

Corynebacterium diphtheriae

Mme GHAROUT A.

- Les corynébactéries sont des bacilles à **Gram positif non sporulés, immobiles**, non filamenteux. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs et présentent classiquement une morphologie particulière **irrégulière** avec des renflements à une ou aux deux extrémités ; ils sont souvent disposés en amas ET groupement en « lettres chinoises ». Catalase +, Oxydase -.
- Très peu d'espèces sont pathogènes, la plus connue, *Corynebacterium diphtheriae* , responsable de la diphtérie.
- Parmi les espèces commensales, *C. jeikeium* et *C. urealyticum* se rencontrent avec une certaine fréquence, favorisées par des terrains fragilisés et les traitements antibiotiques à large spectre.

Habitat

- *C. diphtheriae* est une bactérie strictement humaine qui colonise essentiellement le rhinopharynx, plus rarement la peau.
- pays endémiques : porteurs sains +++

Transmission

- voie aérienne ou contact direct
- état immunitaire de la population
 - vaccination absente ou insuffisante
- épidémies surtout chez enfants

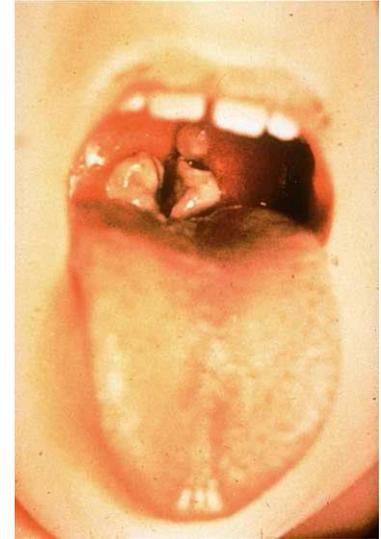
Pouvoir pathogène

1. Angine diphtérique

- angine à fausse membrane
- exsudat blanchâtre fibrineux
- amygdales
- qqfois signes toxiques
 - rythme cardiaque
 - paralysies (voile du palais)
 - mortalité élevée

2. Autres localisations

- • fosses nasales
- • larynx (croup asphyxie)
- • lésions cutanées (zones tropicales)
- • endocardites (toxicomanes, SDF)



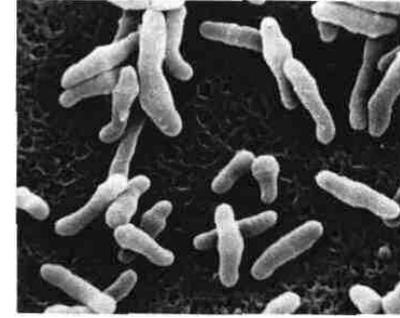
Facteurs de pathogénicité

- bactérie non invasive
- multiplication locale (muqueuse, peau)
- sécrétion d'une toxine
 - – lésions locales
 - – diffusion

toxine protéique

- – fragment B fixation sur cellule
- – fragment A inhibe synthèses protéiques de la cellule
- antigénique
 - anticorps protecteurs
 - vaccination (toxine formolée anatoxine)

Caractères morphologiques



C. diphtheriae se présente sous forme de bacilles de 1-8 μm / 0,3-0,8 μm , droits ou légèrement incurvés, avec des extrémités arrondies ou renflées (aspects en massues).

Il existe 4 biotypes de *C. diphtheriae* (belfanti, gravis, intermedius et mitis) et les cas de diphtérie sont dus aux biotypes gravis et mitis.

Les souches plus toxigènes dites « *gravis* » contiennent des bacilles plus courts que les autres (*intermedius* et *mitis*).

- Ces bacilles sont caractérisés par leur groupement, qu'on les observe dans les fausses membranes (aspects en lettres ou petits amas) ou en culture (gros amas en paquets d'épingles, en palissades, caractères chinois, en chiffres romains ou lettres majuscules : L, M, N, V, ...).
- Ce mode de groupement s'explique par une séparation incomplète au moment de la division bactérienne.

