

DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE D'UNE DIARRHÉE

(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 2eme 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.

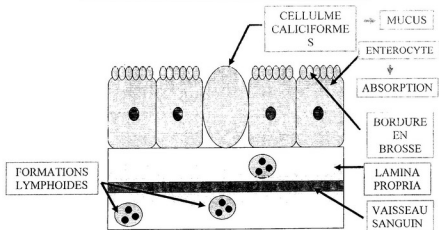
Etiologie bactérienne dans > 50 % des cas.

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⁺, Cl⁻, K⁺)

LA MUQUEUSE INTESTINALE



- 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 Entérocytes: 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 enterotoxinogènes:

Elles sécrètent 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 :

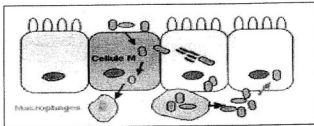
- *Vibrien cholérique*
- *E.coli entérotoxigène.*
- *Staphylococcus aureus.*
- *Aeromonas hydrophila.*
- *V.parahémolyticus.*

❖ **Bactéries entéro-invasives:**

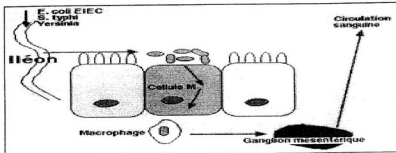
Elles envahissent la muqueuse intestinale et provoquent des dysenteries cād émission de selles sanglantes et purulentes, la fièvre est habituelle. Dans ce groupe on trouve :

- *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

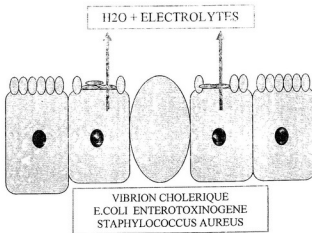


SHIGELLA



SALMONELLA
YERSINIA

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



IV-LE DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE : repose sur :

- La coproculture + + +.(non systématique)
- L'hémoculture.
- Etude bactériologique des aliments.(dans les TIAC)

LA COPROCULTURE

A) – Principales bactéries recherchées selon le contexte :

- Adulte et enfant plus de deux ans : *Salmonella* ,*Shigella* . *Vibrio cholérique* a 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 enteropathogène* sans oublier l'étiologie virale fréquente à cet age.
- 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* .
- 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 *Vibrien cholérique* à la demande.
- Chez l'enfant < à 2 ans on recherche : *E.coli entéropathogène* , *Salmonella* , *Shigella* et *Vibrien 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 cytobactériologique :

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 (cholériforme).

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 diarrhées invasives.
- Coloration de bleu de méthylène : Recherche de polynucléaires.
- Coloration de gram :

Elle permet d'apprécier l'équilibre de la flore. À 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 :

On utilise deux types de milieux.

- Les milieux d'isolement sélectifs et différentiels : HECKTOEN, BCP, GNAB.
- Les milieux d'enrichissement favorisent la croissance de germes pathogènes qui sont peu abondants dans le prélèvement :

- EPA (eau peptonée alcaline) → V.cholerae.

- SELENITE DE SODIUM → Salmorelle.

METHODOLOGIE AU LABORATOIRE : COPRO-CULTURE STANDARD

Jour 1

Macroscopie
Consistance (molle, moulté, liquide)
Noter la présence de glaires, de pus ou de sang

SELLES

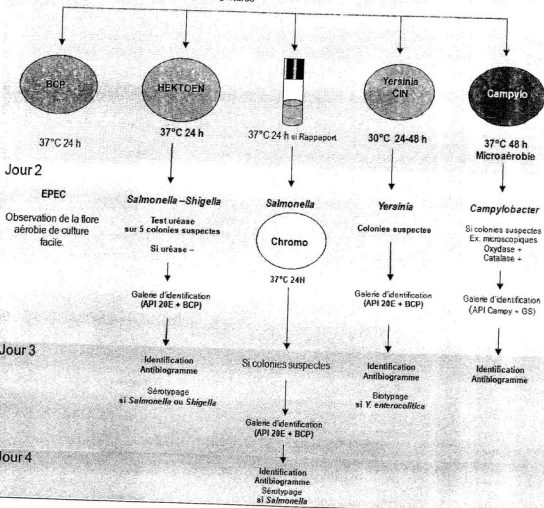


Critures

Microscopie



EF: recherche de leucocytes, hématies, levures, bactéries à mobilité particulière
GRAM: équilibre Gram+/Gram- de la flore, morphologies particulières



