

Cours de Microbiologie  
MODULE D'INFECTIEUX  
Année universitaire : 2014/2015

**DIARRHEE BACTERIENNE**  
**(COPROCULTURE)**

**I – INTRODUCTION :**

- Diarrhée infectieuses aiguës: > à 3 selles molles ou liquides / jour (ou poids > à 300 g/j) pendant moins de 10j.
- Diarrhée infectieuses aiguës = syndrome diarrhéique +/- vomissements +/- fièvre.
- Viennent au 2ème rang après les infections respiratoires.
- 5 à 10 millions enfants décèdent / ans dans les pays en voie de développement (par déshydratation + +)  
Responsables également de :
  - Malnutrition.
  - Retard de développement physique et mental.

Il faut savoir que :

Tous les épisodes diarrhéiques ne sont pas infectieux.

Toutes les diarrhées infectieuses ne sont pas bactériennes (parasites, levures, virus)

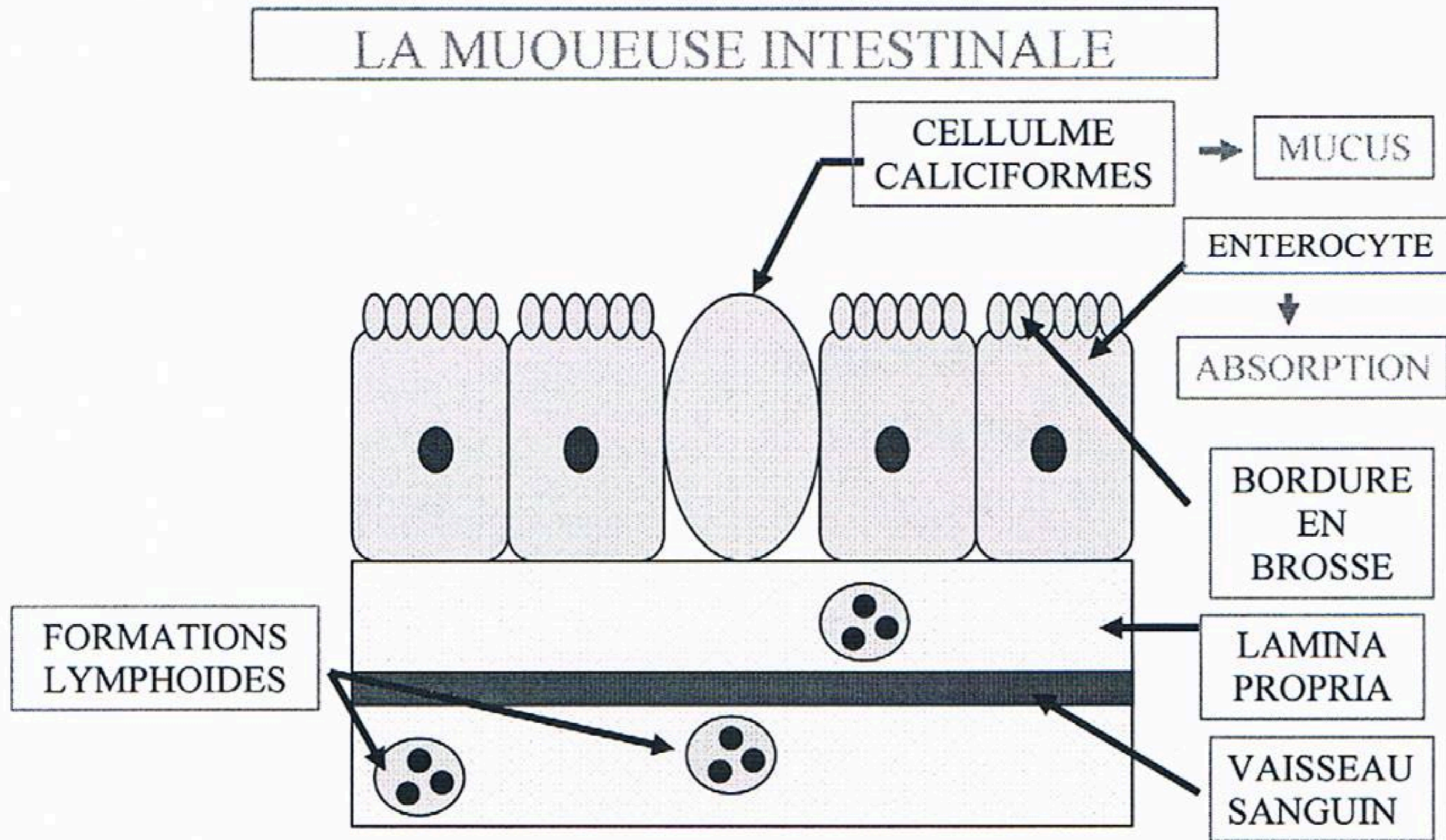
→ Toutes les diarrhées bactériennes ne sont pas dues à des bactéries spécifiques.