- **Caractères biochimiques**
- Pour porter un diagnostic de *C. diphtheriae*, il importe de différencier cette espèce des autres bactéries « corynéformes », fréquentes au niveau du rhinopharynx de l'individu normal.
- La seule possession d'une **catalase et d'une nitrate réductase** ne suffit pas pour écarter toutes ces autres espèces. L'étude du métabolisme glucidique est important ; on peut utiliser des milieux spéciaux, milieux liquides enrichis au sérum (tel le milieu de HISS) ; il y a **fermentation sans production de gaz du glucose, de la dextrine, du galactose, du maltose**. Il n'y a pas d'attaque du saccharose, du lactose du mannitol.
- L'étude du métabolisme protéique donne des renseignements complémentaires : **uréase (-), indole (-), gélatinase (-) et H₂S (+)**.
- On signale des hémolysines non diffusibles, une neuraminidase.

- **Diagnostic bactériologique**

- **Prélèvements**

- Un prélèvement de gorge doit être pratique devant toute angine à fausses membranes. :

- un écouvillonnage (plusieurs écouvillons) à la périphérie de la fausse membrane, plus rarement à un écouvillonnage nasal ou à un prélèvement de sérosités cutanées ou conjonctivales ;

- Le prélèvement doit être acheminé au laboratoire sans délai, avant dessèchement, en précisant clairement s'il existe une suspicion clinique de diphtérie.

L'utilisation d'un milieu de transport (type Amies) est possible avec une conservation à température ambiante ou à + 4 °C.

- A partir d'hémocultures dans un contexte d'endocardite, on peut aussi isoler des souches de *C. diphtheriae* non toxigènes.

- **Examen microscopique**
- En cas de suspicion de diphtérie ou dans le contexte d'un portage de *C. diphtheriae* dans l'entourage du patient, on procède à un examen des frottis de gorge après coloration :
 - de Gram à la recherche de bacilles à Gram positif ayant une morphologie évocatrice.
 - *C. diphtheriae* se présente sous forme de bacilles 8 µm/0,3 à 0,8 µm droits ou légèrement incurvés avec des extrémités arrondies ou renflées.
 - Ces bacilles sont caractérisés par leur groupement (disposés en petits amas, en palissades ou en « lettres chinoises »);
 - de Neisser, d'Ernst-Neisser ou de Loeffler permettant de colorer spécifiquement les granulations métachromatiques (emmagasine des phosphates inorganiques) aux extrémités.
 - Mais il faut savoir que les bactéries les plus toxigènes, biotype gravis, sont le plus souvent très courtes, sans morphologie évocatrice, sans granulations.

