

DIARRHEES BACTERIENNES AIGUES ET DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

1) INTRODUCTION :

- Diarrhée infectieuses aiguës: > à 3 selles molles ou liquides / jour (ou poids > à 300 g/j) pendant moins de 10J.
- Diarrhée e 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.

2) PHYSIOPATHOLOGIE :

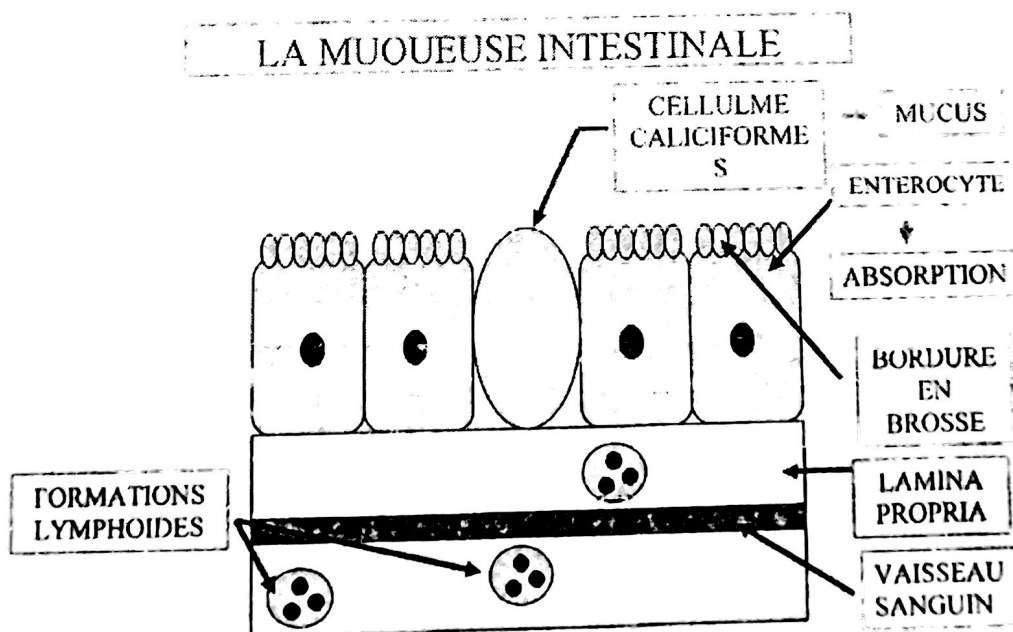
La muqueuse intestinale est formée de :

- 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⁺)



• L'intestin de l'homme dès la naissance colonisé par de nombreuses espèces bactériennes La plupart 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 entérotoxine)
 - 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 contaminés par les matières fécales de l'homme ou les animaux

3) ETIOLOGIES BACTERIENNES :

Il existe plus d'une dizaine d'agents bactériens responsables de diarrhées, nécessitant parfois une technique spécifique pour leur recherche. De nombreuses bactéries sont incriminées dans l'étiologie des diarrhées infectieuses aiguës. Certaines d'entre elles ont un pouvoir entéropathogène bien établi (*Salmonella* , *Shigella* , *Campylobacter* , *Yersinia*, etc.) . D'autres bactéries sont devenues pathogènes après acquisition de facteurs de virulence. C'est le cas en particulier d'*Escherichia coli*, espèce représentant 80 % de la flore intestinale aérobie de l'homme. *E. coli* est à la fois une bactérie commensale et une bactérie entéropathogène par l'expression de facteurs de virulence acquis et/ou constitutifs. Ainsi, un pouvoir entéropathogène est actuellement reconnu pour six pathovars d'*E. coli*.

Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement et de la diarrhée du voyageur. Les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) sont responsables de dysenteries proches de la shigellose. Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont retrouvés au cours des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique. Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont la cause de diarrhées infantiles persistantes souvent épidémiques dans les pays en voie de développement. Certains serotypes d'EPEC ont également été incriminés au cours du SHU. Les *E. coli* à adhésion diffuse (diffusely-adhering *E. coli* [DAEC]) et les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAggEC) sont à l'origine de diarrhées aqueuses persistantes chez l'enfant.

