République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. Mira Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Cours pédagogique au profit des étudiants de microbiologie en Sciences de la Nature et de la Vie et des étudiants en biomédical

Bacilles à Gram négatif d'intérêt médical

Dr. GHAROUT-SAIT Alima

Préambule

Les infections bactériennes sont l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Il existe également un large éventail de niches pour les bactéries pathogènes chez l'homme et les voies d'infection varient considérablement. En fonction de la bactérie suspectée, un ou des prélèvements particuliers devront être réalisés dans le but d'isoler au mieux cette bactérie et ainsi de poser un diagnostic le plus fiable possible.

Une liste, non exhaustive, de bacilles à Gram négatif agents de maladies infectieuses est détaillée dans ce polycopié. Il traite l'identification des germes, en évoquant leur pouvoir pathogène et en détaillant les différentes approches diagnostiques directes ou sérologiques, classiques et modernes.

L'objectif de ce manuscrit est de fournir une large base de connaissances des bactéries responsables des maladies infectieuses couramment rencontrées. Cette connaissance est une condition préalable nécessaire pour le diagnostic, la thérapie et la prévention des maladies infectieuses. Cette synthèse s'adresse principalement aux étudiants de Master en microbiologie et en particulier la microbiologie fondamentale, les étudiants en biomédical (médecine, pharmacie, sciences vétérinaires) qui intègrent dans leur cursus la bactériologie médicale, et aux autres professionnels de la santé.

Ce manuscrit rend le domaine vaste et complexe de l'identification des bactéries cliniquement importantes plus accessible par l'utilisation de nombreuses illustrations : figures en couleurs avec légendes explicatives détaillées, des tableaux synthétiques. La plupart des chapitres sont structurés comme suit : généralités, pouvoir pathogène et habitat, diagnostic direct et indirect.

« Les espèces qui survivent ne sont pas les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements. »

Charles Darwin, 1859

Liste des Figures

Figure N:	**Page**
Figure 1: Coloration de Gram d'*Escherichia coli* montrant des Bacilles à Gram négatif (2 µm à 0,5 µm).	**2**
Figure 2: Les différents pathovars d'*E. coli* intestinaux EPEC: *E. coli* entéropathogène ; ETEC : *E. coli* entérotoxinogène ; EIEC : *E. coli* entéroinvasif ; EHEC : *E. coli* enterohémorragique ; EAEC : *E. coli* entéroagrégatif ; DAEC : *E. coli* à adhésion diffuse.	**6**
Figure 3 : Formation du pied distal dans le cas d'EHEC.	**8**
Figure 4 : Principales étapes du processus infectieux des *E. coli* enterohémorragiques.	**10**
Figure 5 : Schématisation du mode d'invasion des pathovars *E. coli* entéroinvasifs.	**11**
Figure 6: Culture d'*E. coli* sur **A**: gélose Drigalski; **B**: gélose Hektoen; **C**: gélose Mac Conkey; **D**: gélose EMB; **E**: gélose CPS.	**12**
Figure 7 : Aspect des colonies d'*E. coli* O157:H7. **A** : sur milieu SMAC et **B** : sur milieu chromogène.	**13**
Figure 8 : Identification d'*E. coli* sur galerie API20E.	**13**
Figure 9: Modèle de pathogenèse induite par *Shigella sp*.	**9**
Figure 10 : Classification de *Salmonella*.	**17**
Figure 11: Culture de *Salmonella* sur **A**: gélose Hektoen; **B**: gélose SS; **C**: gélose XLD; **D**: gélose ChromaAgar salmonella.	**18**
Figure 12: Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur gélose Mac Conkey (gauche) et Uriselect (droite).	**24**
Figure 13: *Cronobacter sakazakii* produisant un pigment jaune.	**26**
Figure 14: *Serratia marcescens* produisant un pigment rouge.	**29**
Figure 15: Colonie en essaimage de *Proteus mirabilis* sur gélose.	**30**
Figure 16: Culture de *Proteus mirabilis* sur milieu Uriselect.	**31**
Figure 17: Culture de *Y. enterocolitica* sur gélose CIN.	**35**
Figure 18: Étapes du diagnostic bactériologique de *Vibrio cholerae.*	**40**
Figure 19: Culture de de *V. cholerae* sur gélose TCBS.	**41**
Figure 20 : Aspect typique incurvé de *Vibrio cholerae.*	**41**
Figure 21 : Sérotypes de *Vibrio cholerae.*	**42**

Figure 22 : Différentes colonies de *P. aeruginosa.*	**48**
Figure 23: Production de pyocyanine et de pyoverdine caractéristique de *P. aeruginosa* sur milieux de King A et B. La pyocyanine est hydrosoluble (à gauche) et la pyoverdine soluble dans le chloroforme (à droite).	**49**
Figure 24 : Aspect des colonies de *Bordetella pertussis* sur milieu de Bordet-Gengou (à gauche) et milieu Regan-Lowe (à droite).	**57**
Figure 25 : Un exemple de coloration bi-polaire de *Pasteurella*.	**62**
Figure 26 : Culture de *Pasteurella* sur gélose au sang cuit.	**64**
Figure 27 : Culture de *Pasteurella* sur gélose VF en microaérophilie	**64**
Figure 28 : Culture en satellisme de *Heamophilus influenzae* sur gélose au sang en prisence de *S. aureus.*	**69**
Figure 29 : Exigence en facteurs X et V pour *Heamophilus influenzae* (à gauche) et en facteur V pour *Heamophilus parainfluenzae (*à droite).	**70**
Figure 30 : Culture de *Bartonella henselae* sur gélose au sang.	**74**
Figure 31 : Colonies de *Brucella* spp.	**78**
Figure 32 : Mise en culture d'un prélèvement pour recherche de *Legionella*.	**84**
Figure 33 : Aspect des colonies de *Legionella* à la loupe binoculaire (grossissement × 30).	**85**
Figure 34 : Vue au microscopie électronique à balayage de *Campylobacter jejuni*	**86**
Figure 35 : Exemple de kit de détection rapide de *Campylobacter* sur selle.	**88**
Figure 36 : Culture de *Campylobacter* sur gélose Skirrow (A), Karmali (B), sur gélose chromogène CampyFood (C).	**89**
Figure 37 : Jarre utilisée pour la création de l'atmosphère de microaérobie.	**89**
Figure 38: *Helicobacter pylori* sur les cellules de l'estomac.	**91**
Figure 39: Test de détection rapide par biopsie de *Helicobacter pylori.*	**93**
Figure 40: Broyeur de Potter.	**94**
Figure 41 : Principe du test respiratoire à l'urée pour la détection de *Helicobacter pylori.*	**96**
Figure 42: Test respiratoire de détection de *Helicobacter pylori.*	**96**
Figure 43 : Test de détection des antigènes de *H. pylori* dans les selles.	**97**

Liste des tableaux

Tableau N° :	Page
Tableau I: Génotypes selon la PCR et les étapes nécessaires pour l'attribution des phylogroupes d'*E. coli.*	**4**
Tableau II : Les différents pathovars d'*E. coli.*	**5**
Tableau III: Identification des *Salmonella.*	**16**
Tableau IV: caractères distinctifs des genres de la tribu des *Klebsiellae.*	**22**
Tableau V: Caractères différentiels des espèces des genres *Klebsiella* et *Raoultella.*	**23**
Tableau VI: Caractères distinctifs des principales espèces du genre *Enterobacter* et des espèces anciennement rattachées.	**27**
Tableau VII: Caractères distinctifs des principales espèces du genre *Serratia.*	**28**
Tableau VIII: Caractères distinctifs entre les espèces des genres *Proteus, Providencia* et *Morganella.*	**29**
Tableau IX : Caractères distinctifs des espèces du genre *Citrobacter.*	**32**
Tableau X: Caractères distinctifs de quelques espèces du genre *Yersinia.*	**35**
Tableau XI : Caractères différentiels de quelques espèces du genre *Vibrio.*	**41**
Tableau XII : Diagnostic différentiel entre les biovars *cholerae* et *El Tor.*	**42**
Tableau XIII : Caractères différentiels des *Aeromonas, Plesiomonas.*	**44**
Tableau XIV : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des espèces du genre *Pseudomonas.*	**50**
Tableau XV: Caractères différentiels des espèces d'*Acinetobacter* principalement rencontrées en microbiologie Clinique.	**54**
Tableau XVI : Caractère d'orientation diagnostique des *Bordetella.*	**58**
Tableau XVII: Caractères distinctifs entre les principales espèces du genre *Pasteurella.*	**65**
Tableau VIII: Caractères distinctifs de trois sous-espèces de *P. multocida.*	**65**
Tableau XIX: Caractères principaux d'identification des espèces humaines d'*Haemophilus.*	**71**
Tableau XX: Caractéristiques des biotypes d'*Haemophilus influenzae*.	**71**
Tableau XXI : Les différentes approches dans le diagnostic des infections à *Bartonella*.	**75**
Tableau XXII: Différenciation des espèces du genre *Brucella.*	**78**
Tableau XXIII: Caractères d'identification des différentes espèces du genre *Campylobacter.*	**90**

Sommaire

I. Bacilles à Gram Négatif non exigeants aéro-anaérobies facultatifs 01
I.1. Entérobactéries 01
I.1.1. *Escherichia coli* 01
I.1.2. *Shigella* 14
I.1.3. *Salmonella* 16
I.1.4. *Klebsiella Enterobacter et Serratia* 21
I.1.4.1. Genres *Klebsiella* et *Raoultella* 22
I.1.4.2. Genres *Enterobacter, Cronobacter, Hafnia* et *Pantoea* 25
I.1.4.3. Genre *Serratia* 27
I.1.5. Genres *Proteus, Providencia, Morganella* 29
I.1.6. Genre *Citrobacter* 30
I.1.7. Genre *Yersinia* 32
I.2. Genre *Vibrio* 37
I.3. Genre *Aeromonas* 43
I.4. Genre *Plesiomonas* 45
II. Bacilles à Gram négatif non exigeants aérobies stricts 46
II.1. *Pseudomonas aeruginosa* 46
II.2. *Acinetobacter* 51
III. Bacilles à Gram négatif exigeants aéro-anaérobies facultatifs 55
III.1. *Bordetella* 55
III.2. *Francisella* 59
III.3. *Pasteurella* 62
III.4. *Haemophilus* 66
III.5. *Bartonella* 73
III.6. *Brucella* 76
III.7. *Legionella* 80
III.7. *Legionella* 80
IV. Bacilles à Gram négatif Microaérophiles 86
IV.1. *Campylobacter* 86
IV.2. *Helicobacter pylori* 91

I. Bacilles à Gram Négatif non exigeants aéro-anaérobies facultatifs

I.1. Entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, le plus souvent courts (1 à 6 µm), droits, immobiles ou mobiles par une ciliature péritriche, de culture aisée, aéro-anaérobies facultatifs, fermentaires, oxydase négative, catalase positive (à l'exception de *Shigella dysenteriae* type 1), nitrate réductase positive (rares exceptions chez *Erwinia*).

Comme toutes les bactéries à Gram négatif, ils possèdent au niveau de leur paroi un lipopolysaccharide qui porte sur sa partie polysaccharidique des antigènes appelés O. Les flagelles portent des spécificités immunologiques appelées H. Certaines espèces possèdent aussi des antigènes capsulaires de nature polysaccharidique (antigènes K). Tous ces antigènes sont de structure très variable. Ils servent ainsi à définir des sérovars (ou sérotypes) à l'intérieur d'une espèce.

C'est la famille bactérienne la plus importante en médecine humaine. Cette famille comprend des genres et des espèces qui causent des maladies avec des symptômes cliniques typiques (fièvre typhoïde, dysenterie, peste) ainsi que de nombreux opportunistes qui causent principalement des infections nosocomiales.

Près de 200 espèces ont été décrites pour plus de 40 genres, mais seules une vingtaine d'espèces sont plus communément isolées en bactériologie clinique et appartiennent aux genres *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella, Yersinia*. D'autres genres peuvent être isolés rarement ou exceptionnellement chez l'homme : *Cedecea, Ewingella, Erwinia, Kluyvera, Leminorella, Pantoea, Rahnella, Rouxiella chamberiensis*.

I.1.1. *Escherichia coli*

I.1.1.1. Généralités

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois la bactérie *Escherichia coli,* bactérie isolée à partir de selles de nourrissons, qu'il nomma tout d'abord *Bacterium coli commune*.

Ce n'est que 70 ans plus tard que le nom de *Escherichia coli (E. coli)* est réellement retenu en hommage aux travaux de T. Escherich.

E. coli est une bactérie à Gram négatif (Fig. 1) qui appartient à la classe des *γ-Proteobacteria,* à l'ordre des Enterobacteriales et à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est est la bactérie aérobie-anaérobie facultative majoritaire du tractus gastro-intestinal chez les mammifères. En effet, si elle peut être retrouvée comme saprophyte de l'eau et des boues, sa niche principale est

l'intestin de l'Homme et des animaux à sang chaud. Ainsi, plus de 90% de la population humaine est colonisée par *E. coli*.

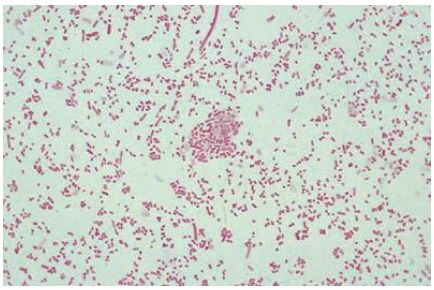

Figure 1: Coloration de Gram d'*Escherichia coli* montrant des Bacilles à Gram négatif (2 µm à 0,5 µm).

Le genre ***Escherichia*** comporte cinq espèces isolées chez l'homme: *E. coli*, *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris*. *E. blattae* isolée de cafards n'a jamais été retrouvée dans des prélèvements humains. *E. hermanii* et *E. vulneris*, dont les colonies apparaissent souvent pigmentées en jaune, ont été retrouvées dans des prélèvements de plaies. Cependant, au sein du genre *Escherichia*, l'espèce *E. coli* représente la quasi-totalité des isolats humains. L'espèce *E. coli* présente une grande diversité sur le plan génétique et sur le plan du pouvoir pathogène.

L'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement.

I.1.1.2. Habitat

E. coli appartient à la microflore commensale de l'Homme et de nombreux animaux. Le tractus digestif constitue son habitat primaire. Cette bactérie est présente principalement au niveau du colon à des concentrations environ > 10^6 UFC (Unité Formant Colonie)/ g de contenu intestinal. Elle est rejetée dans l'environnement *via* les fèces à une concentration d'environ 10^8 UFC/g de fèces. Elle se retrouve dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les fumiers des animaux d'élevage ou par les déjections des animaux d'élevage ou des animaux sauvages.

I.1.1.3. Pouvoir pathogène

Les souches de *E. coli* pathogènes sont capables de se multiplier et de persister dans le tractus digestif de l'hôte en contournant les défenses immunitaires et d'induire des dommages cellulaires. L'étude des différents modes d'intéractions entre l'hôte et la bactérie lors des infections permet de classer les souches de *E. coli* pathogènes en deux principaux pathotypes regroupant les pathogènes extraintestinaux (ExPEC), responsables d'infections urinaires, de

méningites chez les nouveau-nés ou de septicémies et les pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de maladies entériques

- **Classification selon le sérotype**

Comme toutes les autres entérobactéries, *E. coli* possède trois antigènes majeurs. L'antigène somatique O (Ag O) est un composant du lipopolysaccharide qui entre dans la composition de la membrane externe des bacilles Gram négatif. Les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le cluster de gènes *rfb.* L'antigène flagellaire H (AgH) est de nature protéique et entre dans la construction du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. Il est généralement codé par le gène *fliC.* Cependant, certaines souches perdent leur mobilité et sont classées comme non mobiles. L'antigène capsulaire K (Ag K) est une protéine de surface.

La méthode généralement utilisée pour la classification des *E. coli* par sérotypage est basée sur le schéma décrit par Kauffmann (1947), qui associe ces différents antigènes transmis verticalement par les *E. coli* à la génération suivante. La méthode immunologique de typage par agglutination sur lame à l'aide d'immunsérums spécifiques est un moyen rapide mais non exhaustif de typer les souches. La détection par biologie moléculaire des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AgO (*wzx* et *wzy*) et du gène *fliC* pour l'AgH est un autre moyen d'identifier le sérotype des souches. Selon ce schéma de classification, il existerait plus de 174 sérogroupes O, 80 sérogroupes K et 56 sérogroupes H différents avec plus de 9 000 combinaisons possibles.

- **Classification selon les phylogroupes**

Un phylogroupe se définit par l'étude phylogénétique qui s'intéresse à la classification des individus en groupes selon l'identification de critères moléculaires communs. En 1984, les travaux d'Ochman et Selander ont permis de répartir les souches de *E. coli* en quatre grands groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D).

Les souches d'*E. coli* commensales et celles responsables de diarrhées appartiennent majoritairement aux groupes A et B1, alors que celles responsables de pathologies extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies et méningites) appartiennent majoritairement aux groupes D et B2.

La nouvelle version révisée de la méthode de Clermont *et al.* 2013 mets en évidence la présence des quatre groupes phylogénétiques majeurs A, B1, B2 et D précédemment décrits ainsi que trois groupes mineurs nommés C, E et F (tableau I).

La détermination des groupes phylogénétiques d'*E. coli* est réalisée par PCR. La méthode implique la recherche de quatre gènes et la classification des différents phylogroupes selon la présence/absence de chacun de ces gènes (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2).

Les gènes : *chuA* qui est impliqué dans le transport de l'hème, *yjaA* dont le rôle est inconnu et *TspE4C2* qui est un fragment aléatoire d'ADN ont été utilisés. *arpA* est présent chez tous les *E. coli* à l'exception des souches appartenant aux phylogroupes B2 et F.

Tableau I: Génotypes selon la PCR et les étapes nécessaires pour l'attribution des phylogroupes d'*E. coli*.

