et muqueuses, jusqu'à l'expansion systémique. Quand les levures gagnent la voie sanguine, elles peuvent affecter une grande variété d'organes (reins, foie, cerveau).

On sépare les candidoses en deux groupes :

- Les candidoses superficielles (muqueuses et cutanées).
- Les candidoses systémiques (septicémie ou viscérales) qui peuvent être iatrogènes, nosocomiales ou endogènes.

Le diagnostic de laboratoire :

Il présuppose l'isolation et l'identification des espèces responsables de la maladie. La récolte du produit pathologique continuera jusqu'à au moins trois jours après l'arrêt du traitement.

Le prélèvement va dépendre de la localisation de l'infection.

L'examen direct constitue une étape importante du diagnostic. Au microscope on voit des éléments ovalaires de 4-6 µm, associés éventuellement à la présence de filaments.

La coloration se fait avec la méthode de Gram, bleu de méthylène, MGG. Les levures sont sphériques ou ovalaires avec des bourgeons multipolaires nommés « blastospores ». À la coloration de Gram, les levures apparaissent Gram positif.

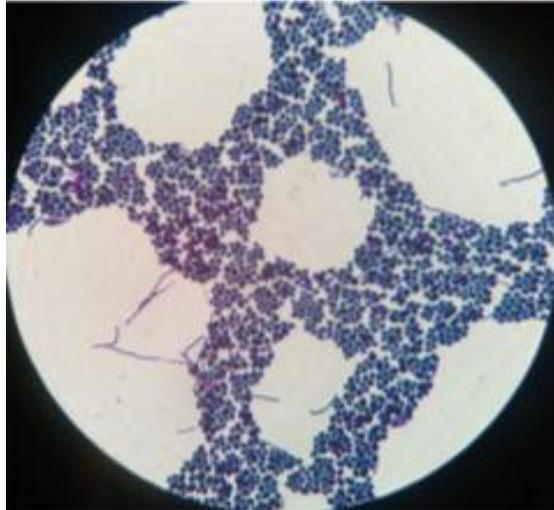


Figure 29 : Examen microscopique de levures en coloration Gram

Culture :

Les espèces du genre *Candida* se développent sur milieu Sabouraud, avec ajout de Gentamycine et Chloramphénicol, ou Sabouraud avec du rouge phénol (milieu Mycoline). L'incubation se fait à 35-37°C, pendant 24-48h. Les colonies sont blanches, crémeuses, mates et avec des marges régulières.



Figure 30 : Culture de levures sur milieu Sabouraud

L'identification : Pour *Candida albicans*, on recommande de faire une culture sur milieu P.C.B Langeron, favorisant l'apparition de clamidospores, caractéristiques à l'espèce. On peut aussi chercher à visualiser l'émission de filaments.

Il existe aussi des galeries d'identification: API Candida (permettre l'identification rapide en 18-24 heures de 14 espèces de levures), ou le système biochimique Candifast, WELL D-ONE.

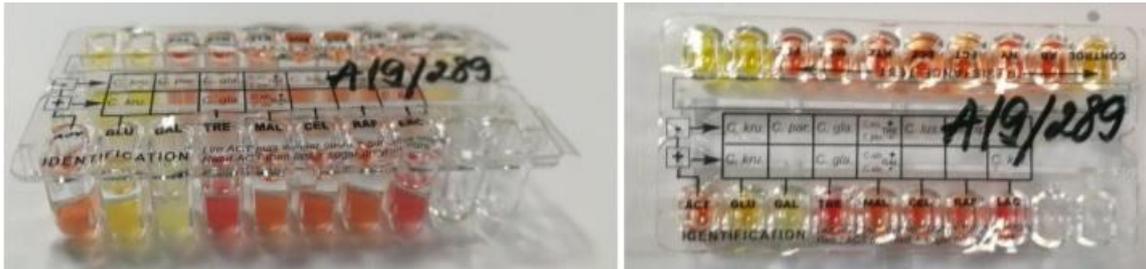


Figure 31: Systeme pour identification antifungigrame - Candifast

Sensibilité : Antifongigrame : ATB-fungus, méthode Kirby-Bauer.