4) MECANISMES PATHOGENIQUES DES BACTERIES ENTEROPATHOGENES :

Entéro-invasif	Cytotoxique	Toxigénique	Adhérent
<i>Salmonella</i>	<i>C. difficile</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	EPEC
<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i>	EHEC
<i>Y. enterocolitica</i>	EPEC	<i>Y. enterocolitica</i>	EAggEC
<i>Campylobacter</i> EIEC	EHEC	ETEC	

5) DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE :

Le diagnostic repose essentiellement sur :

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

6) LA COPROCULTURE

I/ PRÉLÈVEMENT

Les selles sont recueillies par voie naturelle dans un récipient stérile ou par écouvillonnage rectal chez le nourrisson.

II/TRANSPORT

Le prélèvement doit être transmis rapidement au laboratoire, le cas contraire, il doit être conservé à +4°C et ce pour une durée maximale de 4H.

III/ ANALYSE

A / MATÉRIEL

1/ Milieux de culture et d'enrichissement :

a /milieux d'enrichissement :

- Milieu SFM (sélénite) pour les salmonelles
- Milieu EPA (eau peptonée alcaline) pour le Vibrio

b /milieux de culture :

- Gélose Hecktoen (Salmonelles, Shigelles, E.coli)
- Gélose BCP (E.coli GEI)
- GNAB ou gélose nutritive alcaline biliée (Vibrio)
- Milieu sélectif pour Campylobacter (gélose au sang frais de mouton additionné de mélange sélectif Campyloset-biomérieux ; milieu de Butzler, milieu de Skirow)

2/ Milieux et réactifs pour identification biochimique :

a/ Milieux :

- TSI / KIA (vibrio)
- Milieu de Fergusson (urée-Indol-TDA)
- Milieux contenant des acides aminés pour recherche des LDC et ODC
- Milieu à l'hippurate (Campylobacter)
- Galeries biochimiques Api system

b/ Réactifs :

- Réactif de Kovaks
- Réactif TDA
- Réactif à la Ninhydrine
- Réactif FB

3/ Réactifs pour identification antigénique :

- Sérums de groupage pour E.coli entéro-pathogènes
- Sérums de groupage pour Salmonelles, Shigelles et Vibrio.

4/ Autre matériel :

- Tubes stériles 10 cc
- Pipettes pasteur
- Anse de platine
- Lames pour agglutination
- Verre à pied
- Eau physiologique
- Vortex
- Étuve à 35°C
- Jarres + sachets générateur de micro aérophilie

B/ TECHNIQUE

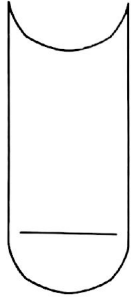
<u>1^{er} jour</u>	<ul style="list-style-type: none">- Prendre une noisette de selle, la dissoudre dans de l'eau physiologique en vortexant.- A partir de la suspension obtenue D, verser un petit volume dans les milieux d'enrichissement Sélénite et EPA (E₁)- Ensemencer les milieux de culture HK_D ,GNAB_D et 03 boites de milieu sélectif pour Campylobacter- Incuber HK ,GNAB,SFM et EPA à 35°C pendant 18-24H en atmosphère normale.- Incuber les boites de milieu pour Campylobacter pendant 48 H minimum en atmosphère micro aérophile à différentes températures 25 - 35 et 42 °C.
<u>2^{ème} jour</u>	<ul style="list-style-type: none">- A partir des premiers enrichissements effectués la veille E₁, ensemencer un deuxième Hektoen HK₁ à partir du SFM₁ ,et une deuxième GNAB à partir de l'EPA₁ soit HK₁ et GNAB₁- A partir des mêmes tubes d'enrichissements réaliser un deuxième enrichissement soit E₂ (SFM₂ et EPA₂) en versant un petit volume de la première suspension dans du SFM et de l'EPA.- Incuber à 35°C pendant 18-24 H
<u>3^{ème} jour</u>	<ul style="list-style-type: none">- A partir du deuxième enrichissement effectué la veille E₂, repiquer un HK et une GNAB soit HK₂ et GNAB₂.

C/ Lecture des cultures positives :

Elle se fait au 2^{ème} et au 3^{ème} jour pour la recherche de Salmonelles, Shigelles, E.coli GEI et Vibrio, et au bout de 48 H et 4 jours pour le Campylobacter.