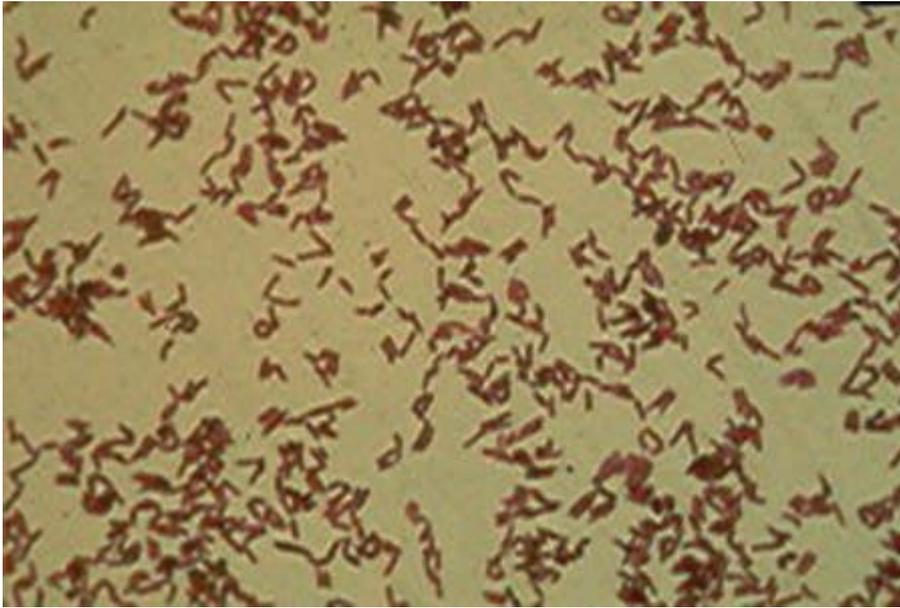


Fig. Examen direct de corynébactéries après coloration de Gram.

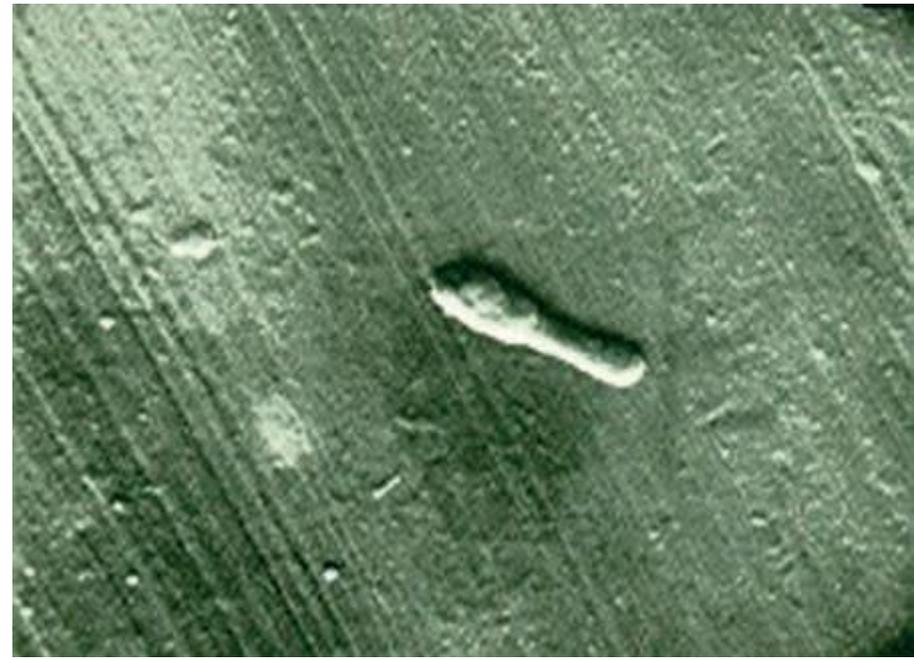
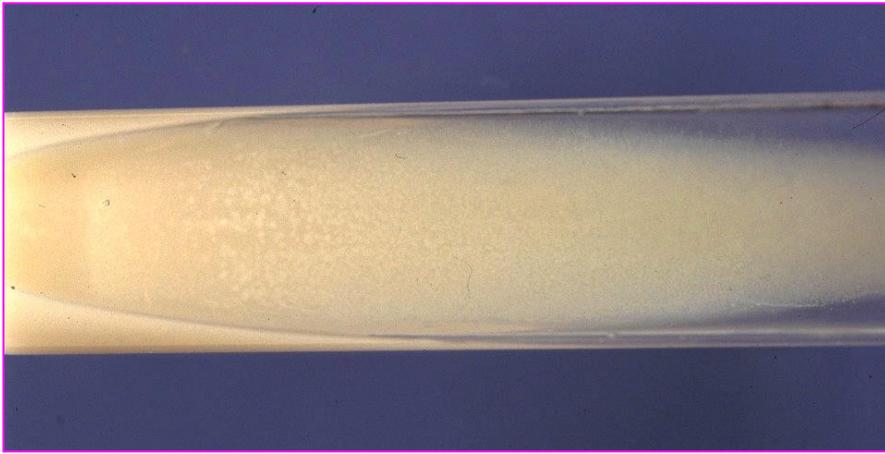


Fig. Aspect en massue d'une corynébactérie en microscopie électronique.