Traitement :

- Azoles (Clotrimazol, Ketoconazol),
- Polyenes (Amfotericine B, Nistatine, etc.),
- Echinocandine (Capsfungi, Micafungin, etc.).

14. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE POUR LES INFECTIONS VIRALES :

14.1) Le H.I.V. :

Le virus du Sida a été isolé en 1983 par l'équipe d'oncologie virale de l'Institut Pasteur. Une commission internationale de nomenclature a statué pour la dénomination de H.I.V. (Human Immunodeficiency Virus).

Un deuxième virus type H.I.V., appelé H.I.V.2 a été isolé en 1985 chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest.

Les H.I.V. sont des rétrovirus. Le terme de rétrovirus désigne une famille de virus à RNA, capables de transcrire en ADN, leur ARN génomique, après que celui-ci soit rentré dans la cellule hôte, grâce à une enzyme codée par le virus (la transcriptase inverse ou « reverse transcriptase »).

Cet ADN ainsi formé se circularise et passe alors dans le noyau de la cellule où il a la capacité de s'intégrer au génome de la cellule.

Dès lors, l'ADN pro-viral intégré peut rester latent ou être transcrit en ARN messenger et ARN génomique qui donneront naissance aux protéines virales et à de nouvelles copies du virus.

Signification clinique :

L'infection au HIV provoque un syndrome immunosuppresseur (le SIDA), qui prédispose à d'autres infections graves (potentiellement mortelles) avec des micro-organismes «opportunistes» comme *Pneumocystis carinii*, Cytomegalovirus (CMV), *Candida*, Herpes simplex, *Cryptosporidium*, etc.

Une autre caractéristique du SIDA est le sarcome de Kaposi, une affection maligne agressive, avec des multiples lésions cutanées et viscérales, provoquées par une surinfection avec le virus herpétique humain de type 8 (virus du sarcome de Kaposi) de la famille des *Herpesviridae*.

L'infection au HIV est une infection persistante, avec une évolution lente sur une grande période de temps.

Transmission :

Si le HIV a pu être isolé dans de **nombreux liquides biologiques** et notamment de la salive, des larmes, du sperme, du sang, du plasma, sa transmission s'effectue essentiellement lors **des rapports sexuels non protégés** par des préservatifs, par **l'usage de seringues et d'aiguilles contaminées**, ou par la **transfusion de sang ou de ses dérivés provenant de donneurs infectés**.

La transmission maternelle, responsable de la majorité des cas pédiatriques, peut se faire in utero, au moment de l'accouchement ou, le plus souvent, au cours de l'allaitement. Le risque de transmission mère-enfant est estimé actuellement à 17-30% selon les populations étudiées.

En ce qui concerne les étapes de développement de l'infection, il existe actuellement plusieurs classifications. On peut grossièrement identifier deux phases principales:

1. stade "séropositif" (infection sérologiquement prouvée, sans d'autres signes cliniques ou paracliniques de maladie).
2. stade de SIDA (manifestations de la maladie).

Diagnostic de laboratoire :

Le diagnostic étiologique pour les infections au HIV se réalise avec des tests **ELISA, Immunoblot** (Western blot) et des techniques de biologie moléculaire (**PCR**), en conformité avec des algorithmes de tests élaborés sur la base de la dynamique des marqueurs sérologiques des infections (ARN-HIV, l'antigène p24 d'HIV1, les anticorps : IgM, IgG, anti-HIV1/HIV2).

En fonction de la dynamique de ces marqueurs, l'infection peut se classer en différents stades :

- La période « éclipse » ou « de fenêtre sérologique » : c'est l'intervalle initial après l'infection, où l'on ne détecte aucun marqueurs dans le sérum.
- La période de séroconversion : c'est l'intervalle entre l'infection et l'apparition des premiers anticorps détectables.
- Infection aiguë : c'est l'intervalle entre l'apparition d'ARN détectable du HIV et la positivité des tests de détection des anticorps spécifiques.
- Infection chronique : ce stade se caractérise par une réponse complète des anticorps de type IgG, détectés par ELISA et confirmés par Western blot.