Génotype selon la PCR quadruplex				**Phylogroupe**	**Etape complémentaire**
arpA (400 bp)	*chuA* (288 bp)	*yjaA* (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
+	-	+	-	A ou C	Faire PCR C Si C+ donc C, sinon A
+	+	-	-	D ou E	Faire PCR E Si E+ donc E, sinon D
+	+	-	+	D ou E	Faire PCR E Si E+ donc E, sinon D
+	+	+	-	E ou clade I	Faire PCR E Si E- donc clade I

- **Différents pathovars d'*E. coli***

Les souches de *E. coli*, agents de diarrhées, forment un groupe très hétérogène au regard des mécanismes en cause dans leur pathogénicité. Ces pathovars sont les suivants:
les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entéroagrégatifs (EAgg ou EAEC), les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) (tableau II).

Tableau II : Les différents pathovars d'*E. coli*

Pathovars	Hôtes	Sites de colonisation	Maladie	Réservoirs et sources	Adhésion	Marqueurs génétiques	Sérotypes ou Sérogroupes majeurs
EPECt *E. coli* entéropathogène typique	Enfant < 5 ans, adulte	Intestin grêle	Diarrhée aqueuse abondante	Humain	Attachement et effacement	*eae*, *bfp*	O55 :[H6]b, O86 :H34 , O111 :[H2], O114 :H2, O119 :[H6], O127 :H6, O142 :H6, O142 :H34
EPECa *E. coli* entéropathogène atypique				Humain, animal		*eae*, absence de*bfp*	O26 :[H11], O55 :[H7], O55 :H34, O86 :H8, O111 :[H8], O111 :[H9], O111 :H25, O119 :H2, O125 :H6, O128 :H2
EHEC (STEC) *E. coli* entérohémorragique	Adulte, enfant	Iléon distal, colon	Diarrhée aqueuse, colite hémorragique, SHU	Humain, animal, aliment, eau	Attachement et effacement a	*stx*, *eae* (présence ou absence selon les souches)	O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157, O91
EIEC/*Shigella E. coli*	Enfant < 5 ans, adulte, voyageurs, Patients immunodéprimé	colon	higellose/dysenterie bacillaire, potentiel SHU	Humain, animal, aliment, eau	Absence (invasif)	*ipaH*, *ial*, *stx*	O28, O29, O112, O124, O136, O143,
ETEC *E. coli* entérotoxinogène	immunodéprimé, enfant < 5 ans, voyageurs	Intestin grêle	Diarrhée aqueuse et persistante	Aliment, eau, humain, animal	Facteur de colonisation (FC)	CF, LT, STa	O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159, O173
EAEC *E. coli* entéroagrégatif	Enfant (cas plus sévères entre 18 mois et 5 ans),	Intestin	Diarrhée aqueuse abondante	inconnu	Adhésion diffuse et/ou invasive	Gène de l! opéron *dra* (Afa/Dr)	O1, O4, O6, O17, O75, O77
	Adulte		Peut contribuer au développement de la maladie de Crohn				
EAEC *E. coli* entéroagrégatif	Adulte	Intestin grêle et/ou colon	Diarrhée du voyageur, SHU (*stx*+)	Adulte occasionnellement	Formation en briques empilées et/ou invasif	*aggA*, *aggR*, *aap* *pic*, pAA	O3, O15, O44, O86, O77, O111, O127
	Enfant		Diarrhée persistante				
AIEC *E. coli* à adhérence invasive	Adulte et enfant	Intestin grêle	Maladie de Crohn	inconnu	Absence (invasif)	Non identifié	O2, O6

La figure suivante schématise les différents pathovars.

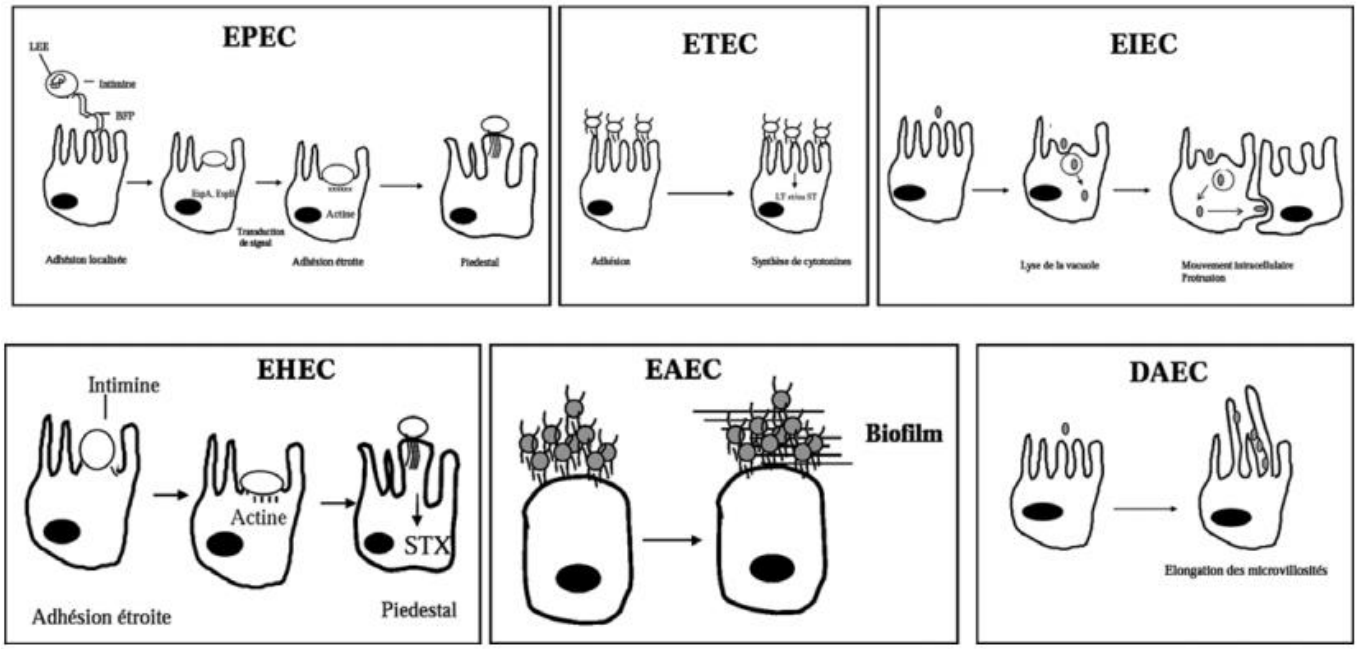

Figure 2: Les différents pathovars d'*E. coli* intestinaux EPEC: *E. coli* entéropathogène; ETEC: *E. coli* entérotoxinogène; EIEC: *E. coli* entéroinvasif; EHEC: *E. coli* enterohémorragique; EAEC: *E. coli* entéroagrégatif; DAEC: *E. coli* à adhésion diffuse.

1. *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC)

Ils sont responsables des diarrhées du voyageur « turista », des nourrissons et des enfants dans les pays en voie de développement. Elles sont fréquentes dans les pays chauds et humides. Le mode d'infection des ETEC s'effectue tout d'abord par la colonisation de l'intestin grêle nécessitant des facteurs d'adhésion sous forme de fimbriae puis par la production d'entérotoxines thermostable (ST) et thermolabile (LT).

L'adhésion des ETEC aux entérocytes dépend essentiellement de facteurs de colonisation (CF) plasmidiques. Les CF sont multiples et sont appelés "colonization factor antigen", (CFA), "coli surface antigen", (CS) ou "putative colonization factors", (PCF).

Les entérotoxines sont la cause d'une diarrhée aqueuse accompagnée d'une profonde déshydratation. Les entérotoxines thermolabiles font parties de la famille des entérotoxines cytotoniques dont fait partie la toxine cholérique. Les ETEC peuvent produire une ou plusieurs toxines en combinaison.

Les toxines LT stimulent la production d'AMP cyclique dans les cellules cibles. Après pénétration dans la cellule, le clivage protéolytique et la réduction d'un pont disulfure entraînent une activation permanente de l'adénylate-cyclase et à la transformation de l'ATP en AMP cyclique ce qui contribue à augmenter la sécrétion d'ion Cl^- et conduit à une fuite passive

d'eau entraînant une diarrhée aqueuse. Les entérotoxines thermostables ST sont moins connues mais elles engendrent de même un flux d'eau dans les entérocytes.

2. *E. coli* entéropathogènes (EPEC)

Les EPEC sont principalement responsables de diarrhées accompagnées de fièvre, de vomissements et de déshydratation chez les enfants de moins de 2 ans.

Le réservoir principal des EPEC est le tube digestif de l'Homme, plus précisément des enfants malades ou asymptomatiques, des adultes asymptomatiques incluant les mères et les personnes au contact d'enfant.

L'infection s'effectue initialement par l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales, par la capacité d'une protéine membranaire, **l'intimine**, à causer des **lésions d'attachement et d'effacement**. Il existe deux classes d'EPEC, les EPEC de classe I ayant une adhérence localisée et les EPEC de classe II ayant une adhérence diffuse sur toute la paroi cellulaire des entérocytes.

La gastro-entérite due aux EPEC sévit fréquemment dans de nombreux pays d'Amérique centrale, d'Amérique latine, dans les régions tropicales et dans les pays en voie de développement. Les sérogroupes principalement responsables de ces épidémies sont O111 et O26.

La première étape d'interaction entre la bactérie EPEC et les cellules hôte est une adhésion localisée (LA) sous forme de petits amas bactériens très serrés par l'intermédiaire de pili en faisceaux **« BFP » (bundle-forming pilus)** codés par l'opéron ***bfp,*** situé sur un gros **plasmide EAF**.

La pathologie induite par les lésions **A/E** est caractérisée par une forte adhérence de la bactérie sur les entérocytes, par l'effacement des microvillosités et la destruction du cytosquelette de la cellule affectée (Fig. 2).

Dans la zone en contact étroit avec la bactérie, une forte condensation de filaments d'actine est observée. Il s'en suit une activation de la protéine kinase C provoqué par l'augmentation d'ion calcium dans les entérocytes. Ces mécanismes, encore mal élucidés, provoqueraient une diarrhée due à une perte de capacité d'absorption des entérocytes et à une hypersécrétion d'eau et d'ions.

3. *E. coli* enterohémorragiques (EHEC)

Le pathovar **EHEC** également appelé STEC (*E. coli* producteurs de Shiga-toxines) ou VTEC (*E. coli* producteurs de vérotoxines) est responsable de troubles variés.

Depuis leur première identification en 1982, les infections à EHEC sont devenues une préoccupation de santé publique importante dans plusieurs régions du monde, notamment sous

leur forme épidémique et à travers leurs complications que sont le syndrome hémolytique et urémique (**SHU**) chez l'enfant et les micro-angiopathies thrombotiques (MAT) chez l'adulte. Le sérotype majeur est représenté par le sérotype **O157:H7.**

La virulence des EHEC est associée à la présence de **toxines** appelées **Shiga-toxines (Stx)** et à la présence du gène ***eae,*** responsable des lésions d'attachement-effacement au niveau du côlon et du caecum.

Les **Stx** ou **Vérotoxines** sont les principaux facteurs de virulence des EHEC. Ce sont des exotoxines ayant un effet cytopathogène sur certaines lignées cellulaires (cellules Vero, HeLa, KB) et présentant une parenté avec la toxine de Shiga produite par *Shigella dysenteriae* type 1. La synthèse de ces toxines est codée par des **bactériophages** contrairement à celle de la toxine de Shiga codée par le chromosome.

Deux grands types de Sx, **Stx1** et **Stx2**, et de nombreux variants Stx1 ou Stx2 ont été identifiés : 3 variants pour Stx1 et au moins 6 variants pour Stx2.

La **colonisation** du tube digestif par les EHEC est une étape **majeure** de la physiopathologie et s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites d'**attachement-effacement (A/E),** qui se limitent au côlon et au caecum. Les lésions A/E, d'abord décrites chez le pathovar d'**EPEC**, se caractérisent par un **effacement des microvillosités** des cellules de l'épithélium intestinal dans la zone de contact entre la bactérie et la cellule cible. Un **piédestal**, constitué d'actine cellulaire, sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon très étroite, est alors constitué (Fig. 3).

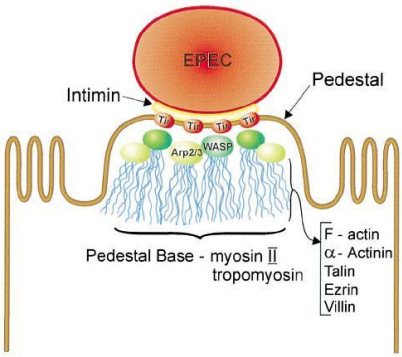

Figure 3 : Formation du pied distal dans le cas d'EHEC

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le **locus chromosomique LEE**, codant un **système de type III**, et trois classes de protéines sécrétées par l'intermédiaire de celui-ci :

• le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) code une protéine de membrane externe de 94 kDa appelée intimine.

• le gène *tir* code le co-récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated intimin receptor), une protéine de 78 kDa injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce à un système de sécrétion de type III. Tir s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte ;
• les gènes *esp* (EPEC-secreted protein) codent pour une seringue moléculaire (espA, espB, espD) impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (Tir, map, espF, espG, espH…) ;

Des souches LEE-négatives ont cependant été associées à des SHU. Ces souches EHEC atypiques possèdent donc d'autres facteurs d'adhésion permettant une colonisation de la muqueuse colique aussi efficace que l'A/E.

- **Sérotype O157:H7**

L'ancêtre de EHEC O157:H7 est un EPEC de sérotype O55:H7 (β-glucuronidase positive et fermentant le sorbitol).
Ce clone aurait également acquis le plasmide de virulence **pO157** et aurait donné naissance au clone **O157:H7 « sorbitol -** » de répartition mondiale.

Les bovins et autres ruminants représentent le réservoir principal des EHEC. De nombreuses épidémies ont été associées à de la viande de boeuf (USA, Canada, GB, Japon, Australie) et à des fromages à base de lait cru. Une grande variété de produits alimentaires a été également impliquée dans des épidémies d'infections à EHEC, comme les yaourts, les graines germées et la laitue.

Le mode de contamination est décrit principalement par contact indirect lors de l'ingestion d'un aliment contaminé. Le contact direct avec des animaux de la ferme ou d'une eau contaminée est également mis en cause. La contamination directe de personne à personne est exceptionnelle, elle a lieu lors de contact direct féco-oral.

La période d'incubation de deux à dix jours est plus longue que celle observée pour les autres diarrhées infectieuses.

Les étapes essentielles du processus d'infection par les STEC sont illustrées dans la figure 4.

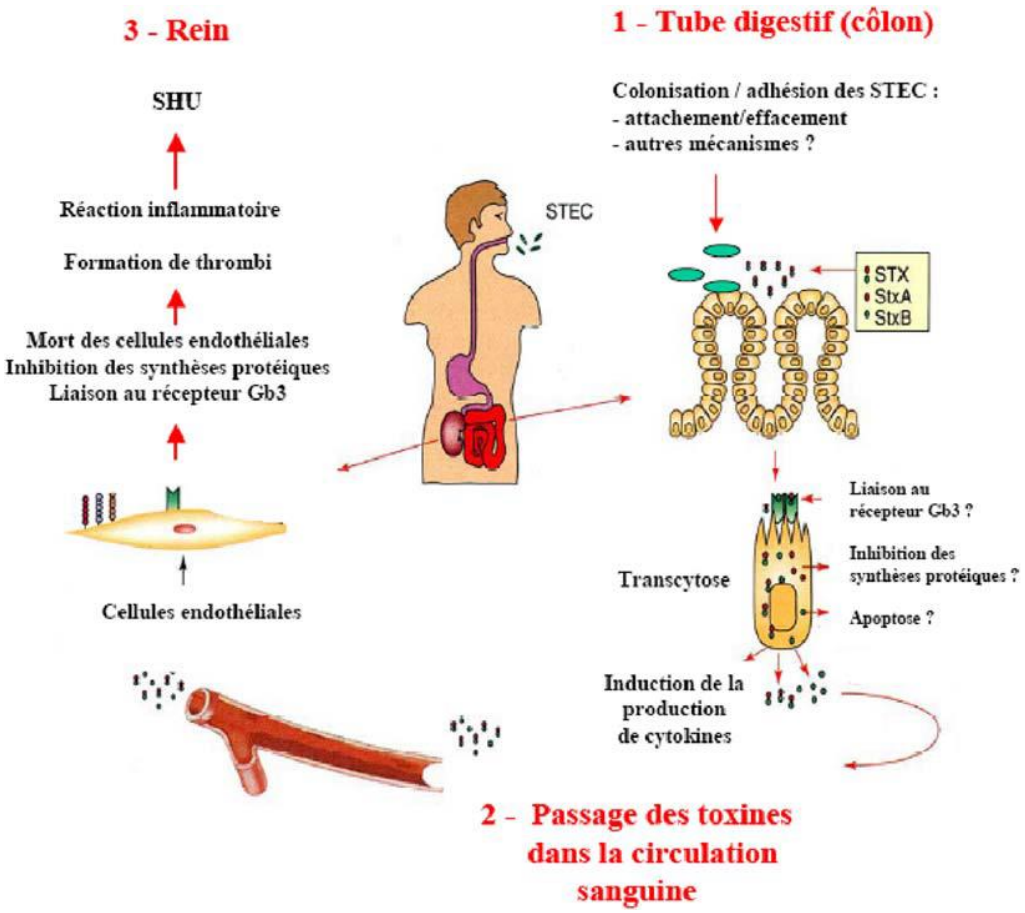

Figure 4 : Principales étapes du processus infectieux des *E. coli* enterohémorragiques. STEC : *E. coli* producteur de Shigatoxine ; SHU : syndrome hémolytique et urémique.