1/ Recherche et identification des Salmonelles et des Shigelles :

- Elles sont recherchées dans toutes les selles quelque soit l'âge du patient, de la manière suivante :



- Repérer les colonies lactose négatif
- Réaliser un test pour recherche d'oxydase (les Salmonelles et Shigelles sont oxydase négative alors que le Pseudomonas est oxydase positive). on ne retiendra alors que les colonies oxydase négative.
- Ensemencer un TSI et un milieu de Fergusson à partir de 3 colonies oxydase négative.
- Incuber 4H à 35°C en atmosphère normale.
- Si Urée + au bout de 4H => ceci évoque un Proteus : ne pas prendre en considération.
- Si Urée - prolonger l'incubation à 18-24 H, et ensemencer également des tubes contenant les acides aminés (Lysine et Ornithine) pour la recherche des LDC et ODC ainsi qu'une boîte de contrôle.

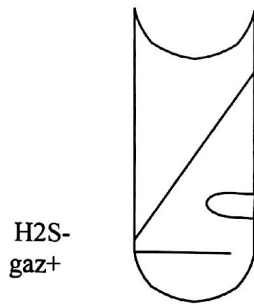
❖ Identification des Salmonelles :

- Elle se base sur l'aspect évocateur du TSI, ainsi que la présence de Lysine et d'Ornithine décarboxylase.



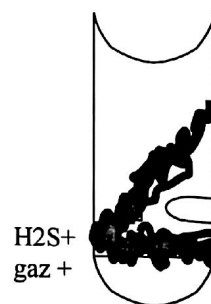
H₂S+
en moustache

Salmonella typhi



H₂S-
gaz+

S. paratyphi A



H₂S+
gaz +

Salmonelles mineures



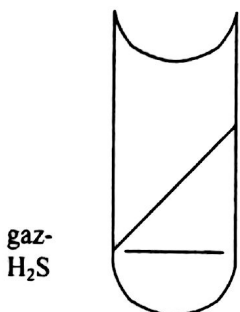
urée -
indol-

- Poursuivre l'identification en agglutinant avec des anti sérums en se référant au schéma retrouvé dans le tableau de Kauffman White ; vérifier au préalable l'agglutination en eau physiologique (souches auto agglutinables = souches Rough)

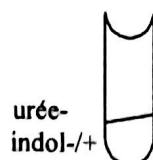
- Réaliser un antibiogramme selon les recommandations du CLSI

❖ Identification des Shigelles :

- Aspect évocateur du TSI et prédominance des réactions négatives.



gaz-
H₂S



urée-
indol-/+

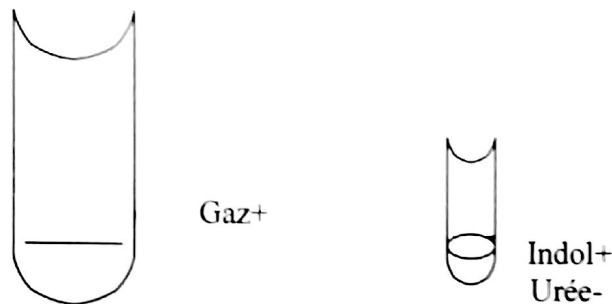
• Confirmer en agglutinant avec les sérums polyvalents et monovalents correspondants aux espèces dysenteriae, flexneri, boydi et sonnei

Réaliser un antibiogramme selon les recommandations du CLSI

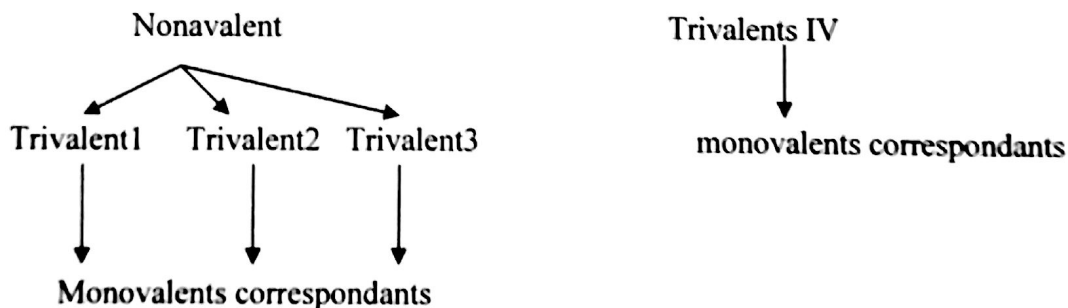
2/ Recherche d'E.coli GFI :