- **Mise en culture**
- La présence très fréquente de corynébactéries commensales au niveau des muqueuses et de la peau complique le diagnostic, et requiert des milieux sélectifs pour isoler *C. diphtheriae*.
- Deux types de milieux peuvent êtreensemencés :
 - ■ des milieux riches tels que Mueller-Hinton, trypticase soja, gélose au sang voire, si on en dispose, milieu de Loeffler au sérum de boeuf coagulé;
 - ■ des milieux sélectifs comme des géloses au sang à l'acide nalidixique ou géloses au sang sélectives contenant de la fosfomycine.
- On peut ensemencer un bouillon type coeur-cervelle.

- Pour *C. diphtheriae*, même si les milieux usuels cités ci-dessus permettent d'isoler les souche, le recours à des milieux spécifiques peut être utile, comme le **milieu de Tinsdale** (gélose cystine-téllurite). **Sur ce milieu**, les colonies de *C. diphtheriae* sont **noires** (réduction du téllurite de potassium) et entourées d'un halo brun fonce (production de H₂S).
- La majorite des corynebactéries poussent à 37 °C et leur croissance est facilitée sous 5 % de CO₂. Les cultures seront observées sur 48 heures, mais sur milieux riches, des colonies peuvent apparaitre en 16 a 18 heures.
- Après incubation à 37 °C en atmosphere enrichie avec 5 % de CO₂, il a été décrit une croissance en satellitisme de *Staphylococcus aureus* pour certaines souches lipophiles.
- Une β-hémolyse a été décrite pour certaines souches de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*.



Loeffler

en tâches de bougie



Tinsdale

réduction tellurite → tellure : col. noires
tellurite de K inhibe flore rhinopharynx
si cystinase+ → production H₂S halo noir

- **Identification**
- Classiquement, l'identification des corynebactéries était fondée sur plusieurs réactions : catalase, test de fermentation/oxydation, mobilité, réduction des nitrates, hydrolyse de l'urée et de l'esculine, production d'acides à partir du glucose, maltose, saccharose, mannitol et xylose, CAMP test et test de lipophilie.
- La plupart de ces tests étaient inclus dans des galeries manuelles, type Api CoryneR (bioMérieux) ou RapidID CB Plus systemR (Remel), ou automatisées type carte ANC sur VitekR 2.
- La spectrométrie de masse MALDI-TOF
- PCR

C. diphtheriae

- **NO₃** +
- **Pyrazinamidase** –
- **α-glucosidase** +

- 4 biotypes :
 - *gravis* : glycogène, amidon +
 - *mitis* : glycogène –
 - *belfanti* : glycogène –, **NO₃** –
 - *intermedius* : colonies ≈ 0,5 mm biochimiquement proche de *gravis* mais plutôt lipophile
 - (*ulcerans* récemment)