- **Un pathogène hybride : *E. coli* O104: H4**

Les souches responsables de deux épidémies en Allemagne et France (mai-juin 2011) appartenaient au sérotype ***E. coli* O104:H4** et étaient génétiquement reliées. Cette souche est un pathogène hybride possédant à la fois des facteurs de virulence **d'EHEC (gène stx2),** des facteurs d'adhésion des **EAEC (AAF aggr+)** et des facteurs de pathogénicité des **ExPEC (HPI, aérobactine).** La souche avait en plus acquis un plasmide CTXM-15 conférant à la souche une résistance par bêtalactamase à spectre étendu.

4. *E. coli* entéroinvasifs (EIEC)

Les *E. coli* entéroinvasives sont à l'origine de syndromes dysentériques. La dysenterie engendrée est caractérisée par des crampes abdominales et par la présence d'un mucus sanglant dû à la destruction des cellules du colon et de la présence de leucocytes dans les selles. Leur pathogénicité est proche de celle des Shigelles. Ces *E. coli* ont acquis un plasmide, nommé **pINV** (responsable de la virulence), leur conférant la capacité à envahir les cellules épithéliales, ce qui provoque des ulcérations de la muqueuse du gros intestin chez les personnes atteintes (Fig. 5). Les souches d'EIEC appartiennent aux sérogroupes: O28, O112, O124, O136, O143,

O144, O147, O152. Elles sont rares, ainsi, on ne fait pas de recherche systématique par coproculture.

L'inoculum infectant est de 10^8 bactéries (vs 10^2 pour *S. dysenteriae*).

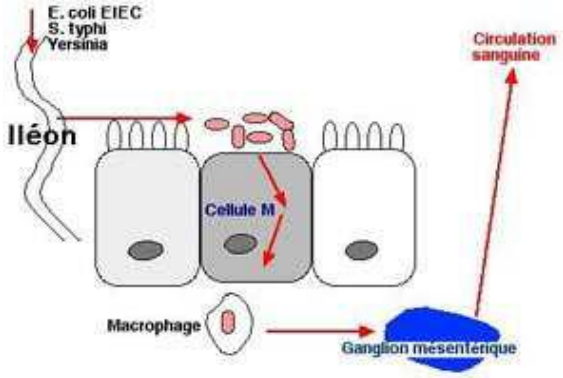

Figure 5 : Schématisation du mode d'invasion des pathovars *E. coli* entéroinvasifs

5. *E. coli* entéro-agrégatives

Les EAEC sont reconnues comme une cause de diarrhée endémique et épidémique dans le monde entier. La diarrhée provoquée par les EAEC est souvent acqueuse, mais elle peut être accompagnée de mucus ou de sang. Les sérogroupes qui ont été identifiés dans le groupe des EAEC sont : O3, O7, O15, O44, O77, O86, O104, O111, O126 et O127.

Les souches EAEC se caractérisent par un type d'adhésion agrégative en " briques empilées " à l'origine de nécrose au pôle apical des villosités (Fig. 2) avec oedème inflammatoire et hémorragique de la sous-muqueuse. Ce modèle d'adhésion est codé par des gènes localisés sur une famille de plasmides de virulence appelés les **plasmides** de **pAA**. Ces plasmides codent les gènes nécessaires pour la synthése des fimbriae **d'adhérence agrégative (AAFs)** et favorisent l'adhérence d'EAEC à la muqueuse intestinale.

Quatre variants d'AAFs (AAF/I, AAF/II, AAF/III et Hda) ont été identifiés. Deux autres toxines, ShET1 (« *Shigella* enterotoxin 1 ») et EAST1 (« *E. coli* ST1 »), peuvent être trouvées dans d'autres isolats EAEC, mais leur rôle dans la pathogénie n'est pas complètement connu. L'expression de la plupart de ces facteurs de virulence semble être sous la dépendance de l'activateur de **transcription AggR**. De plus, les enquêtes épidémiologiques relatives aux souches EAEC montrent que la présence du régulon AggR chez les souches incriminées est associée à l'apparition de cas de diarrhée *(*O104:H4*)*.

6. *Escherichia coli* à adhesion diffuse (DAEC)

Les DAEC engendrent une **adhérence diffuse**. Cette adhérence est favorisée par des protéines codées par une famille d'opérons, qui incluent à la fois les adhésines fimbriales (Dr.

et F1845) et les adhésines afimbriales réunies sous le nom de Afa-Dr. Les isolats de DAEC qui expriment Afa-Dr en colonisant l'intestin grêle, engendrent des cas de diarrhée chez les enfants entre 5 et 18 mois d'âge. Par ailleurs, ils peuvent coloniser le tractus urinaire et être à l'origine d'infection urinaire récurrente chez l'adulte.

❖ **Les *E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC)**

Les souches ExPEC se caractérisent par leur pouvoir de coloniser d'autres systèmes en dehors du système gastro-intestinal et elles représentent un risque sanitaire plus élevé que celui des *E. coli* pathogènes intestinales. Ce groupe comprend les *E. coli* uropathogènes (UPEC) responsables d'infections urinaires (cystites, pyélonéphrites), les *E. coli* associées à des méningites et des septicémies (neonatal meningitis *E. coli* ou NMEC) ainsi que le pathovar aviaire « *Avian Pathogenic E. coli* » (APEC).

I.1.1.4. Diagnostic microbiologique

- **Prélèvements**

Le prélévement sera en fonction du type d'infections : urines, sang, pus, LCR, selles, ascite, etc.

- **Culture**

Différents milieux de culture des entérobactéries peuvent être utilisés pour la culture d'*E. coli* (Fig. 6). La fermentation du lactose est le paramètre essentiel lors de la lecture sur gélose Drigalski, Hektoen, Mac Conkey ou EMB.

La lecture sur milieu chromgénique tel que CPS est basée sur la presence de colonies roses (bêta-galactosidase positive).

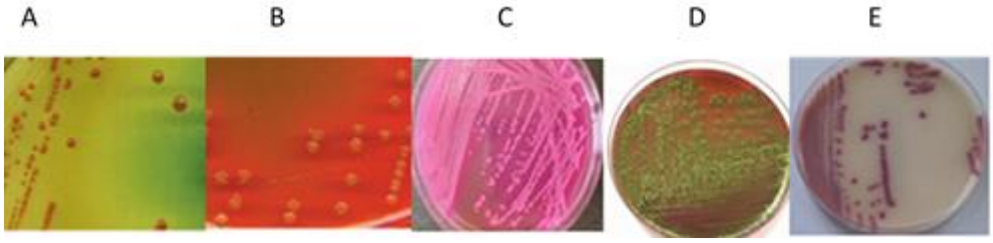

Figure 6: Culture d'*E. coli* sur **A**: gélose Drigalski; **B**: gélose Hektoen; **C**: gélose Mac Conkey; **D**: gélose EMB; **E**: gélose CPS.

Les souches du serotype **EHEC O157:H7** ne fermentent pas le sorbitol et ne produisent pas de β-glucuronidase ce qui permet l'utilisation du milieu Mac Conkey avec le sorbitol (SMAC). Néaumoins, des souches fermentant le sorbitol ont été détectées récémment.

Des milieux chromogéniques sont commercialiés permettant l'isolement de ce sérotype (Fig. 7).

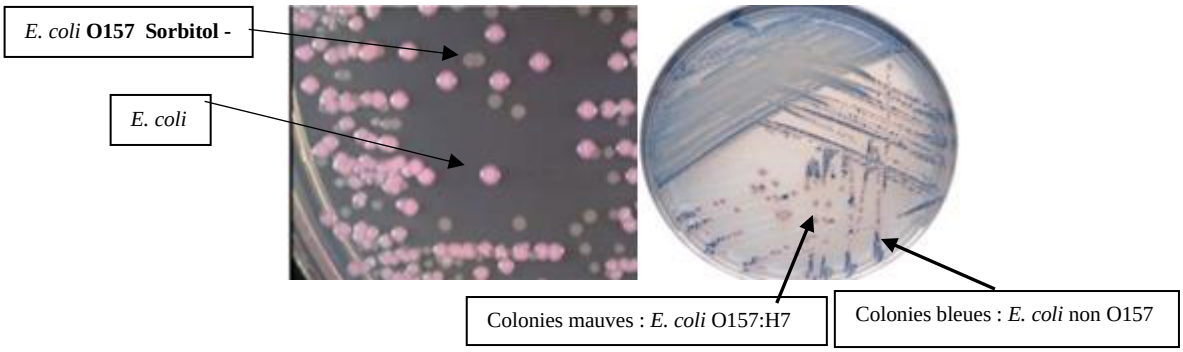

Figure 7 : Aspect des colonies d'*E. coli* O157:H7. **A** : sur milieu SMAC et **B** : sur milieu chromogène.

Identification

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries : galeries classiques et galeries API20E (Fig. 8) ; systèmes automatisés (MALDI-TOF, Vitek 2) ; la biologie moléculaire.

Figure 8 : identification d'*E. coli* sur galerie API20E

Biologie moléculaire : très utilisée dans le cas des *E. coli* entéropathogènes

eae+ *et stx*– → EPEC

eae+ *et* (*stx1*+ *ou stx2*+) → EHEC

Tests immunologiques

De nombreux tests immunologiques permettent la détection des EHEC directement dans les selles ou après une phase d'enrichissement en bouillon. Ces tests détectent l'antigène O157 et/ou les toxines Stx. Ils constituent, lorsqu'ils sont positifs, une alerte pour le clinicien. Ils doivent toujours être confirmés par des méthodes moléculaires. Leur sensibilité est faible ; des réactions croisées en cas de diarrhées à *Shigella dysenteriae* sérotype 1 sont observées dans le cas de la recherche de la shigatoxine Stx1.

La serotypie est réalisée dans le cas d'isolement des souches ECEP impliquées dans les gastroentérites chez des enfants de moins de 3 ans,

La recherche de l'antigène capsulaire K1 devra être realisée sur les *E. coli* isolés chez un nouveau-né (souches virulentes à tropisme méningé).

I.1.2. *Shigella*

I.1.2.1. Généralités

Les *Shigella* sont des entérobactéries immobiles extrêment proches de *Escherichia coli* mais qui ne fermentent pas le lactose. Bien que faisant partie sur le plan génétique de l'espèce *Escherichia coli*, le genre *Shigella* a été conservé dans la taxonomie pour des raisons médicales. Elles n'ont pas d'uréase et ne produisent pas de gaz. Elles sont parasites de l'homme et entrainent une colite infectieuse endémo-épidémique, la dysenterie bacillaire (shigellose).

I.1.2.2. Pouvoir pathogène et physiopathologie

Après pénétration par voie orale (la dose infectante serait de l'ordre de 10^2 bactéries), les *Shigella* envahissent la muqueuse de la partie terminale de l'iléon et du gros intestin. Elles y forment des micro-abcès qui donnent naissance à des ulcérations superficielles (Fig. 9) qui saignent et se recouvrent d'une pseudo-membrane faite de mucus, de débris cellulaires, de leucocytes et de *Shigella*.

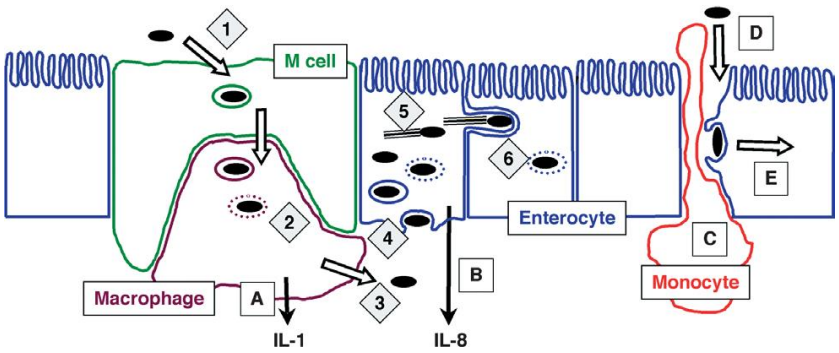

Figure 9: Modèle de pathogenèse induite par *Shigella spp*. (Parsot, 2005).

La virulence est liée à la présence de grands plasmides (120 à 140 MDa) codant pour des protéines nécessaires à la phagocytose par les cellules M des plaques de Peyer et à la multiplication intracellulaire, et au passage de cellule à cellule.

L'évolution rapide des *Shigella* spp. pathogènes à partir d'*E. coli* non-invasives, leurs ancêtres non-pathogènes, est liée aussi bien au transfert génétique horizontal qu'à l'incorporation chromosomique de grandes entités génétiques mobiles portant un ou des gènes de virulence nommés PAI ou îlots de pathogénicité et qui sont portés par le plasmide de virulence. D'autres îlots de pathogénicité appelés SHI pour « *Shigella* pathogenicity islands » ont été identifiés sur le chromosome bactérien (SHI-1, 2 et 3). La présence et la localisation de ces SHI diffèrent entre les souches de *Shigella* et peuvent contribuer à la variation des phénotypes de virulence. On distingue aussi la présence de SHI-O contenant des gènes modifiant la structure des antigènes O du lipopolysaccharide bactérien (LPS) qui est un facteur de virulence crucial dans l'infection à *Shigella*.

Enfin, certaines souches de *Shigella* peuvent produire des entéro-toxines intervenant dans leurs mécanismes d'infection: SHET-1(pour *Shigella* enterotoxin 1) présente uniquement chez *S. flexneri 2a*, SHET-2 (pour *Shigella* enterotoxin 2) présente chez plusieurs sérotypes de *Shigella* et la Shigatoxine (Stx)sécrétée exclusivement par *S. dysenteriae*. Cette dernière est neurotoxique, cytotoxique et entéro-toxique.

Les sujets atteints de shigellose se plaignent de douleurs intestinales paroxystiques (coliques), de diarrhée et de fièvre. Les selles sont liquides et contiennent du mucus, du pus et du sang.

I.1.2.3. Etude bactériologique

Les *Shigella* sont immobiles. Ce genre comprend quatre « espèces » ou sous-groupes A, B, C, D.

— **Groupe A: *S. dysenteriae*** Il en existe 15 sérotypes différents, dont le type 1 s'appelle le bacille de Shiga. Celui-ci produit aussi une exotoxine protéique qui provoque des troubles paralytiques chez les sujets atteints.

— **Groupe B: *S. flexneri*** Il en existe 6.

— **Groupe C: *S. boydii*** Il en existe 18 sérotypes qui sont très répandus en Afrique.

— **Groupe D: *S. sonnei*** Il existe un seul type.

I.1.2.4. Diagnostic bactériologique

Dans les infections à *Shigella* il est très rare qu'il y ait passage de bactéries dans le sang; les hémocultures sont donc le plus souvent négatives et le diagnostic repose sur l'isolement de *Shigella* par coproculture.

L'examen macroscopique et microscopique des selles fournit souvent des éléments de présomption: présence de mucus, de sang et de pus.

La coproculture se fait selon des techniques et sur des milieux sélectifs identiques à ceux qui sont employés pour la recherche des *Salmonella*.

- La gélose Hektoen: les shigelles forment des colonies vertes sans centre noir.
- La gélose *Salmonella-Shigella:* les shigelles donnent des colonies roses sans centre noir.
- La gélose XLD (xylose, lysine, désoxycholate) est fondée sur la fermentation du xylose (les shigelles ne fermentent pas le xylose), la décarboxylation de la lysine (salmonelles et shigelles possèdent une lysine décarboxylase) et la production d'H_2S.

Shigella est immobile, non gazogène (sauf variété de *S. flexneri* G), H_2S, uréase, LDC, ONPG, VP, citrate Simmons et citrate de Christensen négatifs.

Les caractères différentiels des différentes espèces de *Shigella* sont résumés dans le tableau III.

Tableau III: Caractères différentiels des *Shigella*

	Groupe A *S. dysenteriae*	**Groupe B *S. flexneri***	**Groupe C *S. boydii***	**Groupe D *S. sonnei***
ONPG	+/-	-	-	+
Mannitol	-	+	+	+
Indole	-	+/-	+/-	-
ODC	-	-	-	+

Des tests pour le diagnostic des shigelloses à *S. flexneri* sérotype 2a, à *S. dysenteriae* sérotype 1 et à *S. sonnei* sont commercialisés. Ces tests sont fondés sur la détection de l'antigène somatique O.

I.1.3. *Salmonella*

I.1.3.1. Généralités

Salmonella a été découverte en 1880 par Karl Joseph Eberth, après l'observation de bacilles dans les ganglions lymphatiques abdominaux et la rate de patients atteints de la fièvre typhoïde. Il avait publié ses observations en 1880 et 1881 et sa découverte a ensuite été vérifiée et confirmée par des bactériologistes allemands et anglais, dont Robert Koch.

En 1884, Théobald Smith a isolé de l'intestin d'un cochon mort une "bactérie" qu'il pensait être la cause du choléra porcin. Les salmonelles ont été nommées en l'honneur du vétérinaire Daniel Elmer Salmon qui découvrit en 1885 avec Theobald Smith le bacille du « Hog-choléra de Salmon ».

I.1.3.2. Nomenclature et Taxonomie

La taxonomie repose sur des aspects génétiques, biochimiques et sérologiques. Les hybridations ADN-ADN ont démontré que toutes les souches de salmonelles appartenaient à deux espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongorii*, qui est exceptionnellement isolée chez l'homme.

S. enterica est divisée en six sous-espèces puis sérotypes :

- *S. enterica* sous-espèce *enterica* (1586 sérotypes)
- *S. enterica* sous-espèce *salamae* (522 sérotypes)
- *S. enterica* sous-espèce *arizonae* (102 sérotypes)
- *S. enterica* sous-espèce *diarizonae* (338 sérotypes)
- *S. enterica* sous-espèce *houtenae* (76 sérotypes)
- *S. enterica* sous-espèce *indica* (13 sérotypes)

Chacune de ces sous-espèces se divise en sérovars définis par les antigènes O (LPS), H (flagelle) et Vi (capsule).

La sous-espèce *S. enterica* subsp. *enterica* représente la très grande majorité des souches isolées chez l'homme et les animaux à sang chaud, les autres sous-espèces étant rencontrées principalement chez les animaux à sang froid.