Etiologie bactérienne dans > 50 % des cas.

**II- PHYSIOPATHOLOGIE :**

Muqueuse intestinale formée:

- Enterocytes: Absorption des nutriments
- Cellules caliciformes: Sécrétion de mucus.
- Cette assise cellulaire repose sur un chorion muqueux (lamina propria)
- L'intestin est capable d'absorber ou de sécréter de l'eau et des électrolytes (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>)



- L'intestin de l'homme dès la naissance colonisé par de nombreuses espèces bactériennes la pluparts sont des commensales.

- certaines sont indispensables au bon fonctionnement de l'appareil digestif

→ La diarrhée est le résultat soit:

- D'une diminution d'absorption (destruction des Enterocytes: diarrhées virales, inhibition de l'absorption par une entérotoxines)
- D'une augmentation de la sécrétion d'eau (diarrhées osmotiques, entérotoxines)

→ L'infection entérique est due :

- ❖ soit à la présence dans l'intestin d'un germe entéropathogène.
- ❖ Soit à la prolifération anormale d'un germe qui fait partie de la flore intestinale sous l'effet d'un traitement antibiotique ou déséquilibre de flore.

→ Transmission / voie féco-orale

- Soit directe par l'intermédiaire des mains.
- Soit indirecte par l'intermédiaire d'eau ou d'aliments contaminées par les matières fécales de l'homme ou les animaux.

### III- ETIOLOGIES:

- Les bactéries agents d'infection intestinales sont regroupées selon la physiopathologie de l'infection en deux groupes :

#### ❖ Bactéries enterotoxigenes:

Elles secrètent une entérotoxine responsable d'une fuite importante d'eau et d'électrolytes, elles provoquent des diarrhées aqueuses sans émission de sang ou de leucocytes et sans fièvre.

La gravité de ces diarrhées est uniquement liée à la déshydratation qu'elles provoquent.

Dans ce groupe on trouve :