Il existe aujourd'hui des tests salivaires qui se basent sur la présence d'anticorps anti-HIV dans la salive, même si leur concentration est beaucoup plus faible en comparaison avec le sang. Tous les tests salivaires positifs nécessitent une confirmation par technique de laboratoire ELISA, Western blot ou RIA.

14.2) Les virus hépatiques:

Le terme « hépatite virale » désigne une inflammation aiguë ou chronique du foie, causée par l'infection avec l'un des « virus hépatique ».

Dans le cas du diagnostic de l'hépatite (inflammation du foie), soutenu cliniquement et biochimiquement, l'étiologie virale peut être confirmée par des tests spécifiques.

- Diagnostic de laboratoire pour l'infection au virus de l'hépatite A (VHA).

L'hépatite A est une maladie de répartition mondiale, survenant par épidémies extensives, et généralement en automne et hiver dans les climats tempérés. Le réservoir de virus semble exclusivement humain.

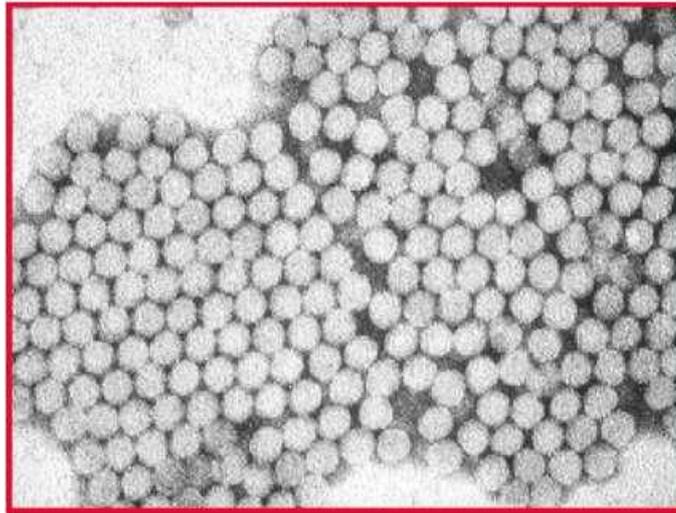
Le virus est présent dans le sang pendant la période pré-ictérique et au début de la phase ictérique. Il est ensuite présent dans les selles et peut contaminer les eaux de surface, voire les réservoirs d'eau potable, dans lesquels il garde longtemps son pouvoir infectieux.

Le mode de transmission est celui des maladies dites "fécales", c'est-à-dire soit directe, soit indirecte par l'intermédiaire de l'eau ou d'aliments souillés (coquillages crus, viandes et légumes froids).

La confirmation du **diagnostic clinique** se fait par la mise en évidence :

1. D'anticorps anti-VHA (IgM), par méthode **ELISA**. Le test est hautement sensible et spécifique quand il est réalisé sur le sérum d'un patient qui présente les symptômes d'une hépatite aiguë (ictère, manifestations digestives aiguës). Normalement, ces IgM sont détectables environ 5 à 10 jours avant l'apparition des symptômes et restent à un niveau élevé dans le sérum pendant environ 5 - 6 mois. La diminution du titre de ces anticorps se fait en parallèle avec l'augmentation des IgG, qui vont persister, en général, dans le sérum du patient durant toute sa vie. On trouve aussi ces anticorps IgG anti-VHA dans le sérum des personnes vaccinées.
2. En **microscopie électronique**: Elle permet la visualisation et l'identification des virions VHA dans les fèces ou le sang des personnes ayant une hépatite virale A. La méthode est très sensible et spécifique.

Hepatitis A Virus



3. Par méthode moléculaire : utilise des techniques d'amplification des acides nucléiques (**PCR**), à partir d'échantillon de sérum, de sang ou de tissu hépatique. La sensibilité et la spécificité sont alors très élevées, mais le prix est relativement élevé, donc rarement utilisé en diagnostic de routine mais peuvent être d'une grande utilité dans le cas d'investigations épidémiologiques.

- Diagnostic de laboratoire pour l'infection au virus de l'hépatite B (VHB).