Ces sous-espèces sont désignées par des chiffres romains: **I**. *S. enterica subsp. enterica*; **II**. *S. enterica subsp. salamae***; III.** *S. enterica subsp. arizonae*; **IIIa.** *S. enterica subsp. diarizonae***; IV.** *S. enterica subsp. houtenae*; et **V.** *S. enterica subsp. indica.*

Les sérovars appartenant à *S. enterica subsp. enterica* sont désignés par un nom généralement lié à l'endroit géographique où le sérovar a été isolé pour la première fois. Ce nom est écrit en lettres romaines (non en italique) et la première lettre est une lettre majuscule. Ainsi, afin de simplifier la dénomination des sérovars de salmonelle, il est usuel de juxtaposer le nom du sérovar à celui du genre *Salmonella*. Nous dirons donc ***Salmonella* Typhi** pour ***Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhi** (Fig.10).

Les sérovars appartenant à d'autres sous-espèces sont désignés par leurs formules antigéniques, suivant les sous-espèces.

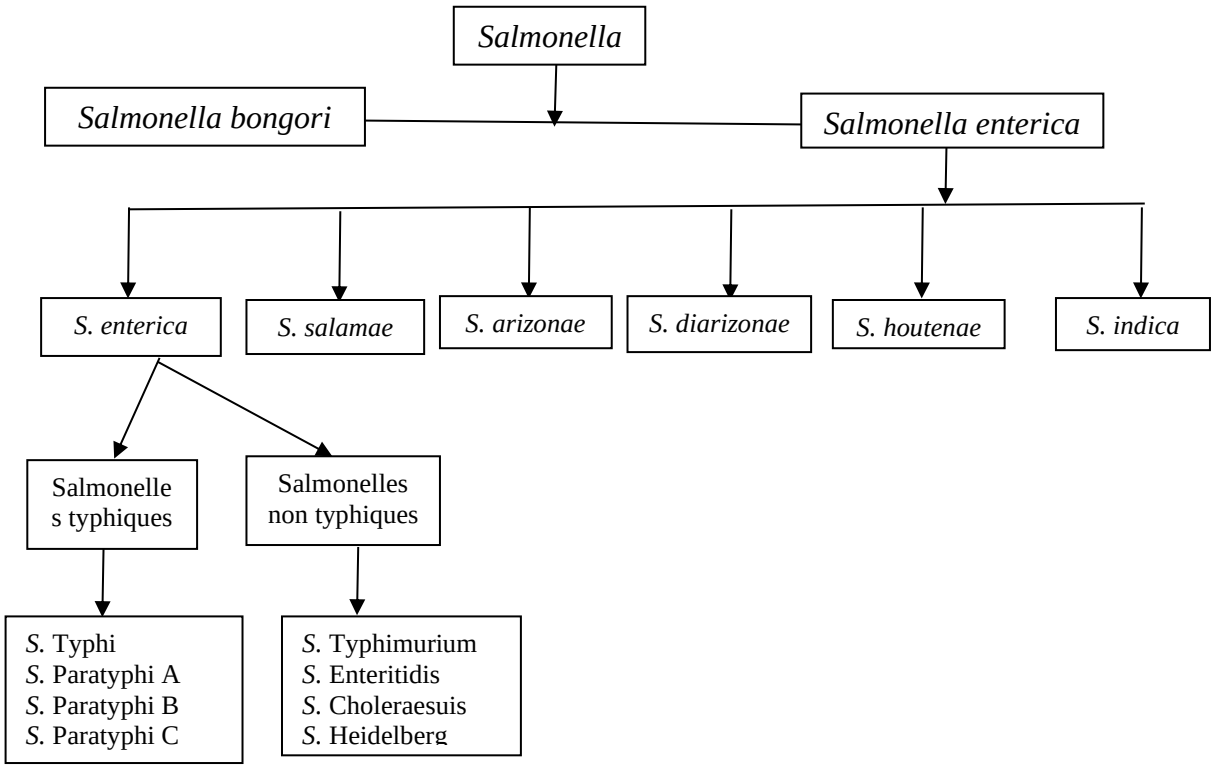

Figure 10 : Classification de *Salmonella*.

Quatre des sérovars *S. enterica subsp. enterica* correspondent aux salmonelles dites ≪ majeures ≫ strictement humaines (Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B et Paratyphi C) responsables des fievres typhoide et paratyphoides. Les autres, dites ≪ mineures ≫, sont d'origine animale et/ou

environnementale et sont responsables chez l'homme d'infections d'origine alimentaire sous forme de diarrhées fébriles.

I.1.3.2. Habitat

Le tube digestif des vertébrés est le réservoir principal des bactéries du genre *Salmonella.* Les salmonelles touchent autant l'homme que les animaux. Cependant, certains sérotypes peuvent être strictement humain ou animal. La sous-espèce *enterica* touche principalement l'homme et les animaux à sang chaud par exemple, mais certains sérotypes comme *S. enterica* sérotype Panama infectent les animaux à sang froid notamment les reptiles. Les sérotypes *S. enterica* sérotype Typhi et Paratyphi sont strictes à l'homme, la contamination se faisant par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par des matières fécales d'origine humaine. Ces sérotypes se retrouvent le plus souvent dans des pays où l'hygiène reste précaire. D'autres sérotypes sont impliqués dans des épidémies touchant la volaille (*S. enterica* sérotype Heidelberg), les bovins et l'homme (*S. enterica* sérotype Dublin), les produits laitiers (*S. enterica* sérotype Montevideo), les oeufs (*S. enterica* sérotype Enteritidis), les porcs et la charcuterie (*S. enterica* sérotype Derby), ils sont dits ubiquistes.

I.1.3.3. Diagnostic bactériologique

Enrichissement

Pour la recherche de *Salmonella*, on ensemence un milieu d'enrichissement au sélenite (milieu de Leifson) ou au tétrathionate (milieu de Mueller-Kauffmann) avec 0,5 ml de selle.

Identification

L'orientation s'effectue selon l'aspect de colonies (Fig. 11):

- Sur la gélose SS, la présence de colonies incolores avec centre noir est une forte présomption de *Salmonella;*
- Sur milieu Hektoen, les colonies suspectées sont lactose – et H_2S +;
- La gélose XLD, les colonies suspectées sont xylose + et H_2S +;
- Sur les milieux chromogènes, la detection specifique de la C8-estérase des *Salmonella* donne une coloration des colonies variant du rose au mauve.

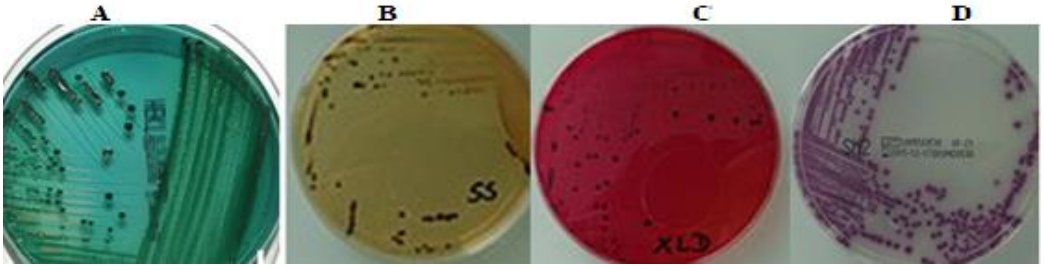

Figure 11: Culture de *Salmonella* sur **A**: gélose Hektoen; **B**: gélose SS; **C**: gélose XLD; **D**: gélose ChromaAgar salmonella.

Caractéristiques biochimiques

Salmonella est une entérobactérie aéro-anaérobie facultative. Cette bactérie est nitrate réductase positive et peut fermenter le glucose, généralement avec production de gaz et sans produire d'acétoïne, mais ne peut pas fermenter le lactose. En culture, elle est oxydase négative et ne peut pas métaboliser le tryptophane en indole. De plus, elle est uréase, gélatinase et désaminase négative. La plupart des souches sont lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase, et H_2S positives. La plupart des sérotypes de l'espèce *Salmonella enterica* sont prototrophes. *Salmonella* peut se cultiver facilement en milieu ordinaire. Elle a une croissance optimale à pH neutre et à 37°C mais elle présente une certaine tolérance pour d'autres conditions environnementales. Elle se développe ainsi lentement à des températures entre 5 et 47°C et supporte une gamme de pH allant de 4,5 à 9.

Quelques réactions sont particulièrement remarquables pour certaines souches importantes :

• *S.* Typhi est : gaz -, citrate de Simmons -, faiblement mobile à l'isolement, et sur milieu KIA elle produit en 24 heures une pointe d'H_2S très évocatrice ;

• *S.* Paratyphi A est le plus souvent H_2S -, LDC - et citrates de Simmons - ;

• *S.* Paratyphi C est H_2S +, contrairement aux souches diphasiques de *S.* Choleraesuis qui sont H_2S négatif alors que les souches monophasiques de ce sérovar– variété Kunzendorf – sont H_2S positif.

Caractéristiques antigéniques

Les souches de *Salmonella* sont ensuite classées en sérotypes (ou sérovar) sur la base de la diversité du lipopolysaccharide (LPS=antigène somatique O) et des antigènes flagellaires H d'après la classification élaborée par White en 1926 puis par Kauffman en 1972 et par Le Minor en 1978.

Comme pour toutes les *Enterobacteriaceae*, le genre *Salmonella* a 3 antigènes majeurs avec des applications d'identification et de diagnostic : l'antigène O, l'antigène H et l'antigène capsulaire Vi.

Tous les bacilles Gram (-) synthétisent un lipopolysaccharide (appelé LPS) ou antigène somatique O ou endotoxine pour évoquer ses propriétés toxiques qui ne sont exprimées qu'après la lyse de la bactérie.

Le LPS est une macromolécule complexe présente à la surface de la bactérie. Il est hautement immunogène avec pour conséquence la production d'anticorps spécifiques dirigés contre les épitopes glycosylés présents dans la partie polysaccharidique et sont stables à la chaleur et

résistants à l'alcool. On dénombre 67 antigènes O dont les antigènes majeurs sont utilisés pour l'identification sérologique.

Les antigènes H ou antigènes flagellaires sont des protéines thermolabiles. La composition en acides aminés et la structure primaire déterminent la spécificité de nombreux antigènes H. Les sérovars de *Salmonella* expriment soit un type d'antigène H (sérovar monophasique) ou, pour la plupart, deux types d'antigène H (le serovar est diphasique).

Le mélange de bactéries avec des antisérums spécifiques produit un profil d'agglutination spécifique menant parfois à l'immobilisation des cellules. Quelques sérotypes de *Salmonella* produisent des flagelles avec toujours la même spécificité antigénique (ex : *S.* Enteritidis, *S.* Typhi). Cet antigène H est appelé monophasique. Cependant, la plupart des sérotypes peuvent alternativement produire des flagelles avec deux spécificités antigéniques différentes. Un tel antigène H est donc appelé diphasique. Par exemple, *S.* Typhimurium peut produire des flagelles avec des antigènes de spécificité Hi ou H1,2. L'antigène capsulaire Vi n'est retrouvé que chez 3 sérotypes de *Salmonella* : *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C, et *S.* Dublin. Cet antigène masque l'antigène O ce qui empêche l'agglutination par un antisérum O.

Le plus souvent la nature chimique des capsules est une structure polyosidique polymérisée. Les oses constitutifs sont très variés. Les plus fréquemment rencontrés sont les hexoses neutres, les 6-désoxyhexoses, les polyols, les acides uroniques et les sucres aminés.

L'antigène Vi est l'un des plus importants du point de vue du diagnostic dans le genre *Salmonella.* L'antigène Vi est un polysaccharide exprimé par la très grande majorité des souches de *Salmonella* Typhi, plus rarement par des souches de *Salmonella* Paratyphi C et exceptionnellement par des souches de *Salmonella* Dublin.

À l'intérieur du groupe antigénique O que l'on a déterminé, on cherchera quels antigènes H peuvent être présents. À l'aide des sérums H « mélange », on oriente le diagnostic de la phase H.

Une fois la première phase H déterminée, on peut tenter de chercher la deuxième phase. Il faudra pratiquer l'inversion de phase.

À une gélose molle gardée en surfusion (10 ml de gélose nutritive + 20 ml de bouillon nutritif) ou à la gélose de Sven Gard (Diagnostics Pasteur), on ajoutera 1 goutte de sérum pour inversion de phase choisi pour contenir les anticorps de la première spécificité déterminée, ou 3 gouttes de sérum monovalent ou sérum mélange intermédiaire correspondant à la première phase détectée. Cette gélose est ensemencée en touche centrale et la boîte est incubée sans la retourner 24 heures à 37 °C. Ensuite, on prélèvera la culture en périphérie de la zone d'envahissement,

pour rechercher par agglutination la deuxième phase à l'aide des antisérums compatibles, en s'aidant du schéma de Kaufmann-White.

I.1.3.4. Diagnostic indirect des salmonelles

Le sérodiagnostic de WIDAL et FELIX permet de détecter la présence dans le sang d'anticorps dirigés contre les constituants des *Salmonella* :

- Les anticorps anti-O apparaissent vers le 7-8^{e} jour, atteignent leur maximum vers le 14^{e} jour, restent ensuite en plateau jusqu'à la 4^{e} semaine puis disparaissent rapidement. Ils n'atteignent jamais un taux plus élevé que 1/200^{e} à 1/400^{e}.
- Les anticorps anti-H apparaissent vers le 10^{e} jour, montent rapidement pour atteindre un maximum de 1/800^{e} à 1/1600^{e} vers le 14^{e} jour, restent en plateau jusqu'à la 4^{e} semaine et diminuent ensuite. Mais à l'inverse des anticorps anti O, ils ne disparaissent pas complètement. Ils persistent toute la vie à un taux de l'ordre de 1/200^{e}.

I.1.3. *Klebsiella Enterobacter et Serratia*

Le groupe *Klebsiella Enterobacter et Serratia* (KES) sont des bacilles à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* responsables souvent d'infections nosocomiales.

Les bactéries du groupe K.E.S ont en commun les caractères suivants:

- La réaction de Voges-Proskauer (VP) est généralement positive.
- Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes

Ce groupe hétérogène sur le plan taxonomique rassemble ce que l'on nomme généralement les entérobactéries VP.

Au sein de ce groupe, on différencie sur le plan phénotypique:

les genres immobiles, « groupe des *Klebsiella* » (genres *Klebsiella* et *Raoultella*);

les genres mobiles et sensibles à la colistine, « groupe des *Enterobacter* » (genres *Enterobacter, Hafnia* et *Pantoea*);

et les genres mobiles et résistants à la colistine (*Serratia*).

Le tableau IV donne les caractères différentiels de ces genres.

Tableau IV: caractères distinctifs des genres de la tribu des *Klebsiellae*

	Klebsiella, Raoultella	***Enterobacter Cronobacter***	***Hafnia alvei***	***Pantoea agglomerans***	***Serratia***
Mobilité à 37 °C	-	+	d	d	+
Mobilité à 20 °C	-	+	+	+	+
Sensibilité à la colistine	+	+	+	+	-
Pigment rouge	-	-	-	-	+/-
Pigment jaune	-	-[3]	-	+/-	-
ADH	-[1]	+/-	-	-	-
ODC	-[2]	+	+	-	+/-
LDC	+/-	+/-	+	-	+/-
Uréase	+/-	+/-	-	-	-
VP à 37 °C	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
VP à 22 °C	+/-	+/-	+	+/-	+

Les colonies sont de grande taille et l'activité β-glucosidase donne une coloration bleue intense sur CHROMagar Orientation®, UriSelect 4®, UTI® et bleu-vert sur CPS ID 3®. La mise en évidence de bacilles à Gram négatif à l'examen microscopique donne une forte présomption de bactérie appartenant à ce groupe. L'identification sera poursuivie par une méthode classique.

I.1.3.1. Genres *Klebsiella* et *Raoultella*

Le nom *Klebsiella* provient du nom du bactériologiste Klebs (1877) et l'espèce type dénommée «pneumobacille» par Friedlander qui l'a décrit comme agent de pneumonies mortelles pendant la période 1882- 1884**.**

Classification

Règne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Klebsiella*

Espèce: *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella* est composé de quatre espèces et sous-espèces:

- ***K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae,***
- ***K. pneumoniae* subsp. *ozaenae,***

- ***K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis***
- ***K. oxytoxa*.**

La taxonomie s'est affinée avec l'avènement de nouvelles techniques. Ainsi, les hybridations ADN-ADN et l'analyse des séquences de gènes universels ARNr 16S et *rpoB* ont montré que ***K. ornithinolytica***, ***K. planticola*** et ***K. terrigena*** forment un groupe distinct et sont reclassées au sein du nouveau genre ***Raoultella***. ***R. ornithinolytica*** montrait 98% d'homologie avec ***R. planticola.*** *R. terrigena* est bien individualisé des deux autres espèces de *Raoultella* par sa séquence du gène *rpoB.*

Les caractères communs de ces deux genres sont l'absence de mobilité, la réaction de VP positive (sauf chez ***K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*** et ***K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*)**.

Les caractères distinctifs entre espèces sont indiqués dans le tableau V.

Tableau V: Caractères différentiels des espèces des genres *Klebsiella* et *Raoultella*

	K. oxytoca	*K. pneumoniae subsp. ozaenae*	*K. pneumoniae subsp. pneumoniae*	*K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*	*R. ornithinolytica*	*R. planticola*	*R. terrigena*
ONPG	+	+	+	-	+	+	+
LDC	+	+/-	+	-	+	+	+
ODC	-	-	-	-	+	-	-
Citrate de Simmons	+	+/-	+	-	+	+	+
Uréase	+	+/-	+	-	+	+	+/-
Indole	+	-	-	-	+	+/-	-
VP	+	-	+	-	+/-	+	+
Inositol	+	+/-	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+/-	+	+/-	+	+	+
Rhamnose	+	+/-	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+/-	+	+	+	+	+
Mélibiose	+	+	+	+/-	+	+	+

Pouvoir pathogène et habitat

Klebsiella est un genre ubiquitiste et a pu être retrouvée dans l'eau, sur les plantes ainsi que les sols.