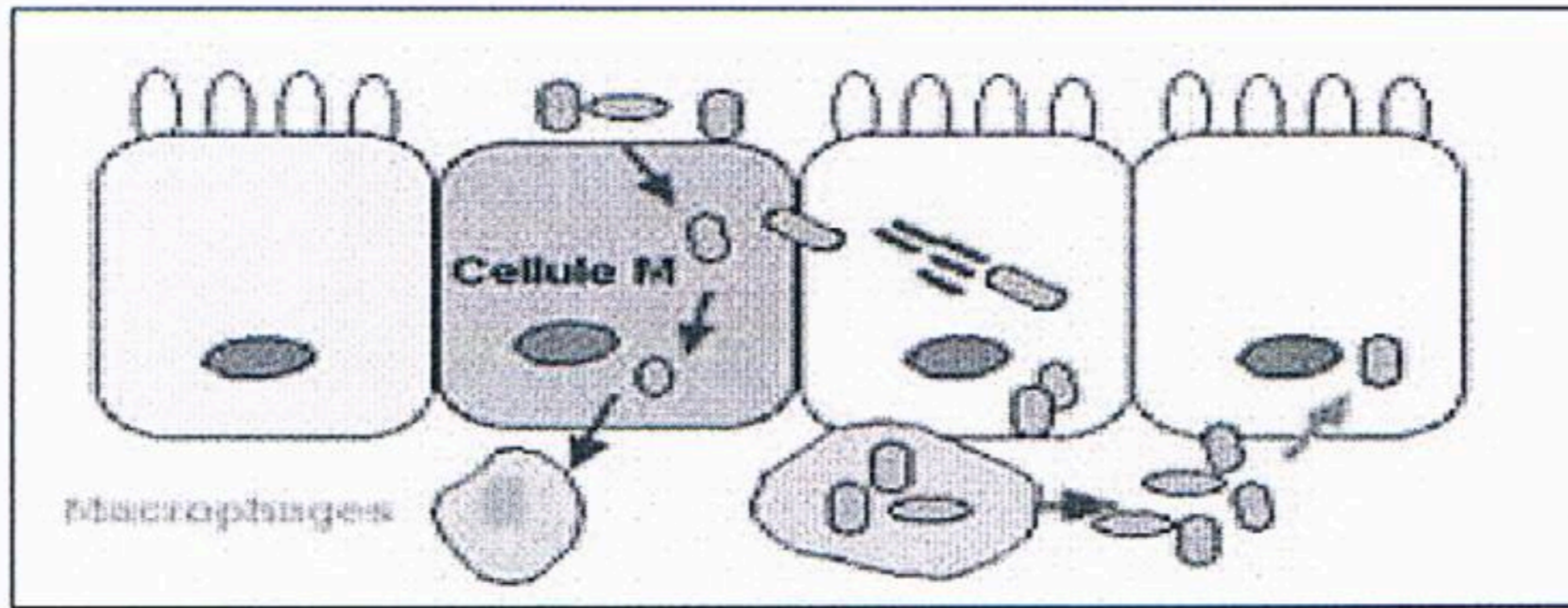
- *Vibrio cholérique*
- *E. coli* entérotoxigène.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Aeromonas hydrophila*.
- *V. parahémolyticus*.