Il constitue la famille des *Hepadnaviridae*: virus à ADN d'environ 42 nm de diamètre. Le nucléoïde de la particule virale contient un antigène appelé antigène « core » ou antigène **HBc** («core» en anglais est équivalent de nucléoïde). Cet antigène induit la formation d'anticorps spécifiques, apparaissant quelques semaines après le début de l'infection. Il existe un antigène appelé **HBeAg** qui s'avère un produit de dégradation de l'antigène **HBc** et qui représente, dans le sang, un marqueur de réplication du virus. Par rapport à l'enveloppe de la particule virale, les sphérules et les tubules qui constituent l'enveloppe virale, sont déversés en excès dans le sang. Ils sont porteurs de l'antigène de surface de l'hépatite B appelé antigène **HBs**.

1. La méthode **ELISA** peut déceler l'antigène de surface de VHB, l'antigène « core » (antigène **HBc**) ou l'antigène « e » (**HBeAg**), ou bien pour déceler les anticorps dirigés contre ces antigènes.
2. La méthode moléculaire (**PCR**) peut détecter l'ADN-VHB.

- Diagnostic de laboratoire pour l'infection au virus de l'hépatite C (VHC).

C'est un virus mondialement répandu, qui s'observe dans les mêmes circonstances épidémiques que l'hépatite B. Son évolution se fait dans 20 à 40% des cas, vers la chronicité avec apparition d'une cirrhose ou bien d'un hépatocarcinome.

La transmission se fait essentiellement par voie parentérale, à partir des produits sanguins. Une transmission par voie sexuelle est possible mais faible. La transmission mère-enfant est également possible, favorisée par l'importance de la charge virale et l'existence d'une infection à HIV associée.

Dans la pratique clinique, le diagnostic virologique pour une infection à VHC se base principalement sur l'utilisation de 4 marqueurs :

- Les anticorps anti-VHC,
- L'antigène « core » de VHC,
- La détection et la quantification de l'ARN-VHC,
- La détermination du génotype de VHC.

Il existe 6 génotypes de VHC qui présentent eux-mêmes plusieurs sous-types. La détermination du génotype de VHC est nécessaire pour la stabilisation du schéma thérapeutique anti-VHC.

Ces marqueurs sont déterminés par méthode sérologique immuno-enzymatique de type **ELISA** et par méthode de **diagnostic moléculaire** (ARN-VHC et génotype de VHC).

Bibliographie:

1. **Bartlett JG, Auwaerter PG, Pham PA.** Johns Hopkins ABX Guide: Diagnosis & Treatment of Infectious Diseases, 2nd Edition. Jones & Bartlett Publishers, 2010
2. **Bîlbîie V, Pozsgi N.** Bacteriologie Medicală – volumul II. Editura Medicală, București, 1985
3. **Buiuc D, Neguț M.** Tratat de Microbiologie Clinică. Editura Medicală, București, 1999
4. **Buiuc D.** Microbiologie clinică - volumul I. Editura Didactică și Pedagogică, R.A. București, 1998
5. **Buiuc D.** Microbiologie medicală-Ghid pentru studiul și practica medicinei. Ediția a VI-a. Editura Gr. T. Popa, Iași, 2003
6. **Chevaliez S.** Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 116–121
7. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty third informational supplement, CLSI Document M100- S23. Wayne PA: CLSI; 2013
8. **Cornett JK, Kirn TJ.** Laboratory Diagnosis of HIV in Adults: A Review of Current Methods. Clinical Infectious Diseases 2013;57(5):712–8
9. **Debeleac L, Popescu-Drânda MC.** Microbiologie. Ed Medicală AMALTEA, București, 2003
10. **Fearon M.** The laboratory diagnosis of HIV infections, Can J Infect Dis Med Microbiol Vol 16 No 1 January/February 2005
11. **Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, et al.** EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance 2013;Version 1.0:4-10
12. **Grosjean J, Clave D, Archambaud M, Pasquier C.** Bactériologie et Virusologie pratique. De Boeck Supérieur, 2017
13. **Jarlier V.** Enterobacteries et β lactamines, L'antibiogramme. MPC Vigot 1985, 87-101
14. **Jehl F, Chomarat M, și colab.** De la antibiogramă la prescripție. Ediția aII-a. Editura Științelor Medicale, București, 2003
15. **Licker M, Moldovan R, Crăciunescu M, Dumitrașcu V.** Rezistența la antibiotice - istorie și actualitate. Editura Eurostampa, Timișoara, 2002
16. **Licker M, Moldovan R și colab.** Curs de Microbiologie specială Vol I, Bacteriologie, Lito UMF, Timișoara 2013
17. **Moldovan R și colab.** Lucrări practice de Microbiologie, Editura Victor Babes Timisoara 2013, ISBN 978-606-6456-19-5
18. **Lorian V.** Antibiotics in laboratory medicine. Lippincott Williams &Wilkins, 2005