Diagnostic biologique

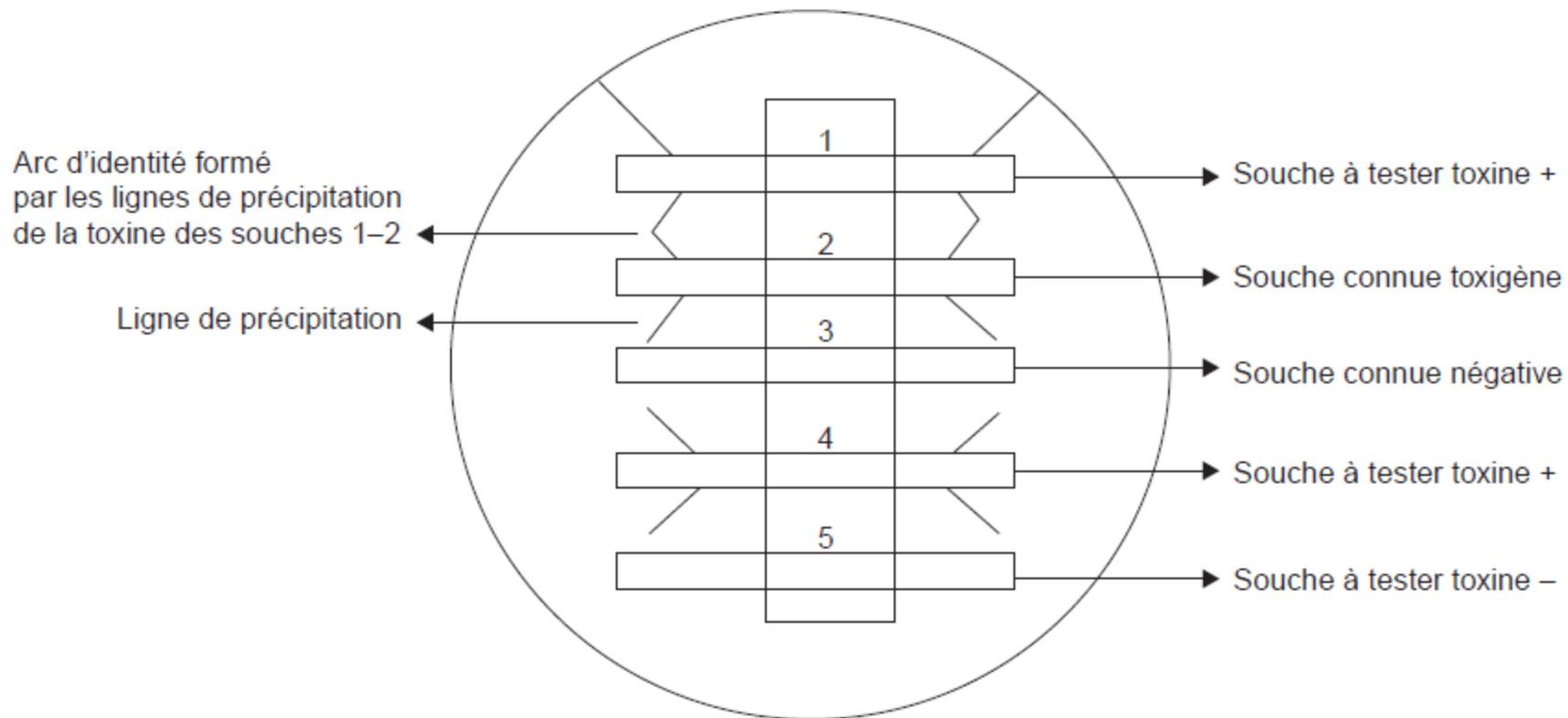
Caractères biochimiques et cultureux de *C. diphtheriae* et des espèces apparentées

Espèce	Ø (mm)	β-H	Lipoph	Nitrate réd.	Uréase	Acidification de			
						Glucose	Saccharose	Maltose	Amidon
<i>C. diphtheriae gravis</i>	2 - 4	V	-	+	-	+	-	+	+
<i>C. diphtheriae mitis</i>	2 - 4	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>C. diphtheriae belfanti</i>	2 - 4	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>C. diphtheriae intermedius</i>	0,5	-	+	+	-	+f	-	+f	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	2 - 4	+	-	v	+	+	-	+	-
<i>C. ulcerans</i>	2 - 4	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	2 - 4	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. xerosis</i>	2 - 4	-	-	+	-	+	+	-	-

■ Caractère toxinogène de *C. diphtheriae* :