#### ❖ Bactéries entero-invasives:

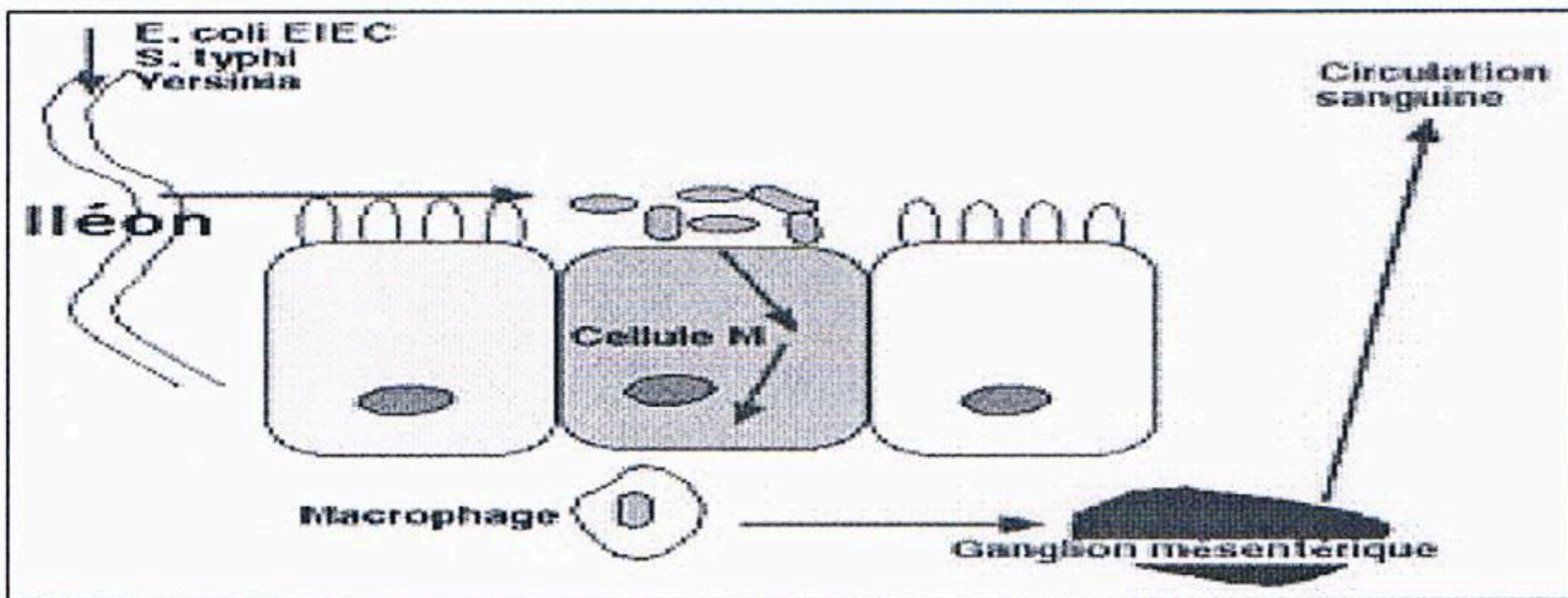
Elles envahissent la muqueuse intestinale et provoquent des dysenteries c'est-à-dire émission de selles sanglantes et purulentes, la fièvre est habituelle. Dans ce groupe on trouve :

- *Shigella*.
- *Salmonella* (certaines espèces passent dans le sang).
- *Yersinia*.
- *Campylobacter*.
- *E. coli* entéro-invasive.

Invasion de la muqueuse → Destruction des structures villositaires → Troubles de l'absorption