19. **Mahon C, Manuselis G.** Textbook of Diagnostic Microbiology. Second Edition. W.B. Saunders Company, USA, 2000
20. **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. New York: Churchill Livingstone, 2010
21. **McPherson RA, Pincus MR.** Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Twenty-first Edition. Saunders Elsevier, USA, 2007
22. **Mims CA, Dockrell HM, Goering RV, et al.** Medical Microbiology. Third Edition. Mosby- Year Book Europe Limited, 2006
23. **Moldovan R, Licker M.** Curs de Microbiologie specială Vol II, Micologie și Virusologie, Lito UMF, Timișoara 2013
24. **Moldovan R, Licker M, Doroiu M și colab.** Microbiologie-Îndreptar de lucrări practice. Lito U.M.F. Timișoara, 2002
25. **Pilly E.** Maladies Infectieuses, APPIT, 12th Edition, Montmorency, 1992
26. **Winn WC Jr, Koneman EW, Allen SD, et al.** Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 2006
27. <http://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447> Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations Published June 27, 2014
28. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/127/investigations> Hepatitis B
29. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/128> Hepatitis C
30. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/555/investigations> HIV infections
31. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/6/investigations> Influenza infection
32. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-us/126/investigations> Hepatitis A
33. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447> Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations
34. www.mdpi.com/journal/viruses Vemula S.V., Zhao J., Liu J., Wang X., Biswas S., Hewlett I., Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans Viruses 2016, 8, 96; doi:10.3390/v8040096
35. <https://www.sciencesource.com/archive/Neisseria-gonorrhoeae-SS2388346.html>
36. <http://www.msefans.com/cnsinfections/listeria.html>
37. https://www.researchgate.net/figure/the-C-S-or-gull-wing-shape-of-Campylobacter-species-arrows-stained-by-1-Carbol_fig1_271214444
38. https://www.researchgate.net/figure/colonies-of-Campylobacter-species-grown-on-Preston-Agar-showing-translucent_fig3_271214444
39. https://med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/images/H-pylori_100x_mag-01-bg-250.jpg
40. https://med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/v1-sld_H-pylori.html

41. <http://www.scionpublishing.com/resources/medmicro/chap2/48.jpg>
42. <https://microbeonline.com/x-v-factor-test-haemophilus-principle-procedure-results/>
43. <https://www.cdc.gov/hi-disease/about/photos.html>
44. <http://www.cephheid.com/en/cephheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcareassociated-infections/xpert-c-difficile>
45. <http://examens-directs.over-blog.com/page-2946398.html>
46. <https://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/gallery.htm>
47. (a) <https://www.arminlabs.com/en/tests/antibodies>
48. <https://twitter.com/JClinMicro/status/1060893117723918342>
49. <https://www.clinicord.com/wp-content/uploads/pdfs/genital.pdf>
50. <https://www.savyondiagnosics.com/product/quickstripe-chlamydia-ag/>
51. <https://www.biomerieux-usa.com/industry/air-ideal>
52. <https://www.slideshare.net/EugenTabac/31-prelevate-deseuri-medicale>
53. (a) <https://www.pinterest.com/source/blogs.wayne.edu/>, (b) CDC/ Dr. Frederick A. Murphy - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #1833; Public domain
54. <https://microbeonline.com/hemagglutination-inhibition-test-hai-principle-procedure-result-interpretations/>