K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca sont isolées principalement dans les infections urinaires, respiratoires ou de septicémies, surtout en milieu hospitalier où elles seraient responsables de 8 % des infections nosocomiales en Europe et aux Etats-Unis.

K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae est considérée comme l'espèce la plus importante en bactériologie médicale causant de 75 % à 86 % d'infections à *Klebsiella sp*.

K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis est l'agent causal du rhinosclérome; il s'agit d'un épaississement chondroïde des muqueuses labioglossopharyngées.

K. pneumoniae* subsp. *ozaenae est responsable d'une rhinite chronique atrophique décrite sous le nom d'ozène. Elle associe rhinite atrophique fétide et des processus destructifs des bronches.

Identification

Les colonies sont rondes, plus ou moins bombées, brillantes et visqueuses. L'aspect des cultures est en général très florissant: colonies grasses de 3 à 4 mm de diamètre en 24 heures d'incubation à 37°C pour *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca* (presence de capsule). L'incubation peut être de 48 à 72 heures pour les autres espèces: *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* et *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*.

Klebsiella cultive sur les milieux classiquement utilisés pour les entérobactéries: gélose au Mac Conkey, gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP), gélose éosine bleu de méthylène (EMB), gélose de Drigalski, Hecktoen. Sur les milieux contenant du lactose et un indicateur de pH, les colonies apparaissent lactose positif. Sur milieu chromogène, les *Klesbiella* appraisent en bleu-violet (Fig. 12).

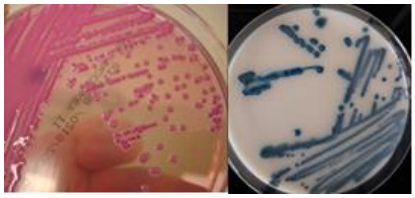

Figure 12: Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur gélose Mac Conkey (gauche) et Uriselect (droite).

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram négatif de 0.3 à 1.0µm de diamètre sur 0.6 à 6 µm de longueur, se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes chaînes et présentant les caractères généraux de la famille des *Enterobacteriaceae.* Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, aero-anaérobies, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive, ODC négative, ADH négative, TDA et PDA négatives, β-glucoronidase négative, ne produisant pas d'hydrogène sulfuré et fermentant de nombreux sucres. En galerie API 20E®, toutes ces espèces sont gélatinase négative.

Réaction de Voges-Proskauer est positive (VP+) à l'exception de *K. pneumoniae subsp. ozaena* et *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*).

La majorité des souches de *K. pneumoniae* est uréase (+) en milieu « urée-indole ». L'uréase peut-être mise en évidence en quelques heures. Toutefois, il faut noter l'existence de quelques

variants **uréase négative** de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca*. Les souches uréase (-) de *K. pneumoniae* sont parfois confondues avec *Enterobacter aerogenes* qui s'en distingue par la mobilité et l'ODC.

Les caractères biochimiques utiles au diagnostic sont présentés dans le tableau V:

- *K. pneumoniae* est VP (+), ONPG (+), LDC (+) et attaque le glucose (MEVAG) en produisant beaucoup de gaz.
- *K. oxytoca* se distingue par la production d'**indole**.
- *K. pneumoniae subsp ozaenae* est VP (-), ONPG (+) et **malonate (-)**
- *K. pneumoniae subsp rhinoscleromatis* est VP (-), ONPG (-) et LDC (-)

La présence d'une capsule rend les colonies muqueuses, bombées, parfois filantes.

La capsule est favorisée par des milieux saccharosés tel le milieu de Worfel-Ferguson.

Il existe plus de 70 sérotypes capsulaires.

I.1.3.2. Genres *Enterobacter, Cronobacter, Hafnia* et *Pantoea*

Le genre *Enterobacter* est composé de très nombreuses espèces dont les principales retrouvées dans les prélèvements humains sont: *E. cloacae, E. aerogenes, E. gergoviae, E. asburiae, E. amnigenus, E. cancerogenus.*

Domaine : Eubacteria ;

Phylum : Proteobacteria ;

Classe : Gammaproteobacteria ;

Ordre : Enterobacteriale ;

Famille : *Enterobacteriaceae* ;

Genre : *Enterobacter* ;

Espèce : *Enterobacter cloacae*

La classification des *Enterobacter* a été l'objet de nombreux remaniements.

Trois nouveaux genres, ***Cronobacter, Hafnia*** et ***Pantoea***, ont été créés pour les espèces ***Cronobacter sakazakii*** (anciennement ***Enterobacter sakazakii***), ***Hafnia alvei*** (anciennement ***Enterobacter hafniae***) et ***Pantoea agglomerans*** (anciennement ***Enterobacter agglomerans*** et ***Erwinia herbicola***).

En 2007, *Enterobacter sakazakii* a été reclassée au sein d'un nouveau genre: Cronobacter, comprenant cinq espèces: ***C. sakazakii*** (espèce type), *C. malonaticus, C. turicensis, C. muytjensii, C. dublinensis.* Ces espèces, isolées chez l'Homme, sont classées comme pathogènes opportunistes. Les isolats associés aux cas de méningites néonatales appartiennent aux espèces *C. sakazakii, C. malonaticus et C. turicensis.*

Pouvoir pathogène et habitat

Les *Enterobacter,* présents dans l'environnement, sont également des commensaux du tube digestif. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables, en milieu hospitalier surtout, d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses.

Cronobacter sakazakii a été responsable de méningites chez des nouveau-nés nourris au biberon avec des laits en poudre contaminés.

Pantoea agglomerans étant une bactérie phytopathogène du milieu extérieur, la source de contamination des malades devra être recherchée dans l'environnement.

Identification

L'aspect morphologique en culture est celui d'une entérobactérie typique. La culture de souches d'*Enterobacter* se fait sur les milieux classiques utilisés pour l'isolement des entérobactéries, elles se développent en aéro-anaérobiose et forment après 18 à 24 heures des colonies rondes, de 2 à 3 mm de diamètre, légèrement irisées ou mates, sèches ou mucoïdes et avec des contours irréguliers.

Les espèces de ce genre présentent les mêmes caractères biochimiques généraux des entérobactéries, elles fermentent le glucose avec production d'acide et de gaz, elles sont rouge méthyle négatives, oxydase négatives, catalase positives et Voges-Proskauer positives.

Les espèces du genre *Enterobacter* sont des bacilles droits à Gram négatif, de 0,6 à 1,0 µm de diamètre sur 1,2 à 3,0 µm de longueur, ils se présentent de manière isolée, groupée, ou en courtes chainettes; mobiles par des flagelles. La majorité des souches d'*Enterobacter aerogenes* sont entourées par une capsule, qui est plus mince comparée à celle de *Klebsiella*.

Les *Enterobacter* sont des *Enterobacteriaceae* VP (+) (sauf *E. asburiae*), voisines des *Klebsiella* dont elles se distinguent par leur **mobilité**, par la présence d'une **ODC** et par l'absence d'uréase (sauf *E. gergoviae*). La TDA, la DNase, la production d'indole et d'H_2S sont négatives. ***Cronobacter sakazakii*** (Fig. 13) et certaines souches de ***Pantoea agglomerans*** produisent de plus un pigment jaune caractéristique.

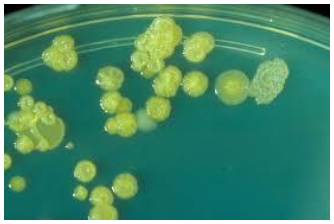

Figure 13: *Cronobacter sakazakii* produisant un pigment jaune.

Les caractères biochimiques qui permettent de distinguer les certaines espèces sont indiqués dans le tableau VI.

Tableau VI: caractères distinctifs des principals espèces du genre *Enterobacter* et des espèces anciennement rattachées.

	E. cloacae	*E. aerogenes*	*E. gergoviae*	*Cronobacter. sakasakii*	*E. asburiae*	*E. amnigenus*	*E. cancerogenus*	*Pantoea. agglomerans*	*Hafnia alvei*
VP	+	+	+	+	-	+	+	d	+ à 22°C d à 37°C
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	d	+ à 22°C d à 37°C
Pigement jaune	-	-	-	+	-	-	-	d	-
Uréase	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LDC	-	+	d	-					
ODC	+	+	+	+	+	+	+	-	+
ADH	+	-	-						
Citrate de Simmons	+	+	+	+	+	d	-	+	-(+ en 3j)
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+ à 22°C d à 37°C
Sorbitol	+	+	-	-	+	d	-	d	-
Rafinose	+	+	+	+	+	d		d	-
Croissance sur milieu au KCN	+	+	-	+	+	+	+	d	+

I.1.3.3. Genre *Serratia*

Ce genre comporte actuellement dix espèces: *S. marcescens, S. liquefaciens*, *S. rubidea, S. plymuthica, S. odorifera, S. fonticola, S. grimesii, S. proteamaculans, S. ficaria* et *S. entomophila* (elle n'a jamais été retrouvée chez l'homme).

Le tableau VII résume les caractères différentiels entre ces espèces.

Tableau VII: caractères distinctifs des principales espèces du genre *Serratia*

	S. marcessens	*S.liquefaciens S. proteamaculans*	*S. rubidaea S.marinorubra*	*S. plymuthica*	*S. odorifera*	*S. fonticola*	*S. ficaria*
VP	+	+ à 22°C d à 37°C	+	+	+	-	d
LDC	+	+	d	-	+	d	-
ODC	+	+	-	-	d	+	-
Indole	-	-	-	-	+	-	-
Pigment rouge	d	-	+	d	-	-	-
Malonate	-	-	+	-	-	+	-
L-arabinose	-	+	+	+	+	+	+
L-rhamnose	-	d	-	-	+	+	d
Raffinose	-	+	+	+	d	+	d
Odeur végétale	-	-	d	-	+	-	+

Pouvoir pathogène et habitat

Ce sont toutes des bactéries du milieu extérieur. Elles se comportent comme des pathogènes opportunistes avec un double tropisme: arbres respiratoire et urinaire.

S. marcescens est l'espèce la plus fréquente au sein de ce genre, suivie de *S. liquefaciens*, puis *S. rubidea*. Les autres espèces sont beaucoup plus rares.

Les souches pigmentées sont répandues dans la nature, mais rarement isolées en milieu hospitalier; les souches non pigmentées sont fréquemment isolées en milieu hospitalier.

Les *Serratia* sont les Entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques. Elles peuvent survivre des mois dans l'eau distillée et se multiplier dans des solutions antiseptiques: ammoniums quaternaires, chlorhexidine. Elles se multiplient bien à +4°C.

Identification

Certaines souches de *S. marcescens* et la plupart des souches de *S. plymuthica* et de *S. rubidaea* élaborent un pigment insoluble dans l'eau, non diffusible, lié aux enveloppes cellulaires et connu sous le nom de **prodigiosine**. Ce pigment confère aux colonies des souches productrices une coloration rouge-violet (Fig. 14). Sa formation est favorisée par une culture effectuée à 30 °C sur un milieu pauvre tel que l'agar au glycérol (peptone: 5 g, glycérol: 10 ml, agar: 20 g, eau distillée: 1000 ml).

Figure 14: *Serratia marcescens* produisant un pigment rouge.

Les cultures de *S. ficaria*, de *S. odorifera* et de quelques souches de *S. rubidaea* ont une odeur de sous-bois ou « odeur végétale » alors que les cultures des autres espèces ont une odeur rappelant le poisson ou l'urine.

I.1.4. Genres *Proteus, Providencia, Morganella*

La tribu des *Proteae* comporte actuellement trois genres:

■ le genre ***Proteus*** avec trois espèces principales: *P. mirabilis, P. vulgaris* et *P. penneri.*

■ le genre ***Providencia*** avec trois espèces principales: *P. alcalifaciens, P. stuartii, P. rettgeri.*

■ le genre ***Morganella*** qui ne compte qu'une seule espèce: *M. morganii*.

L'ensemble des caractères de la tribu sont rassemblés dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Caractères distinctifs entre les espèces des genres *Proteus, Providencia* et *Morganella*

	Proteus			*Providencia*			*Morganella morganii*
	mirabilis	*vulgaris*	*penneri*	*alcalifaciens*	*stuartii*	*rettgri*	
Urease	+	+	+	-	d1	+	+
Indole	-	+	-	+	+	+	+
H_2S	+	+	d	-	-	-	-
Citrate de Simmons	d	d	-	+	+	+	-
Gaze en glucose	+	+	+	d2	-	-	+
Mannitol	-	-	-	-	d	+	-
Adonitol	-	-	-	d2	-	+	-
Inositol	-	-	-	-	+	+	-
Tréhalose	+	d	d	-	+	-	d
ODC	+	-	-	-	-	-	+
Gélatinase	+	+	d	-	-	-	-
Tous sont TDA +, résistants à la colistine, ONPG, lactose, malonate, VP, LDC et ADH négatifs (sauf rares souches ONPG + ou lactose + par acquisition de plasmides métaboliques). 1 Caractères d'origine plasmidique. 2 Suivant le biotype							

Pouvoir pathogène et habitat

Ce sont toutes des bactéries pathogènes opportunistes. En effet, si *P. mirabilis* est souvent isolé d'infections du tractus urinaire chez des malades « ambulatoires », les autres appartiennent aux germes « hospitaliers » mineurs causant souvent de petites épidémies d'infections urinaires sur sonde dans les services de soins intensifs ou de gériatrie. La distinction porte aussi sur la sensibilité aux antibiotiques. *P. mirabilis* ne produit pas de β-lactamase naturelle. *P. vulgaris* et *P. penneri* possèdent une β-lactamase particulière parfois dénommée « céfuroximase » qui rend ces espèces résistantes aux pénicillines du groupe A et aux céphalosporines de 1re et 2e générations (à l'exception des céphamycines comme la céfoxitine), mais dont l'activité enzymatique est inactivée par l'acide clavulanique.

Identification

Certains aspects morphologiques et culturaux peuvent être très indicatifs pour certaines espèces. *P. mirabilis* et *P. vulgaris* ont un aspect très polymorphe au Gram avec des formes longues. Ces deux espèces sont abondamment flagellées et donnent sur milieu ordinaire un envahissement du milieu ou essaimage (Fig. 15).

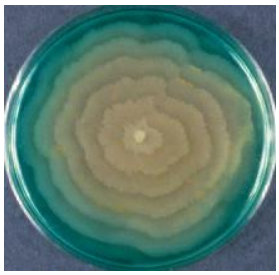

Figure 15: Colonie en essaimage de *Proteus mirabilis* sur gélose.

Cette tribu est caractérisée par l'enzyme de définition de la tribu: la TDA. La résistance à la colistine est alors la réaction d'orientation essentielle.

La spectrométrie de masse différencie parfois difficilement l'espèce *Proteus penneri* de *Proteus vulgaris* dont elle est proche; la distinction peut se faire sur son caractère non indologène.

L'activité tryptophane désaminase (TDA) est détectée par la production d'un pigment brun diffusible: des colonies beiges à brun orangé, avec ou sans brunissement de la gélose sont obtenues (Fig. 16). La recherche de la production d'indole qui orientera vers les *Proteus* indologènes (indole positif) ou vers *Proteus mirabilis* (indole négatif) sera effectuée.

Figure 16: Culture de *Proteus mirabilis* sur milieu Uriselect.

I.1.5. Genre *Citrobacter*

Le genre *Citrobacter* comprend 11 espèces : *C. amalonaticus, C. braakii, C. farmeri, C. freundii, C. gillenii, C. koseri, C. murliniae,* C. *rodentium, C. sedlakii, C. werkmanii* et *C. youngae*.

Les especes *C. braakii, C. freundii, C. gillenii, C. murliniae, C. rodentium, C. sedlakii, C. werkmanii* et *C. youngae* sont parfois rassemblees sous le vocable de ≪ complexe *Citrobacter freundii* ≫ ou de *« Citrobacter freundii sensu lato »*.

Habitat et pouvoir pathogène

Les *Citrobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Ils sont trouvés dans l'environnement et dans les eaux. Ils peuvent être isolés occasionnellement d'urines ou de suppurations diverses. Toutes les espèces, à l'exception de *C. rodentium*, peuvent etre isolées de prélèvements cliniques chez l'homme ; elles sont considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes et la plupart de ces infections sont d'origine nosocomiale. *C. koseri* et *C. freundii* ont été isolés de méningites néonatales.

Identification

Le genre *Citrobacter* rassemble des entérobactéries mobiles (flagelles péritriches) (sauf *C. rodentium*), bacilles ou coccobacillaires de 0,3 à 0,8 µm × 1 à 3 µm, productrices d'H_2S, ONPG positive (rares souches négatives), LDC, PDA, Voges-Proskauer négatifs.

C. diversus et *C. amalonaticus* peuvent être considérés en première approche comme des *Escherichia coli* citrate de Simmons positif.

C. freundii pourrait être confondu avec les souches H_2S positif d'*E. coli*, mais il ne produit pas d'indole.

La majorité des souches de *Citrobacter sp.* cultivent facilement sur le milieu cefsulodine-irgasan-novobiocine (CIN) en donnant des colonies à centre rouge et à bord translucide pouvant être confondues avec des colonies de *Yersinia*.

Sur les milieux chromogènes (Uriselect), certains *Citrobacter* donnent une réaction positive pouvant les faire confondre avec *Escherichia coli.*

Le tableau IX résume les caractères différentiels entre ces espèces.

Tableau IX : Caractères distinctifs des quelques espèces du genre *Citrobacter*

	Citrobacter freundii	***Citrobacter koseri***	***Citrobacter amalonaticus***	***Citrobacter braaki***	***Citrobacter youngae***	***Citrobacter farmeri***	***Citrobacter gillenii***	***Citrobacter sedlakii***
synonymes								
Mobilité								
Croissance sur milieu au KCN	+	-	+	+	+	+	+	+
Indole	-	+	+	***d***	-	+	-	+
Citrate de Simmons	***d***	+	+	***d***	***d***	-	***d***	***d***
H2S	***d***	-	-	***d***	***d***	-	***d***	-
Uréase	***d***	***d***	+	***d***	-	***d***	-	+
ODC	-	+	+	+	-	+	-	+

I.1.6. Genre *Yersinia*

Ce genre bactérien comprend 3 espèces pathogènes: *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. Ces bactéries ont une croissance un plus lente que celle des autres entérobactéries.