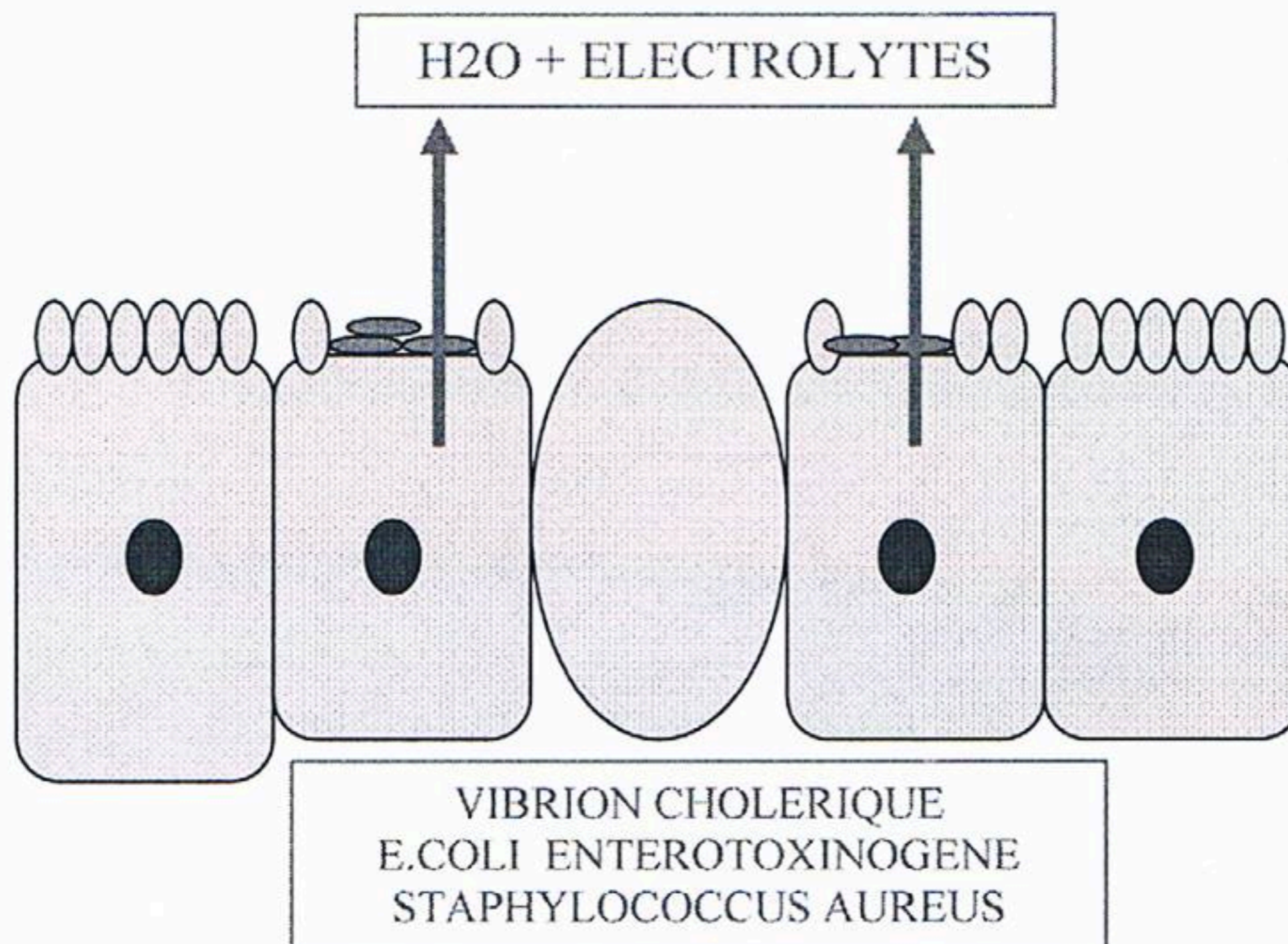


SHIGELLA



SALMONELLA  
YERSINIA

Fixation à la surface de l'épithélium digestif → Libération de toxine → Sécrétion d'eau et d'électrolytes par les cellules épithéliales



#### IV- DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE : repose sur :

- La coproculture + + + (non systématique)
- L'hémoculture.
- Etude bactériologique des aliments. (dans les TIAC = toxi-infection alimentaire chronique)

collective

#### LA COPROCULTURE

##### A) – Principales bactéries recherchées selon le contexte :

- Adulte et enfant plus de deux ans : *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrion cholérique* (à la demande), ainsi que *Yersinia enterocolitica* et *Campylobacter* spp.
- Enfants de moins de deux ans : en plus des bactéries déjà citées on recherche *E. coli* entéro-pathogène sans oublier l'étiologie virale fréquente à cet âge.
- TIAC : *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*.
- Notion de voyage récent en pays tropical : *V. cholerae*, *Aeromonas* spp.
- Diarrhée post ATB : *C. difficile*, *S. aureus*, *Candida albicans*. (chouffignou)
- Détection de portage chez le personnel de restauration : *Salmonelle* spp et *S. aureus*.
- Syndrome hémolytique et urémique (SHU) : *E. coli* O157.
- Détection de la colonisation par des bactéries multirésistantes aux ATB (BMR) : enterobactéries productrices de BLSE, Enterocoque Vancomycine R\*.

##### \* En pratique de routine :

- Chez l'adulte on recherche : *Salmonella*, *Shigella* et le *Vibrion cholérique* (à la demande).
- Chez l'enfant < à 2 ans on recherche : *E. coli* entéro-pathogène, *Salmonella*, *Shigella* et *Vibrion cholérique* (à la demande).