BCP = gélose lactosée au pourpre de bromocrésol

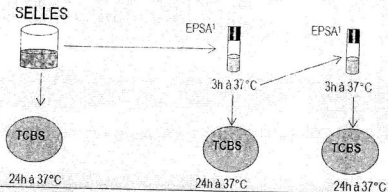
Campylo = milieu d'isolement sélectif des *Campylobacter* (Campylosel, Karmali..)

Chromo = gélose chromogène *Salmonella*,

GS = gélose au sang

Jour 1

ISOLEMENT SUR MILIEUX SELECTIFS AVANT ET APRES ENRICHISSEMENT



Jour 2

Colonies suspectes TCBS : 2 et 3 mm, lisse, à bords réguliers, jaunes (saccharose +)

LE DIAGNOSTIC DE PRESOMPTION

- Attention oxydase faussement positif s'il y a une acidification consécutive à l'utilisation du saccharose
 - EF (Mobilité), GRAM (bacille gram négatif incurvé ou droit)
 - **Sérogroupe** : Tester les sérums anti O1 et O139 après vérification de l'absence d'auto-agglutination en eau physiologique
- Envoi au LNR pour confirmation de l'identification et sérotypage²

LE DIAGNOSTIC DE CERTITUDE

- Identification (API 20 E avec inoculum en eau physiologique)
 - (Test sensibilité O129³ sur MH)
 - 3 tubes EPA avec (0, 3% et 6%) de NaCl
 - Isolement sur TCS pour contrôler la pureté
- 24 H 37°C

Jour 3

V. cholerae est ONPG +, Indole +, LDC +, ODC + ADH - ;

Il cultive en absence de NaCl (souche non halophile) et en présence de NaCl jusqu'à 6%

¹ Eau Peptonée Salée Alcaline. Un 2^{ème} enrichissement peut être réalisé (on ensemence une autre EPA sans agiter le tube).

² le sérotypage est effectué au LNR (Laboratoire National de Référence) des *Vibrio*.

³ les souches appartenant au genre *Vibrio* sont classiquement sensibles au composé vibriostatique O129, mais des résistances acquises sont apparues rendant ce test moins fiable.

D - Identification des colonies suspectes :

1°-Recherche de Salmonella et Shigella: Prendre les colonies lactose -, H2S - et lac - H2S + .

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 +, H2S+ :mineure ou para B)

(si gaz +, H2S- :para A)

(si gaz -, H2S -- 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 -, H2S -, Lac et Saccharose) 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 exempté d'indole et sur TSI .incuber à 37 °C pendant 24 h.

Les colonies indole +, urée -, TDA - et gaz 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 sinon 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 -, H2S -, 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 O139.
- Si agglutination + : C'est un *Vibrio 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	-	+

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 +.

6°- Diarrhée post ATB : Détection de la toxine B dans les filtrats de selles par recherche d'un ECP sur des cultures cellulaires (cellules Vero , MRC5, Mac Coy).

7°-Dans les TIAC : Cas du botulisme, recherche de la toxine dans le sérum du malade et dans l'aliment suspect.

8°-Dans le cas du SHU : Recherche d'*E.coli O157* sur Mac conky + sorbitol (si sorbitol négatif)

Agglutination avec le sérum anti O157.

E – L'antibiogramme : Il est systématique, il permet une surveillance épidémiologique des résistances aux ATB.

Le traitement ATB n'est justifié qu'en cas de diarrhée très invasive avec selles sanglantes ou mucopurulentes, chez les personnes ayant un déficit immunitaire ou en cas de prolongation anormale d'une diarrhée d'origine bactérienne.

FIN.