Elles ont toutes un tropisme pour les tissus lymphoïdes. On les rencontre dans diverses espèces animales et plus particulièrement chez les rongeurs.

Le genre *Yersinia* regroupe des bacilles droits, parfois coccobacillaires de 0,5 à 0,8 μm × 1 à 3 μm à Gram négatif présentant parfois une coloration bipolaire, non capsulés, non sporulés, immobiles à 37 °C et pour certaines espèces mobiles à 30 °C. Les bactéries appartenant à ce genre ont un développement optimal vers 30 à 32 °C, mais une virulence ne s'exprimant qu'à 37 °C.

Les *Yersinia* sont actuellement rattachées aux *Enterobacteriaceae* avec les caractères oxydase négative, catalase positive, aéro-anaérobies facultatifs, fermentation du glucose et réduction des nitrates en nitrites et une production d'uréase.

Pouvoir pathogène et habitat

Y. pestis est responsable de la peste. Le couple puce–rongeur constitue le réservoir, mais la bactérie survit plusieurs mois dans le sol ou les terriers. La puce transmet *Y. pestis* de rongeur à rongeur et accidentellement des rongeurs à l'homme. À partir de la piqûre, la multiplication bactérienne entraîne une nécrose tissulaire puis un bubon ou adénite pesteuse qui siège le plus souvent au niveau de l'aine, plus rarement au cou ou à l'aisselle, localisation dépendant du siège de la porte d'entrée. La bactérie se dissémine précocement par voie lymphatique, provoquant la

peste bubonique (dans les ganglions lymphatiques) précédant parfois des formes septicémiques et pulmonaires. La transmission interhumaine est possible par les sécrétions bronchopulmonaires provoquant des pestes pulmonaires primitives.

La contamination par aérosols est possible dans les laboratoires ou dans un contexte bioterroriste.

Sur ces 20 dernières années, une vingtaine de pays ont notifié plus de 30000 cas de peste. Les gènes de virulence sont essentiellement plasmidiques et les facteurs produits permettent une multiplication extracellulaire efficace et une inhibition du système immunitaire.

La virulence de *Y. pestis* explique que le pronostic vital est engagé, tout particulièrement dans les formes pulmonaires; certaines formes foudroyantes entraînent la mort en quelques heures. Le bacille de la peste peut persister plusieurs années dans le sol sans perdre sa virulence. Il peut donc recontaminer les rongeurs.

Y. pseudotuberculosis a pour réservoir le sol; l'homme se contamine par contact direct avec des animaux proches de l'homme (chat, rongeurs « domestiques ») qui éliminent la bactérie dans leurs fèces, voire par ingestion d'aliments souillés. *Y. enterocolitica* a un réservoir très vaste: environnement (eaux, sols), ou animaux (rongeurs, porcs, etc.), avec souches adaptées ou non à des espèces animales voire à l'homme. Ainsi, les biovars 4 (sérogroupe O:3), 3 (O:5) et 2 (O:9) sont les plus fréquents chez l'homme en Europe. La contamination se fait essentiellement par voie digestive, exceptionnellement par contact ou griffure de chat. ***Y. pseudotuberculosis*** **et** ***Y. enterocolitica*** sont responsables des yersinioses, infections qui se présentent sous forms digestives (adénolymphite mésentérique, gastro-entérites fébriles chez les enfants de moins de 6 ans), septicémiques sur terrain fragilisé, ou extradigestives.

Y. enterocolitica est responsable d'entérocolite chez le jeune enfant, d'adénite mésentérique chez l'adolescent et l'adulte jeune. Les formes septicémiques sont plus rares et surviennent sur un terrain fragilisé, immunodéprimé, et des manifestations cliniques variées ont été décrites (abcès profonds, endocardite, méningite, etc.).

À noter la possibilité de choc septique lors d'une transfusion de globules rouges ou de plaquettes, *Y. enterocolitica* étant en effet capable de se multiplier à 4 °C.

Y. pseudotuberculosis est surtout responsable d'adénite mésentérique. Une arthrite réactionnelle (surtout chez les sujets HLA B27) ou un érythème noueux sont assez communs au décours d'une infection à *Yersinia*.

Identification

Prélèvements

Pour la **peste,** il faut rappeler que la culture doit être pratiquée dans une unité de haute sécurité

(P3 ou P4). La recherche s'effectue à partir de ponction de bubon, d'expectorations, recherche s'effectue à partir de ponction de bubon, d'expectorations, voire d'hémocultures; en post mortem, on réalise les mêmes prélèvements et on pratique en plus des mises en culture de prélèvements hépatiques, spléniques et pulmonaires.

Pour les **yersinioses** non pesteuses, la recherche est réalisée sur selles ou ganglions mésentériques. La découverte de *Yersinia* dans des hémocultures ou autres prélèvements est fortuite. *Y. enterocolitica* peut persister dans les selles plusieurs semaines après la guérison et peut être aussi être retrouvé dans les selles dans les cas d'atteintes articulaires ou d'érythème noueux, ce qui n'est pas le cas pour *Y. pseudotuberculosis*.

Transport

Pour ***Y. pestis***, les prélèvements doivent être conservés à basse température (4 ˚C) voire ensemencés sur place en milieu de transport de Carry Blair.

Pour les autres ***Yersinia***, le transport doit s'effectuer également au froid; ce procédé peut constituer un moyen d'enrichissement.

Diagnostic bactériologique proprement dit Examen direct

Y. pestis est un petit bacille à Gram négatif pléiomorphe à coloration bipolaire que l'on peut voir sous forme capsulée sur frottis d'organe; on le recherche de préférence avec la coloration de Wayson.

Les autres *Yersinia* ont une morphologie comparable, avec pour *Y. pseudotuberculosis* une coloration bipolaire plus marquée que pour *Y. enterocolitica*.

Culture

Y. pestis se développe sur milieux gélosés usuels Drigalski, MacConkey, etc., et sur milieu sélectif **CIN** (cefsulodine, irgasan, novobiocine).

La température optimale est de **25 à 28 °C** et les colonies n'apparaissent le plus souvent qu'en **48 heures** sur milieu gélosé. Les hémocultures doivent être conservées 4 à 5 jours à 25 ˚C.

En milieu liquide, le trouble est **inhomogène** avec un voile en surface et un aspect floconneux en profondeur.

Un des caractères importants est **l'immobilité à 22 ˚C** comme **à 37 ˚C** par manque de ciliature.

La galerie API20E doit être incubée à 28 ˚C, sauf pour uréase et ONPG, recherchées à 37 ˚C.

Les caractères biochimiques distinctifs sont résumés dans le tableau X.

Tableau X: caractères distinctifs de quelques espèces de *Yersinia*

Caractères/Espèces	***Y. pestis***	***Y. pseudotuberculosis***	***Y. enterocolitica***
ONPG + + +	+	+	+
Saccharose	–	–	+
Production indole	–	–	+/-
Uréase	-	+	+
Citrate de Simmons (25 °C)	–	–	–
Voges-Proskauer (25 °C)	–	–	+/-
LDC	–	–	–
ODC	–	–	+
Mobilité 25 °C	–	+	+

On distingue trois biotypes chez *Y. pestis* (Antiqua, Medievalis, Orientalis), biotypes ayant des répartitions historiques et géographiques différentes.

Le diagnostic différentiel entre ***Y. pestis*** et ***Y. pseudotuberculosis*** est parfois délicat (90 % d'homologie) et requiert l'étude de la séquence nucléotidique du gène ***rpoB*.**

Un test immunochromatographique a été développé; il est rapide (10 minutes), simple, applicable aux prélèvements humains, avec des performances comparables à la culture. Il est réservé aux zones d'endémie.

Pour les autres *Yersinia*, on peut, pour les prélèvements polymicrobiens (selles, aliments, etc.), tenter un enrichissement durant plusieurs jours ou semaines à basse temperature (+ 4 ˚C) en milieu liquide (eau peptonée, tampon PBS).

Soit directement, soit à partir du milieu liquide d'enrichissement, on va, pour les selles, utiliser des milieux sélectifs pour coproculture, incubés à 30 ˚C:

Sur **CIN**, les colonies sont petites (0,5 mm) en 24 heures, pour atteindre 2 à 3 mm en 48 heures, avec un centre rouge foncé caractéristique (Fig. 17). Certaines souches de *Y. pseudotuberculosis* ne poussent pas sur CIN.

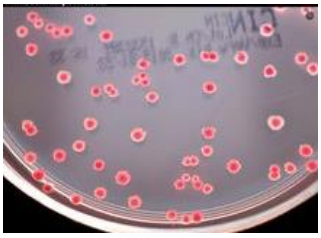

Figure 17: Culture de *Y. enterocolitica* sur gélose CIN

Y. enterocolitica et ***pseudotuberculosis*** possèdent une **uréase** très active qui peut être recherchée par un **test rapide.** Ensuite, une identification biochimique complète sera réalisée.

En dehors des caractères généraux des entérobactéries, on peut être orienté par une mobilité à 25 °C (par ciliature péritriche) et une immobilité à 37 °C, des caractères T**DA/ PDA négatifs** (ce qui permet une différenciation avec les *Proteus*), un test ONPG positif sans que les souches possèdent **une β-galactosidase**, des caractères LDC et ADH **négatifs**.

La galerie API20E permet de confirmer l'espèce (*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*).

On différencie ces deux espèces notamment par les tests suivants:

Y. pseudotuberculosis**:** ODC, VP et saccharose, négatifs.

Y. enterocolitica**:** ODC, VP et saccharose, positifs. Certains caractères, tels que le citrate de Simmons et le VP, sont plus rapides à 25 ˚C qu'à 37 ˚C.

On peut distinguer 5 biovars au sein de l'espèce *Y. enterocolitica*.

Par la caractérisation des sérovars au sein des antigènes O, on dénombre pour *Y. pseudotuberculosis* 8 sérogroupes (I à VIII) et pour *Y. enterocolitica* sensu stricto plus de 29 antigènes O.

Diagnostic indirect

Dans la peste, on observe une positivité des anticorps 6 à 10 jours après le début de la maladie, avec un pic vers le 15e jour de la maladie. On recherche les anticorps dirigés contre la capsule (fraction F1) d'*Y. pestis;* la technique la plus utilisée est l'hémagglutination passive (PHA) de globules rouges de mouton.

Pour les autres yersinioses, on utilise généralement des techniques d'agglutination en ayant recours à des antigènes de I à V pour *Y. pseudotuberculosis* et O:3, O:5 et O:9 pour *Y. enterocolitica*. On tente de mettre en évidence une montée des anticorps en sachant que le pic est atteint durant la 2e semaine de la maladie; à défaut, les titres supérieurs ou égaux au 1/200e par agglutination classique et au 1/40e en microagglutination sont considérés comme significatifs. Des communautés antigéniques entre *Y. enterocolitica* O: 9 et les *Brucella* sont observées ainsi qu'entre *Y. pseudotuberculosis* (II et IV) et *Salmonella*. La sérologie est surtout utile dans les formes extradigestives des yersinioses.

Si le diagnostic bactériologique de la peste ne se pose que dans les zones d'endémie, la recherche des *Yersinia pseudotuberculosis* et *enterocolitica* fait partie de la routine d'un laboratoire de biologie, notamment à partir des selles.

I.2. Genre *Vibrio*

I.2.1. Généralités

Vibrio cholerae est l'agent étiologique du choléra, maladie touchant uniquement les Hommes, dont les symptômes sont d'importantes diarrhées aqueuses responsables de déshydratations et des pertes en électrolytes pouvant amener au décès du patient. L'Homme a connu depuis 1817, 7 pandémies de choléra qui ont dévasté des civilisations et qui ont joué un rôle important dans l'histoire de l'humanité. C'est lors de la cinquième pandémie, en 1884, que la communauté scientifique prit connaissance du travail de Robert Koch, qui a isolé l'agent causant le choléra, un bacille en forme de virgule. Cependant, c'est seulement en 1965 que la bactérie est renommée *Vibrio cholerae*, en hommage à Filippo Pacini qui avait isolé 30 ans avant Robert Koch la bactérie qu'il avait décrit de vibrion recourbé.

Vibrio cholerae est une Gammaprotéobactérie à Gram négatif, non sporulée. Le métabolisme est oxydo-fermentatif, le glucose étant fermenté sans gaz. Ce sont des bacilles à Gram négatif généralement isolés, droits ou incurvés, assez courts (1,5 à 3,0 µm), parfois franchement cocobacillaires. Ils sont mobiles par ciliature polaire. Les *Vibrio* n'ont pas d'exigence nutritive particulière si ce n'est l'halophilie de certaines espèces. On distingue des **espèces halophiles** (*V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. vulnificus*, etc.) et d'autres **halotolérantes** (*V. cholerae, V. mimicus*). Les températures de culture vont de 18 à 38 °C et le pH permettant la culture va de 6 à 9.

La majorité des souches est oxydase positive (sauf *V. metschnikovii*) et sensible au **composé vibriostatique** O/129 (2-4-diamino-6,7-diisopropylptéridine). Si *V. cholerae* O1 est généralement sensible, le sérogroupe O139 est resistant à l'O/129.

I.2.2. Habitat et pouvoir pathogène

Cette bactérie colonise tout aussi bien les environnements aquatiques marins que les environnements d'eau douce et d'eau saumâtre, ce qu'il fait d'elle une bactérie largement aquatique. Présente dans l'environnement sous forme de cellules libres, *Vibrio cholerae* est aussi capable de coloniser les êtres vivants de façon commensale, comme le mollusque marin, ou bien pathogène, comme l'intestin grêle de l'Homme.

L'espèce *V. cholerae*, strictement humaine, est éliminée en quantité dans les selles des malades atteints de cholera (jusqu'à 10^6 à 10^8 vibrions/ml de selles). Il est présent également dans les vomissements. On peut retrouver *V. cholerae* dans le milieu extérieur. Relativement fragile, ce germe persiste de façon éphémère dans les eaux d'étangs ou de rivières. Sa survie est

prolongée dans les eaux salées ; il peut y survivre plus de 15 jours. Il peut également persister dans certains aliments frais (lait, poisson...) durant plus de deux semaines.

Les souches toxinogènes de *V. cholerae* sont responsables du choléra humain qui peut revêtir différents aspects plus ou moins graves, dominés par un début brutal avec une diarrhée massive et une émission de selles afécales « eau de riz », pouvant atteindre 10 à 50 selles par jour (3 à 15 litres éliminés par 24 heures), accompagnées fréquemment de vomissements sans fièvre. L'incubation après contamination directe (mains sales) ou indirecte (aliments) dure de quelques heures à 5 jours. Le choléra entraîne une mortalité de 1 à 5 %; en l'absence de traitement.

L'agent du choléra, absorbé par voie orale en quantité suffisante (10^8 à 10^{11} bactéries/ml) pour franchir la barrière gastrique et le pylore, va venir adhérer aux cellules de la bordure en brosse de la partie proximale de l'intestin grêle grâce à des *pili* permettant d'adhérer aux entérocytes. Il libère la **toxine cholérique (CT),** holoprotéine thermolabile avec deux composants **A et B**. Cette toxine entraîne une accumulation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) avec pour effet la sécrétion d'ions chlorure, de bicarbonates et d'eau, et l'inhibition de réabsorption du sodium, d'où la diarrhée aqueuse (en eau de riz) avec perte d'électrolytes. Les gènes codant pour les deux sous-unités de la toxine cholérique, *ctxA* et *ctxB*, tiennent leur origine du bactériophage CTX qui s'est intégré dans le génome de *Vibrio cholerae*.

Près de 200 sérogroupes ont été identifiés, **O1 (**avec **deux biotypes *cholerae*** et ***El Tor*** et **trois sérotypes Inaba, Ogawa** et **Hikojima)** et **O139** étant les seuls **sérogroupes** connus comme responsables de cholera.

À la fin de 1992, sont apparus des choléras dus à des souches *V. cholerae* O139 dites « Bengale » car les premières épidémies se sont déclarées au Bengladesh.

Les autres espèces de *Vibrio* ainsi que les souches non O1 sont largement répandues dans la nature (eaux salées, faune marine, algues, vase, etc.). Parmi les autres espèces de vibrions qui peuvent être retrouvées chez l'homme, on trouve:

■ ***V. parahaemolyticus***, agent de diarrhées aiguës chez l'homme après ingestion de fruits de mer contaminés, les symptômes survenant souvent 2 à 6 heures après le repas;

■ ***V. alginolyticus,*** qui est isolé à partir de prélèvements cutanés après contact avec de l'eau de mer; c'est le cas aussi de *V. vulnificus* qui peut, en outre, se présenter sous forme septicémique après ingestion de fruits de mer;

■ d'autres espèces de *Vibrio* ont parfois été associées à des pathologies chez l'homme (*V. hollisae*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*).

I.2.3. Diagnostic

Prélèvements

Les selles constituent le prélèvement majeur en cas de suspicion de choléra ou d'atteinte digestive due à un *Vibrio*. Elles sont recueillies dans un récipient stérile étanche, le plus tôt possible au cours de la maladie, avant tout traitement.

Si l'examen est différé, il est conseillé de pratiquer sur place un ensemencement en eau peptonée salée (**2 % NaCl**) et alcaline (**pH 9**) et d'adresser le tube au laboratoire en même temps que la selle. Il est également possible d'utiliser comme milieu de transport le milieu de Cary-Blair. Il est aussi possible d'imprégner du papier filtre avec les selles; ce système permet de conserver viables les souches de *Vibrio* pendant 5 semaines.

Dans le cas de manifestations autres que la symptomatologie digestive, divers prélèvements peuvent être effectués (hémocultures, prélèvements cutanés, pus profonds, liquides de ponction, etc.). Les échantillons d'eaux, d'aliments doivent être recueillis dans des flacons stériles contenant du chlorure de sodium et gardés à +4 °C avant analyse réalisée dans les 8 à 12 heures. L'eau devra être filtrée à travers une membrane de 0,45 µm et déposée sur milieu sélectifs **TCBS** (thiosulfate de sodium-citrate de sodium-bile de bœuf-saccharose).