• *Test d'Elek* →

- - c' est une technique d'immunodiffusion en milieu gélose .
- 2 souches connues *tox +* et *tox -* sont ensemencées sur milieu gélosé parallèlement à la souche étudiée.
- Les souches doivent avoir été isolées sur milieu nutritif simple et pas sur gélose au sang, le fer inhibant la production de toxine.
- On dépose perpendiculairement une bandelette imprégnée de sérum antitoxine diphtérique. Puis on observe les arcs de précipitation (Ag/Ac).
- Il ne s'agit pas d'une technique rapide, les arcs ne pouvant être visibles qu'après 2 à 6 jours.
- De plus, il existe des arcs non spécifiques. Si la souche à étudier est toxinogène, l'arc principal rejoint celui observé avec la souche connue *tox +*.



Mise en évidence de la toxinogénèse in vitro par la méthode d'Elek (principe).

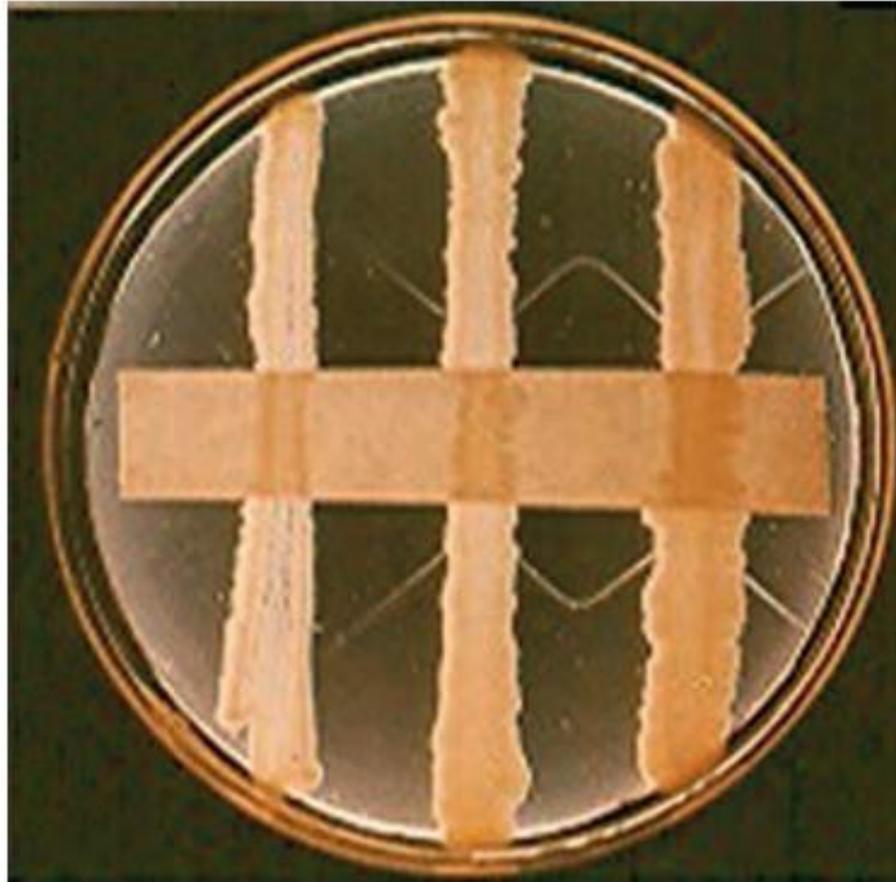


Fig. 32.7 Test d'Elek. De gauche à droite : souche de référence toxine-, souche à tester toxine +, souche de référence connue toxine +.

Recherche in vivo par inoculation au cobaye : c'est la technique de référence, qui consiste en l'injection par voie sous-cutanée à un cobaye d'un faible inoculum de *C. diphtheriae* obtenu par culture en milieu solide. Les isolats qui expriment la toxine induisent généralement la mort de l'animal en moins de 36 heures (parfois jusqu'en 5 jours)

- Recherche du gène *tox*