- Elles sont recherchées uniquement dans les selles des enfants présentant une diarrhée et dont l'âge est inférieur ou égal à 2 ans, de la manière suivante :

- Repérer sur gelose HK ou BCP 3 colonies lactose positif plates.
- Réaliser une suspension en eau physiologique pour chacune de ces colonies.
- A partir des précédentes suspensions, ensemercer un TSI et un milieu de Fergusson.
- Incuber 18-24 H à 35°C



- Vérifier au préalable l'agglutination en eau physiologique (Souches auto agglutinables= souches Rough)
- Agglutiner avec les différents sérums de groupage pour E.coli en suivant le schéma suivant :



- Réaliser un antibiogramme selon les recommandations du CLSI.

3 /Recherche de Campylobacter sp :

- Cette recherche devrait être effectuée sur toutes les selles reçues de la manière suivante :

- Sur GSF+ mélange inhibiteur ensemencée et incubée pendant 2 à 5 jours en microaérophilie, repérer les colonies grisâtres glissant à la surface de la gélose ou muqueuses en tâches de bougie ou envahissantes en voile.
- Réaliser sur ces colonies une coloration de Gram ;les Campylobacter se présentent sous forme de Bacilles à gram négatif en ailes d'oiseau incurvés ou spiralés.
- Identification du genre : Faire une Oxydase et une catalase :Les Campylobacter sont Oxydase+ , Catalase +.
- Identification de l'espèce de Campylobacter :

➤ Réaliser les tests suivants :

- Test à l'hippurate :

Mettre quelques colonies de *Campylobacter* dans quelque ml de solution d'hippurate de Sodium.

Incuber pendant 2 heures à 37°C

Rajouter quelque gouttes de Ninhydrine -> si virage au bleu => espèce *Campylobacter jejuni*

- Rechercher la production d'H₂S sur milieu TSI (Hajna Kigler)
 - Étudier les températures de croissance
 - Étudier la sensibilité à l'acide nalidixique 30 ug et à la Cefalotine.
- Utiliser une galerie biochimique Api System

Les caractères distinguant les différentes espèces sont retrouvés dans le tableau suivant :

Espèces	Hippurate	Catalase	Croissance à 25°C	Croissance à 42°C	Na	Cf	H ₂ S
<i>C.jejuni</i>	+	+	-	+	S	R	-
<i>C.coli</i>	-	+	-	+	S	R	-
<i>C.fetus</i>	-	+	+	-	S/R	S	-
<i>C.lari</i>	-	+	+	-	R	S	-
<i>C.hypointestinalis</i>	-	+	+	+	R	S	+
<i>C.non pathogènes</i>	-	-	-	+	-	-	+/-

Réaliser un antibiogramme selon les recommandations du CLSI et de la SFM

4/ Recherche de *Vibrio cholerae* :

- Cette recherche doit être effectuée exceptionnellement dans un contexte épidémiologique évocateur, de la manière suivante :
 - Repérer sur les GNAB ensemencées les colonies translucides, bleutées.
 - Réaliser une coloration de Gram : Bacilles Gram Négatif.
 - Réaliser un test à l'oxydase : Oxydase +
 - Ensemencer un milieu KIA + 3 tubes contenant les acides aminés pour la recherche des ADH, LDC, ODC.
 - Incuber les boîtes à 35°C pendant 18-24H
 - Identification du genre :