##### B- Le prélèvement :

- Les selles sont émises dans un récipient propre (pot à vis). Chez le nourrisson et le petit enfant on procède à un écouvillonnage rectal.
- Lors d'un épisode diarrhéique aiguë 2 ou 3 prélèvements peuvent être nécessaires.
- Les biopsies de muqueuse rectale sont traitées comme des selles.
- L'acheminement au laboratoire doit être rapide sinon conservation du prélèvement à + 4°C sans dépasser 12h. Dans le cas où l'acheminement est trop long on utilise un milieu de transport (glycérine tamponnée).
- La fiche de renseignement doit accompagner le prélèvement et doit comporter : nom, prénom, âge, signes cliniques, germes particuliers à rechercher, notion de prise d'ATB, notion de voyage à un pays tropical, notion de TIAC.

##### C) – Conduite de l'examen cyto-bactériologique

###### 1 – Examen macroscopique :

- La selle peut être normale moulée, molle ou liquide.
- Elle peut être diarrhéique afécale avec glaires sanglantes (dysentériques), ou incolore eau de riz (cholérique).

## 2 – Examen microscopique :

Permet d'orienter la culture.

- Examen direct à l'état frais : permet de déceler la présence d'hématies et de leucocytes (éventuellement des parasites) en cas de diarrhée invasives.
- Coloration de bleu de méthylène : Recherche de polynucléaires.
- Coloration de Gram :

Elle permet d'apprécier l'équilibre de la flore. A l'état normal on trouve environ 4/5 de bacilles en majorité des Gram (-) et 1/5 de cocci et de rares levures.

On fait une dilution de la selle solide au 1/10 dans de l'eau distillée, bien agiter au vortex, faire un étalement sur lame et colorer.

En cas de selle liquide étaler directement une goutte sur lame.

## 3 – Mise en culture :

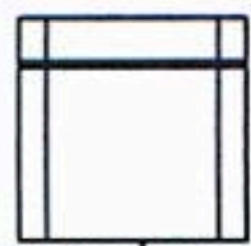
*obligatoire*

On utilise deux types de milieux.

- Les milieux d'isolement sélectifs et différentiels : HECKTOEN, BCP, GNAB. milieu ss (*Salmonelle, Shigelle*)
- Les milieux d'enrichissement favorisent la croissance de germes pathogènes qui sont peu abondants dans le prélèvement :
  - EPA (eau peptonée alcaline) → *V. cholerae*.
  - Sélénite de sodium → *Salmonella*.

**METHODOLOGIE AU LABORATOIRE : COPROCULTURE**

Pot à vis



\* prendre une parcelle de la taille d'un petit pois  
\* selles liquides 1/2 d'une pipette

écouvillon

\* immerger l'écouvillon

**-1-**  
état frais : ( leucocytes, hématies, germes mobiles, levures, parasites )  
bleu/gram :

Recherche d'E.coli enteropathogène chez l'enfant < 2 ans

prendre 2 colonies lactose (+) →  
TSI + Urée si lactose +, gaz +,  
urée -, indole + → identification antigénique

Eau physiologique (dilution au 1/10)

1 gtte

1 gtte

**-3-**  
Enrichissement

**-2-**

Culture sur milieu sélectif

\* HECKTOEN

\* GNAB I si suspicion de vibrion cholérique

Recherche de salmonelle

Recherche de vibrion cholérique

\* A la demande

SFM I

Après 6 h

6 gttes

SFM II

HECKTOEN II

HECKTOEN III

après 6 h  
6 gttes en S<sup>2</sup>

EPA I

EPA II

GNAB III

GNAB II

(03) Hee R Toeu  
(02) Selentes

Repiquer 5 colonies lactose (-)  
Ou lactose (-) H<sub>2</sub>S (+) (vertes +/- centre noir)  
La moitié de la colonie sur milieu TSI  
L'autre moitié sur milieu urée / indole

colonies transparentes OX(+)  
TSI / KIA → lac (-), gaz (-), H<sub>2</sub>S (-)  
OX + agg avec serum O1 →  
O139 Si (-) → DC, ODC, ADH

Incubation à 37 °C pendant 18 à 24 h

Si urée (-), indole (-), lactose (-), H<sub>2</sub>S +/-  
LDC(+), TDA (-) → Salmonella  
(si gaz +, H<sub>2</sub>S+ : mineure ou para B)  
(si gaz +, H<sub>2</sub>S- : para A)  
(si gaz -, H<sub>2</sub>S - ou + : Typhi)

si urée +  
TDA (+) Protéus  
TDA (-) Yersinia ?