Examen de l'échantillon

Les selles sont afécales avec un aspect riziforme. Au microscope à l'état frais, on observe du mucus, pas de leucocytes, mais une flore monomorphe de bacilles incurves mobiles qui apparaissent Gram négatif après coloration.

Mise en culture

Il est conseillé d'ensemencer en parallèle (Fig. 18) des milieux d'enrichissement et d'isolement.

L'enrichissement en milieu liquide peut être réalisé via:

■ de l'eau peptonée alcaline à 1 % et 3 % de NaCl; ou

■ un milieu taurocholate-tellurite-peptone (TTG). Ce milieu d'enrichissement sera repiqué sur milieu solide d'isolement après 6 à 8 heures d'incubation à 37 °C. La culture en milieu liquide est caractéristique et forme un voile à la surface du milieu. Le prélevement doit etre réalisé sous la surface de l'eau peptonée, sans remuer le tube.

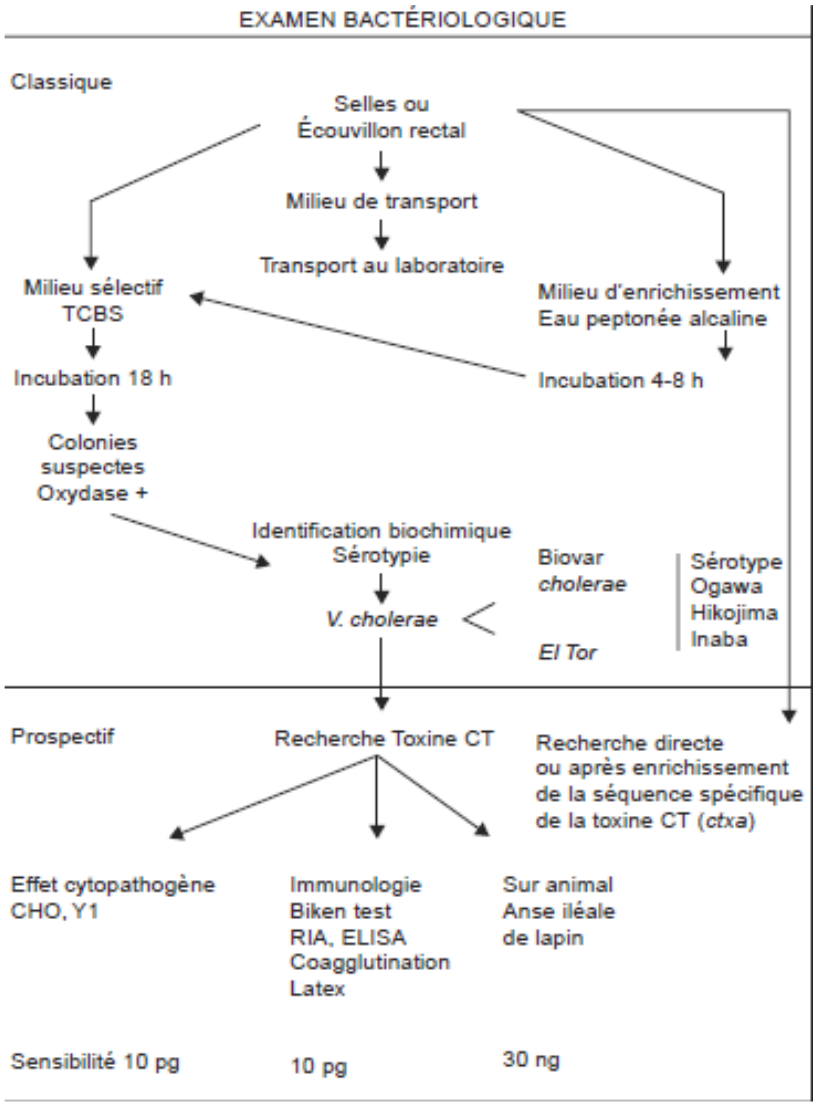

Figure 18: Étapes du diagnostic bactériologique de *Vibrio cholerae*

Concernant l'isolement en milieu solide, on distingue des milieux:

■ peu sélectifs: gélose nutritive avec 0,1 % de Teepol, gélose trypticase soja alcaline (pH 9), gélose Mueller-Hinton;

■ sélectifs: gélose **TCBS** sur laquelle les colonies saccharose positives apparaissent en jaune arrondies et bombées (c'est le cas de *V. cholerae*) et négatives en vert (Fig. 19).

Identification présomptive

Cinq colonies suspectes différentes seront étudiées. Sur milieu TCBS, elles apparaissent comme de grandes colonies jaunes convexes. Leur coloration tend au vert si l'incubation est prolongée au-delà de 24 heures.

L'orientation du diagnostic se fera sur l'aspect au Gram ou les bactéries apparaissent coccobacillaires et sur la mobilité (Fig. 20). On pourra tester le composé vibriostatique 0/129 et la polymyxine sur milieu de Mueller-Hinton ; les souches O1 sont généralement sensibles au composé vibriostatique et les O139 résistantes.

La réaction d'oxydase qui est positive.

Une agglutination directe sur lame avec chacun des deux sérums anti-O1 et anti-O139 sera alors pratiquée. Si ce test est négatif, il faudra reprendre l'agglutination après chauffage de la suspension bactérienne 2 heures à 100 °C.

En période épidémique, ces quelques tests peuvent être suffisants.

Figure 19: Culture de de *V. cholerae* sur gélose TCBS. **Figure 20 :** Aspect typique incurvé de *Vibrio cholerae*.

Diagnostic de certitude

L'orientation est donnée par les réactions précédentes. L'identification complète sera entreprise avec l'ensemble des réactions indiquées dans le tableau XI.

- **Identification biochimique :** l'utilisation de galeries biochimiques nécessite de realiser la suspension bactérienne en solution à 1 % de NaCl. Cela permet de confirmer le diagnostic de *Vibrionaceae*, puis d'espece *V. cholerae* (Tableau XI).

Tableau XI : Caractères différentiels de quelques espèces de *Vibrio*

	Oxydase	Nitrate reductase	Croissance			ADH	LDC	ONPG	VP	INDOLE
			TCBS	Sans NaCl	1% NaCl					
V. cholerae	+	+	**J***	+	+	–	+	+	**V**	+
V. vulnificus	+	+	**V**	–	+	–	+	+	–	+
V. parahaemolyticus	+	+	**V**	–	+	–	+	–	–	+
V. alginolyticus	+	+	**J**	–	+	–	+	–	+	+
V. fluvialis	+	+	**J**	–	+	+	–	**V**	–	–
TCBS (milieu thiosulfate-citrate-bile-saccharose). J: jaune = saccharose +, V: vert = saccharose –. *** Quelques exceptions.**										

La différenciation entre les biovars *cholerae* classique et *El Tor* repose sur les caractères colignés dans le tableau XII.

Tableau XII : Diagnostic différentiel entre les biovars *cholerae* et *El Tor*

	V. cholerae	***El Tor***
Hémolyse (sang de mouton)	**-**	**+ (– depuis 1970)**
Polymyxine (50 U)	**Sensible**	**Résistant**
VP	**–**	**+**

- **Identification par MALDI-TOF :** elle se limitera à l'identification de l'espèce, sans permettre la détermination du biovar et des sérogroupes.
- **Identification serologique** :

Souches de sérogroupe O1 : sérogroupe comporte trois spécificités antigéniques (A, B, C) aussi bien pour le biovar classique que pour le biovar *El Tor*, la combinaison de ces antigènes aboutissant à l'individualisation des trois sérotypes Ogawa, Inaba et Hikojima (Fig. 21). Les sérotypes Ogawa et Inaba sont les plus fréquents.

Souches non O1 : devant une souche de *V. cholerae* n'agglutinant pas avec l'antisérum O1, on tente devant un syndrome cholériforme une agglutination avec l'antisérum O139.

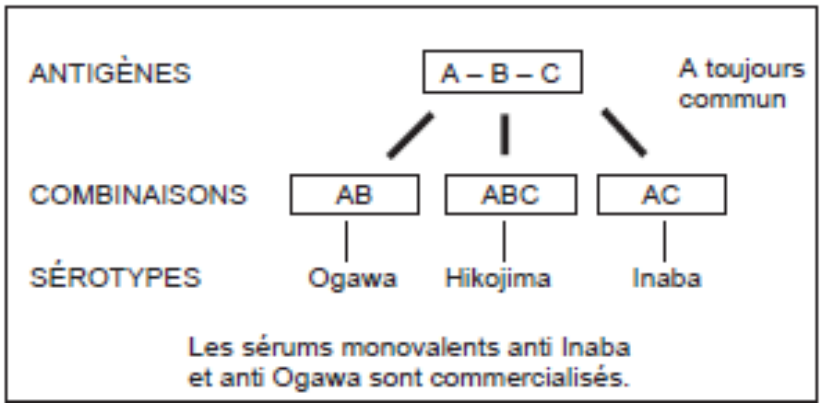

Figure 21 : Sérotypes de *Vibrio cholerae*.

- **Mise en évidence de la toxine cholérique (CT)**

La toxine cholérique peut être mise en évidence par des techniques in vivo comme l'anse intestinale ligaturée chez le lapin ou sur culture de cellules (cellules Y1 ou cellules rénales de hamster chinois).

A partir d'une souche, il est aussi possible de rechercher la toxine par méthode immunologique.

Les techniques les plus sensible sont celles de biologie moléculaire permettant la recherche indirecte de la toxine sur la souche mais aussi dans les selles par amplification génique (PCR) via la détection du gène de la sous-unité A de la toxine (*ctx*A).

I.3. Genre *Aeromonas*

I.3.1. Généralités

Après avoir longtemps été reliées à la famille des *Vibrionaceae* du fait de leurs caractères phénotypiques, les bactéries du genre *Aeromonas* sont actuellement classées dans la famille des *Aeromonadaceae.*

Des souches *d'Aeromonas* ont été décrites dès 1890, mais le nom d'*Aeromonas* proposé par Kluyver et Van Niel en 1936, n'a été admis dans le Bergey's manual qu'en 1959.

Le pouvoir pathogène de ces bactéries a été longtemps sous-estimé. Les infections sont le plus souvent d'origine hydrique.

Les *Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies dotés d'une oxydase, fermentant le glucose avec ou sans gaz, réduisant les nitrates en nitrites, mobiles par ciliature polaire ou immobiles, résistants au composé 0/129.

I.3.2. Pouvoir pathogène et habitat

Les *Aeromonas* sont isolés fréquemment dans les eaux douées (bactéries dulçaquicoles), dans les eaux stagnantes, les eaux courantes, les eaux de boisson, les eaux de mer ou de lagunes. Ce sont des bactéries caractéristiques des eaux de surface. Ces bactéries sont retrouvées chez de nombreux animaux (sangsues, grenouilles, poissons, reptiles, oiseaux) et les aliments (coquillages et poissons).

Elles peuvent persister plusieurs mois ou années dans les eaux ou les sols. A l'exception d'*A. salmonicida,* les *Aeromonas* peuvent infecter l'homme après immersion (noyades) ou après ingestion de produits contaminés (y compris eau potable).

Les germes pénètrent généralement dans l'organisme à la suite d'une effraction, à la faveur d'un traumatisme ou par voie digestive grâce à une lésion de la muqueuse. Les infections concernent souvent les sujets immunodéprimés. Le tableau clinique peut être celui d'un choc endotoxinique, ou bien les manifestations sont liées aux toxines élaborées par la bactérie. Des infections pulmonaires après noyade ont aussi été décrites.

Actuellement, ce genre regroupe une trentaine d'espèces, dont trois sont communément isolées d'infections humaines :

A. hydrophila (espèce type)

A. veronii biovar *sobria*

A. caviae

I.3.3. Caractères bactériologiques

Les *Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif de 1-4 p.m/0,6 prn, mobiles par ciliature polaire, habituellement monotriches ou immobiles (A. *salmonicida).* Ils peuvent prendre un aspect coccobacillaire ou en courtes chaînettes. La temperature optimale de croissance est de 30 °C (sauf *A. salmonicida*). Le pH optimal est de 7. Les souches ne cultivent pas en milieu hypersalé.

Les colonies d'*Aeromonas* apparaissent en 24 heures en milieu solide et ressemblent à celles des coliformes. La culture est possible sur milieux trypticase-soja ou gélose au sang, mais aussi sur milieux sélectifs, MacConkey, EMB ou Drigalski, voire pour les selles sur milieu rendu sélectif par l'addition d'ampicilline.

La resistance au composé vibriostatique O/129 permet de les différencier aisement des *Vibrio*. Le caractère gélatinolytique et l'absence d'ODC permettent de les distinguer de *Plesiomonas shigelloides* (Tableau XIII).

Tableau XIII : Caractères différentiels des *Aeromonas*, *Plesiomonas*.

Caractères d'orientation	***Aeromonas***				***Plesiomonas shigelloides***
	hydrophila	***caviae***	***Veronii* subsp.**		
			sobria	***veronii***	
Gaz glucose	+	-	+	+	-
VP	+	-	+	+	-
ADH	+	+	+	-	+
LDC	+	-	+	+	+
ODC	-	-	-	+	+
Esculine	+	+	-	+	-
Arabinose	+	+	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	+
Ampicilline	R	R	R	R	S
Céfalotine	R	R	S	S	S

I.4. Genre *Plesiomonas*

I.4.1. Généralités

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce : *Plesiomonas shigelloides.* C'est un bacille à Gram négatif aero-anaérobie facultatif, était anciennement classé dans la famille des *Vibrionaceae* mais récemment est reclassé dans la famille des *Enterobacteriaceae* et est le seul genre de cette famille oxydase positive.

I.4.2. Caractères bactériologiques

C'est une bactérie aero-anéerobie facultative, mobile, oxydase positive, fermentant le glucose sans production de gaz, réduisant les nitrates en nitrites. Contrairement aux *Vibrio* et *Aeromonas*, cette espèce ne produit pas d'enzymes exocellulaires (DNAse, gélatinase, etc.). La température de croissance optimale est de 37 °C. *Plesiomonas* ne peut pas croitre en dessous de 8 °C. *Plesiomonas* cultive bien sur milieux ordinaires.

Plesiomonas est résistant à l'O/129 si on utilise des disques charges à 10 µg, mais sensible si les disques sont charges à 150 µg.

I.4.3. Pouvoir pathogène et habitat

Plesiomonas shigelloides est une bactérie des eaux qui peut être retrouvée dans l'intestin de divers animaux (chats, vaches, chiens, porcs et singes). Chez l'homme, cette espèce a été retrouvée dans des selles de sujets diarrhéiques surtout en zone. Cette espèce est impliquée principalement dans des troubles gastro-intestinaux, septicémies chez des sujets immunodéprimés, des méningites et autres maladies non diarrhéiques.

I.4.4. Identification

Les caractères ODC, LDC, ADH positifs et la fréquente sensibilité au composé vibriostatique sont les éléments majeurs d'orientation (Tableau XIII). Les géloses ordinaires peuvent être utilisées pour isoler *P. shigelloides* à partir des selles ; les milieux sélectifs usuels utilisés pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella* permettent aussi de cultiver *P. shigelloides.*

Sur gélose Columbia au sang, les souches de *Plesiomonas* ne sont pas hémolytiques, contrairement aux *Vibrio* et *Aeromonas*.

Les isolements, en dehors de recherches systématiques, sont souvent le fait du hasard. Les principaux produits pathologiques sont : les hémocultures, les pus, les urines, LCR, liquides de ponction, les selles...Les recherches peuvent être effectuées sur les eaux ou les aliments. Les principaux diagnostics différentiels se posent avec les Vibrions, les *Plesiomonas* et les *Pseudomonas.* La fermentation des sucres, le caractère oxydase (+) et la résistance au 0/129 orientent le diagnostic.

II. Bacilles à Gram négatif non exigeants aérobies stricts

Sous le vocable de « bacilles à Gram négatif non fermentaires » sont regroupées plusieurs familles et genres de bactéries mobiles ou immobiles, cultivant sur milieux ordinaires et possédant un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons).

Ces bacilles à métabolisme oxydatif ne fermentent pas les sucres en anaérobiose et sont qualifiés de « non fermentants » ou « non fermentaires ».

II.1. *Pseudomonas aeruginosa*

II.1.1. Généralités

Pseudomonas aeruginosa a été isolée pour la première fois par Gessard en 1882 à partir d'une blessure infectée. Bactérie à Gram négatif, appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae,* elle a été longtemps dénommée bacille pyocyanique, à cause de sa capacité à produire un pigment coloré, la pyocyanine, qui donne aux blessures infectées une couleur bleue très caractéristique.

Elle est capable de métaboliser un grand nombre de substrats carbonés et, bien qu'elle soit aérobie, elle peut se développer en absence d'oxygène en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons. Sa température optimale de croissance est comprise entre 30°C et 37°C, mais elle peut se développer à des températures allant de 4°C à 42°C en ralentissant son métabolisme.

II.1.2. Habitat et pouvoir pathogène

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire, retrouvée principalement dans des environnements humides. Ses capacités d'adaptation lui permettent également d'envahir différents hôtes, tels que des végétaux, animaux, insectes, humains, etc. Chez l'Homme, *P. aeruginosa* peut notamment être présente dans la flore intestinale de porteurs sains.

Cette espèce est principalement responsable d'infections acquises à l'hôpital : Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (mucoviscidose), pulmonaires (chez les immunodéprimés ou les malades ventilés), oculaires, ostéoarticulaires. Elle peut également causer des infections sévères chez les grands brûlés, des plaies traumatiques ou postopératoires, des septicémies, des endocardites.

P. aeruginosa est capable de résister aux produits désinfectants, et colonise ainsi les surfaces, matériels médicaux et mains du personnel soignant, et est l'un des principaux agents responsables d'infections nosocomiales.