	ADH	LDC
<i>Vibrio</i>	-	+
<i>Aeromonas</i>	+	-
<i>Pleisiomonas</i>	+	+

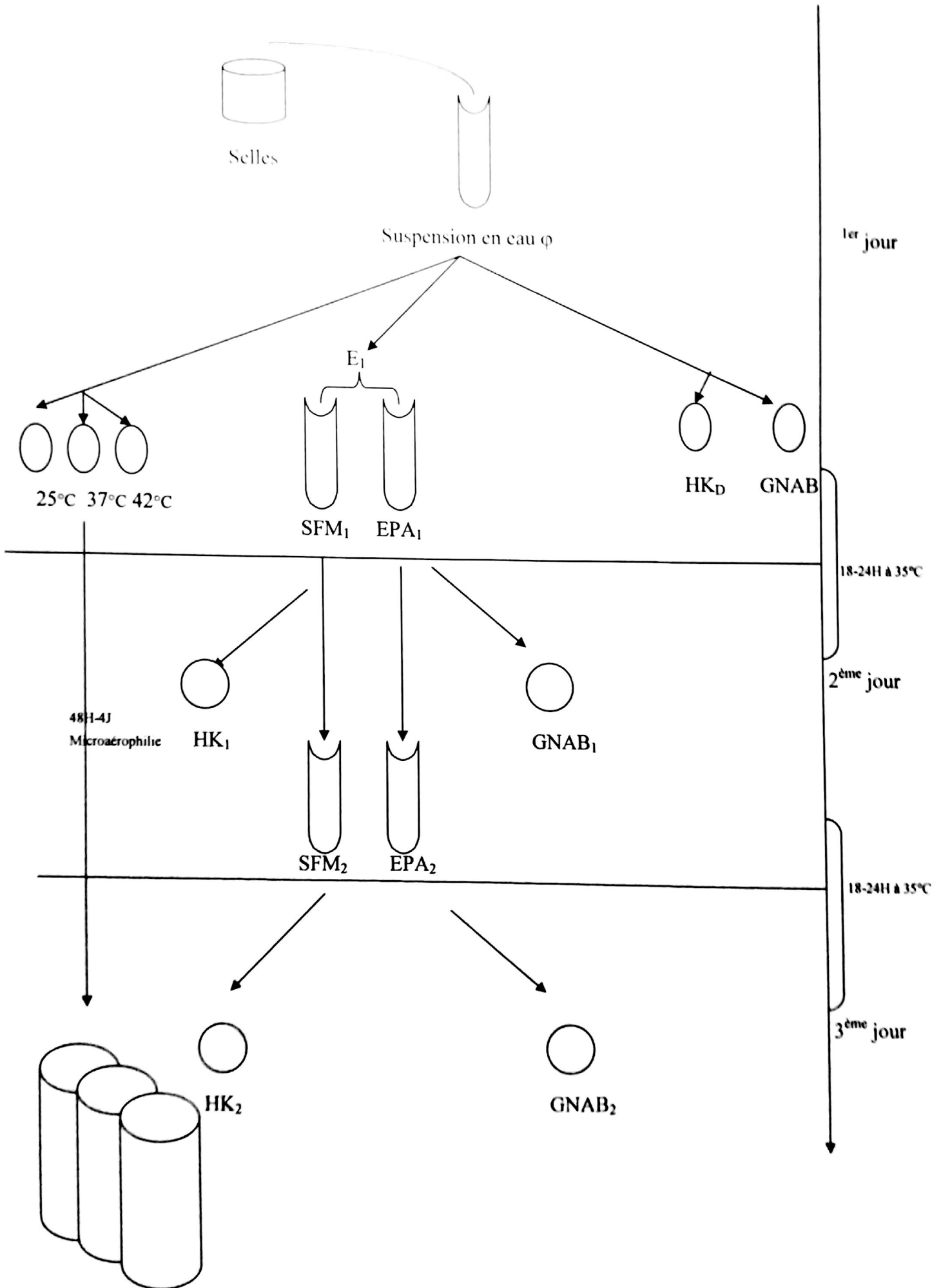
- Identification de l'espèce *Vibrio cholerae* :

En agglutinant à l'aide de sérums agglutinants spécifiques d'espèce O1 et non O1

- Différenciation des biotypes de *Vibrio cholerae* O1 en effectuant les tests suivants :

Biotype	eltor	cholerae
Caractère		
VP	+	-
Hémolyse	+	-
Sensibilité à la Colistine	R	S

ANNEXE : Schéma technique global de la coproculture



5) 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).

6) Dans les TIAC : Cas du botulisme, recherche de la toxine dans le s é r u m du malade et dans l'aliment suspect.

7) Dans le cas du SHU : Recherche d'E.coli 0157 sur Mac conky + sorbitol (si sorbitol négatif) Agglutination avec le sérum anti 0157.

- **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.