5 Colonies vertes TSI + urée  
si lactose (-) H<sub>2</sub>S (-)  
gaz (-), urée (-), LDC (-)  
TDA (-) → Shigelle →  
Identification antigénique

→ Procéder à l'identification antigénique.

( NB : Salmonelles majeures recherchées également dans l'hémoculture, et par sérodiagnostic de Widal ).

#### D – Identification des colonies suspectes :

**1°-Recherche de *Salmonella* et *Shigella***:Prendre les colonies lactose –, H<sub>2</sub>S – et lac – H<sub>2</sub>S + .

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

→ Uréase + : Proteus

→ Uréase - : ensemencer à partir de chaque milieu un TSI et LDC + témoin (37 ° C pdt une nuit )

- Si urée – TDA – LDC + : *Salmonella* ( si gaz +, H<sub>2</sub>S+ :mineure ou para B )  
( si gaz +, H<sub>2</sub>S- :para A )  
( si gaz -, H<sub>2</sub>S – ou + :Typhi )

→ Procéder à l'identification antigénique ( NB : Salmonelles majeures recherchées également dans l'hémoculture, et par sérodiagnostic de Widal ).

- Si urée -, TDA -, LDC - : *Shigella* ( gaz -, H<sub>2</sub>S -, Lac et Sacch - ) → identification antigénique.

**2° -Recherche d'*E. coli* entéropathogènes** : (nourrisson < ou = à 2 ans)

A partir des boîtes de BCP repiquer 8 à 10 colonies Lac + sur milieu urée indole ou eau peptonnée exempte d'indole et sur TSI .incuber à 37 °C pendant 24 h.

Les colonies indole +, urée -, TDA – et gaz+, lactose + dans le TSI → identification antigénique à l'aide de sérums anti EPEC.

**3°-Recherche de *Yersinia enterocolitica*** : Effectuée à la demande.

A partir de la suspension de selle, effectuer un isolement sur Hecktoen. Incuber les boîtes à 28 °C de préférence si non à 37 °C pendant une nuit ( rarement + ) et un enrichissement sur milieu de Rappaport modifié incubé pendant 3 semaines à + 4°C en faisant des repiquages toutes les semaines.( urée +, Lac +, gaz -, H<sub>2</sub>S -,ODC +, VP + à t°p du labo et – à 37°C ).

**4°-Recherche de *V.cholerae*** : Se fait à la demande. Sur GNAB, repérer les colonies suspectes :Transparentes, bleutées, plates et à contours réguliers.

A partir de chaque colonie, effectuer une recherche d'oxydase.

- Si oxydase + :Repiquer le reste de la colonie sur milieu KIA et Incuber à 37 °C .
- Si KIA :glucose +, gaz -, lac -, on agglutine avec le sérum O1 polyvalent anti *V.cholerae* et 0139.
- Si agglutination + : C'est un *Vibrion .cholerae*.
- Si agglutination - : Ensemencer une galerie biochimique contenant les acides aminés. Elle nous permet de différencier *V.cholerae* non O1 des *Aeromonas* et *Plesiomonas* .

	Vibrio	Aeromonas	Plesiomonas
ADH	-	+	+
ODC	V	-	+

**Tableau 1 : caractères biochimiques de vibrion cholérique, plesio et aeromonas**

**5°-Recherche de *Campylobacter*** : Effectuée à la demande. Culture sur milieu de

SKIRROW pendant 48 h en micro-aérophilie. Il s'agit d'un bacille gram – en virgule ou en S, très mobile, oxydase +.