P. aeruginosa est une bactérie opportuniste peu ou pas virulente chez l'individu sain mais qui peut s'avérer redoutable chez les sujets dont l'immunité est affaiblie. Son génome (très grand) lui permet de s'adapter aux environnements hostiles et d'infecter divers hôtes dont l'Homme grâce à la production de facteurs de virulence. Ces facteurs concourent à la pathogénicité par des actions complémentaires, sans qu'aucun d'entre eux ne soit décisif dans le processus physiopathologique. On parle de virulence multifactorielle combinatoire. Les principaux sont décrits ci-dessous.

- **Le système de sécrétion de type III** (SST3)
- La phospholipase **ExoU** joue un rôle majeur dans la pneumopathie nosocomiale du patient intubé-ventilé.
- L'exotoxine **ExoS**, une enzyme cytotoxique à activité ADP-ribosyl-transférase.
- **Les rhamnolipides** sont des glycolipides qui lysent les érythrocytes et les leucocytes en agissant sur leur membrane. Ils contribuent à l'apparition de pneumopathies acquises sous ventilation.
- **LasB** est une métallo-peptidase à large spectre capable de dégrader les peptides antimicrobiens de l'hôte (cathélicidine LL-37, pro-protéine hCAP18) et certains composés de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et les collagènes de types 3 et 4. L'enzyme est impliquée dans la survenue de kératites et de pneumopathies nosocomiales. La sévérité des infections pulmonaires est liée, en partie, à la quantité de protéase LasB produite *in situ par P. aeruginosa.*

  Grâce à l'action synergique de trois systèmes de communication inter-cellulaires, la bactérie peut activer une cascade complexe de régulation conduisant à la production simultanée de plusieurs facteurs de virulence au niveau du site infectieux, lorsqu'une certaine densité de population est atteinte. Ce type de régulation globale est appelé ***quorum sensing.***

  La virulence de *P. aeruginosa* liée au *quorum sensing* a été démontrée dans un grand nombre de modèles animaux. La production rapide et massive de facteurs de virulence au cours de l'hospitalisation pourrait expliquer l'apparition brusque d'une **infection aiguë** chez un patient jusque-là colonisé par *P. aeruginosa*, c'est-à-dire ne présentant pas de signes cliniques ou biologiques patents d'infection. Par ailleurs, les cellules de *P. aeruginosa* sont capables de s'associer entre elles pour former une structure hétérogène appelée **biofilm**. Dans ce cas, les bactéries s'entourent d'une matrice complexe formée de polymères (ADN, polysaccharides) et de protéines, qui les met à l'abri des défenses immunitaires de l'hôte.

II.1.3. Caractères bactériologiques

- **Caractères culturaux**

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif non fermentant, aérobie strict, non sporulé, fin, mobile grâce à une ciliature polaire. Sa culture est aisée, entre 10°C et 42°C, sur des milieux ordinaires (Mueller Hinton), sélectifs (géloses Drigalski, Hektoën, Mac Conkey ou renfermant du cétrimide) ou chromogènes. La température optimale de croissance est de 30 °C.

Sur milieux solides, trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée (Fig. 22) :

- Colonies larges « la » de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses, avec une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques ;
- Colonies plus petites lisses « S » bombées à bord régulier ;
- Colonies muqueuses « M », bombées, rencontrées chez les souches produisant un *slime* composé d'un polymère d'alginates.

Figure 22 : Différentes colonies de P. *P. aeruginosa*

Les souches isolées de prélèvement cliniques donnent généralement des colonies ***la*** alors que les souches isolées de l'environnement donnent le plus souvent des colonies ***sm***. Les colonies **muqueuses,** sont formées par des souches isolées chez l'homme de l'appareil respiratoire (patients atteints de mucoviscidose) ou du tractus urinaire.

Pour les souches pigmentées, la simple constatation d'une pigmentation verte du fait de la production de deux pigments (Fig. 23), la pyocyanine (hydrosoluble) et la pyoverdine (soluble dans le chloroforme) établit le diagnostic.

Figure 23: Production de pyocyanine et de pyoverdine caractéristique de *P. aeruginosa* sur milieux de King A et B. La pyocyanine est hydrosoluble (à gauche) et la pyoverdine soluble dans le chloroforme (à droite).

Les pyoverdines : La pyoverdine est le terme générique d'une vaste famille de pigments jaunes-verts fluorescents, solubles dans le chloroforme. La **pyoverdine** joue pour la bactérie le rôle d'un sidérophore : molécule captant les ions fer ferrique.

Pigments phénaziniques : La **pyocyanine** est soluble dans l'eau. *In vivo*, la pyocyanine joue le rôle de transporteur d'électrons dans des conditions d'anaérobiose. De plus, elle possède une activité bactériostatique sur diverses bactéries, surtout à Gram positif. La présence d'un pus bleu dans les plaies (notamment après amputation) était considérée comme un signe encourageant puisqu'il éloignait le spectre de la gangrène.

À partir de prélèvements polymicrobiens, il est nécessaire d'avoir recours à un milieu sélectif contenant du cétrimide (ammonium quaternaire) associé ou non à de l'acide nalidixique.

- **Identification**

Pour *P. aeruginosa*, devant des souches non pigmentées, le recours à des galeries est nécessaire, mais les résultats obtenus avec celles-ci sont parfois erronés et de plus en plus souvent on doit recourir à des méthodes moléculaires pour obtenir un diagnostic d'espèces précis, notamment pour les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose.

Les caractères différentiels avec les autres espèces du groupe fluorescent et du genre sont indiqués dans le tableau XIV.

Les *Pseudomonas* sont des bactéries à métabolisme oxydatif, c'est à dire ayant recours à des réactions enzymatiques d'oxydo-réduction pour l'utilisation des nutriments comme sources de carbone et d'énergie. Parmi les caractéristiques biochimiques de *P. aeruginosa*, on retiendra la production d'une **cytochrome *C* oxydase** (test de l'oxydase positive), d'une nitrate permettant la réduction des nitrates (NO3) en monoxyde d'azote (NO) puis en azote (N2), ainsi que d'une arginine déiminase (ADH positive).

Le métabolisme respiratoire oxydatif peut être vérifier sur gélose MEVAG (incapable de fermenter le glucose).

Tableau XIV : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des espèces du genre *Pseudomonas.*

Caracteres / Espèces	pigment	Nombre de flagelles	oxydase	croissance 41C	croissance 4C	Reduction $NO3^-$	ADH	Hydrolyse Gélatine	Hydrolyse Lécithines	Hydrolyse urée	Citrate de Simmons	Acidification Glucose	Acidification Tréhalose	Acidification Mannitol	Acidification Xylose	Acidification Maltose
P. aeruginosa	PCPV	1	+	+	-	+	+	+	V	V	+	+	-	+	+	-
P. fluorescens	PV		+	-	+	-	+	+	+	V	+	+	+	+	+	-
P. putida	PV		+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	V
P. monteilii	PV		+	-	-	-	+	-	-	V	+	+	-	-	-	-
P. alcaligenes	C	1	+	V	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-
P. pseudoalcaligenes		1	+	+	+	+	V	-	-	-	V	+	-	-	-	-
P. stutzeri	C	1	+	V	+	+	-	-	-	-	+	+	-	V	+	+
P. mendocina	C	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	V	V	-
P. luteola[a]	C		-	+	+	V	+	V	-	V	+	+	ND	V	+	+
P. oryzihabitans[b]	C	1	-	V	+	-	-	-	-	V	+	+	ND	+	+	+

II.2. *Acinetobacter*

II.2.1. Généralités

Le genre *Acinetobacter* rassemble des bacilles à Gram négatif (avec tendance à la résistance à la décoloration) d'aspect coccoïde en phase stationnaire (1 à 1,5 sur 1,5 à 2,5 µm). Ces bacilles aérobies stricts non pigmentés et non fermentaires sont dépourvus de flagelles, ne réduisent pas les nitrates et ne possèdent pas de cytochrome oxydase. La plupart des souches peuvent se développer entre 20 et 30 °C en milieu minimal additionné d'une source de carbone. Le contenu en GC (guanine-cytosine) est compris entre 36 et 45 % et le test de transformation proposé par Juni a longtemps fait office de référence pour identifier une souche au niveau du genre *Acinetobacter.*

II.2.2. Classification – nomenclature

Acinetobacter a été décrit en 1911 par Beijerinck, un microbiologiste hollandaise. Il a nommé *Micrococcus calcoaceticus*. La désignation actuelle du genre *Acinetobacter* a été proposée par Brisou et Prévot en 1954.

Ce genre bactérien appartient à la famille *Moraxellaceae* qui fait partie de l'ordre des *Pseudomonadales*. Le genre *Acinetobacter* comprend 39 espèces et *A. baumannii* est l'espèce la plus souvent isolée en milieu hospitalier.

II.2.3. Habitat et pouvoir pathogène

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquistes (eau, sol, végétaux, aliments). Chez l'homme, les *Acinetobacter* font partie de la flore cutanée de la peau saine, et sont souvent retrouvés dans les localisations humides.

Dans l'environnement hospitalier, *A. baumannii* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les infections hospitalières: son réservoir est le patient et son environnement. Le portage de ces bactéries est cutané, respiratoire, et intestinal. On les isole aussi de divers matériel: cathéters, appareils de ventilation assistée, robinets et tout équipement capable de produire des aerosols.

Les *Acinetobacter* sont principalement responsables d'infections nosocomiales, septicémies, méningites, suppurations diverses, infections urinaires, pneumopathie. Les souches d'*A. baumannii* sont généralement responsable infections nosocomiales dans des services accueillant des patients fragilisés, notamment les services de soins intensifs et de réanimation.

Les *Acinetobacter baumannii* sont considérés comme des bactéries peu pathogènes, provoquant des signes cliniques chez des patients fragilisés mais rarement chez des individus immunocompétents.

La production de slime (polysaccharides de surface) par les souches de *Acinetobacter sp.* inhibe la migration des granulocytes neutrophiles et possède un pouvoir toxique pour ces cellules.

Les espèces du genre *Acinetobacter* possèdent un lipopolysaccharide impliqué dans l'altération de l'action bactéricide du complément dans le sérum humain en agissant de façon synergique avec la capsule polysaccharidique.

D'autres facteurs peuvent renforcer la virulence des souches tels que les fimbriae responsables de l'adhérence à l'épithélium bronchique et gastrique, des enzymes responsables de lésions des lipides tissulaires telles que les estérases, les aminopeptidases et les uréases et des protéines de la membrane externe « OmpA » capables d'induire l'apoptose des cellules épithéliales de l'hôte.

De nombreux facteurs de virulence ont été proposes chez *A. baumannii*, à l'instar de la mobilité, l'adhésion, la formation de biofilms, des systèmes d'acquisition du fer, de la protéine de membrane externe OmpA, des phospholipases, la capsule et les composants du LPS.

II.2.4. Caractères bactériologiques

- **Caractères morphologiques et culturaux**

Ce sont des coccobacilles, courts, à Gram négatif, non sporulés, parfois capsulés, immobiles.

L'identification des diverses espèces est difficile. En pratique, l'identification repose sur la capacité de développement à 37, 41 et 44°C en bouillon trypticase soja après 48 heures d'incubation et l'hydrolyse de la gélatine. Ces procédés ne suffisent pas pour le diagnostic exact de l'espèce. Par contre, *A. baumannii* se caractérise par sa température de croissance entre 15°C et 44°C, critère essentiel dans le diagnostic différentiel avec les autres espèces.

L'isolement en milieu solide peut être obtenu après incubation à température comprise entre 30 et 37 °C sur les milieux conventionnels (gélose au sang, gélose chocolat, gélose trypticase soja, etc.) et sur les milieux sélectifs des bacilles à Gram négatif comme la gélose de Mac Conkey ou la gélose de Drigalski.

- **Caractères biochimiques**

Ce sont des aérobies stricts, catalase positive, oxydase négative, prototrophes, ils ne réduisent généralement pas les nitrates en nitrites en milieu complexe. Toutefois, certaines souches réduisent les nitrates en milieu minéral minimum, mais ces souches ne sont pas

capables de croître en anaérobiose en utilisant les nitrates comme accepteur final d'électrons. L'oxydation du glucose et d'autres sucres en acide gluconique résulte de la présence d'une glucose déshydrogénase membranaire. Une réponse négative est obtenue pour les tests LDC, ODC, ADH, production d'hydrogène sulfuré, indole, β-galactosidase et DNase. Une réponse variable est obtenue pour l'hydrolyse de la gélatine. Quelques souches produisent une uréase ou une phénylalanine désaminase d'activité faible.

II.2.5. Diagnostic bactériologique

- **Prélèvements**

Les urines, les cathéters, les aspirations bronchiques, les hémocultures constituent les prélèvements les plus fréquents à l'origine de l'isolement des *Acinetobacter*.

- **Examen direct**

Les *Acinetobacter* apparaissent sur les frottis de produits pathologiques colorés par la technique de Gram comme des bacilles à Gram négatif souvent coccoïdes, parfois entourés d'une capsule.

- **Milieux de culture**

L'isolement en milieu solide peut être obtenu après incubation à température comprise entre 30 et 37 °C sur les milieux conventionnels tous germes (gélose au sang, gélose chocolat, gélose trypticase soja, gélose BCP, etc.) et sur les milieux dédiés aux bacilles à Gram négatif comme la gélose de MacConkey ou la gélose de Drigalski. En revanche, la gélose SS ne permet la croissance que de quelques espèces. Les colonies apparaissent en général lactose négatif sur les milieux lactosés car, lorsque l'attaque oxydative du lactose lieu, celle-ci est souvent retardée. À ce stade, l'aspect à la coloration de Gram constitue une bonne orientation diagnostique.

- **Diagnostic**

Diagnostic du genre

Il est en général aisé d'identifier un bacille à Gram négatif coccoïde au niveau du genre *Acinetobacter* par le cumul des caractères aérobie strict, absence de nitrate réductase, réaction à l'oxydase négative, absence de mobilité. Le test de transformation défini par Juni, simple dans sa réalisation, peut servir de référence. Il repose sur la « réparation » d'un mutant auxotrophe pour le tryptophane de la souche spontanément compétente BD413 qui devient prototrophe au contact d'un extrait d'ADN, pourvu que celui-ci provienne d'une souche appartenant au genre *Acinetobacter*.

Diagnostic de l'espèce

L'identification des diverses espèces par les procédés traditionnels est difficile. En routine traditionnelle, l'identification reposait sur la capacité de développement à 37, 41 et 44 °C en bouillon trypticase-soja après 48 heures, l'hydrolyse de la gélatine et les galeries d'identification commercialisées (API 20 NE). Ces procédés ne suffisent pas pour le diagnostic précis de l'espèce; par chance, *A. baumannii*, qui constitue l'espèce de loin la plus distribuée en pathologie humaine, se distingue des autres espèces par sa capacité de développement à 44 °C. Toutefois, certaines souches d'*A. nosocomialis* partagent cette aptitude de croître à 44 °C (tableau XV).

En fait, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a révolutionné l'identification des espèces.

Tableau XV: Caractères différentiels des espèces d'*Acinetobacter* principalement rencontrées en clinique.

	A. baumannii	*A. calcoaceticus*	*A. haemolyticus*	*A. junii*	*A. johnsonii*	*A. lwoffii*
Croissance à 37 °C	+	+	+	+	-	+
Croissance à 41 °C	+	-	-	+	-	-
Croissance à 44 °C	+	-	-	-	-	-
Hydrolyse de la gélatine	-	-	+	-	-	-
Hémolyse	-	-	+	-	-	-

III. Bacilles à Gram négatif exigeants aéro-anaérobies facultatifs

III.1. *Bordetella*

III.1.1. Généralités

En 1900, Bordet décrivait un bacille à Gram négatif comme agent de la coqueluche. En 1906, Bordet et Gengou ont réussi à faire pousser ce bacille sur un milieu gélose peptoné à base de pomme de terre et additionné de sang.

La coqueluche a été longtemps une cause importante de mortalité infantile. La vaccination a permis de faire disparaître cette cause de mortalité. Néanmoins des épidémies pourraient réapparaître si la vaccination n'était pas suffisamment appliquée. C'est une maladie à déclaration obligatoire.

Le genre *Bordetella* regroupe une espèce strictement humaine (***B. pertussis***) et des espèces retrouvées à la fois chez l'homme et l'animal (***B. parapertussis, B. bronchiseptica***, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii* et *B. trematum*) ainsi qu'une espèce de l'environnement retrouvée très rarement chez l'homme (*B. petrii*).

Les bactéries du genre *Bordetella* pathogènes pour l'homme sont classiquement de petits coccobacilles à Gram négatif à coloration bipolaire, immobiles, à l'exception de *B. bronchiseptica*. *B. pertussis* est très court (0,2 à 0,3 µm × 0,5 à 0,8 µm) et immobile.

Les *Bordetella* sont disposées seuls ou par paires mais rarement en courtes chaînettes ; aérobies stricts, à métabolisme respiratoire ; ne fermentant aucun hydrate de carbone et ne produisant pas de gaz ; exigeants en nicotinamide et en dérivés soufrés (cystéine), ayant un tropisme pour les muqueuses respiratoires des mammifères.

III.1.2. Habitat et pouvoir pathogène

B. pertussis a comme réservoir unique l'homme. On pense que des adultes immuns puissent être les porteurs du bacille au niveau de leur muqueuse oro-pharyngée et le transmettre ainsi à des enfants non immunisés. La contamination se fait par voie aérienne.

La coqueluche évolue selon un mode endémo-épidémique. Dans les pays où la protection vaccinale est bonne, les épidémies sont rares.

Classiquement, deux espèces de *Bordetella* sont responsables de la coqueluche : *B. pertussis*, qui est strictement humain, et *B. parapertussis*. La durée des symptômes est moins longue pour la deuxième espèce. *B. parapertussis* est aussi retrouvée chez les ovins.

B. bronchiseptica peut être pathogène pour des hommes fragilisés tels que des immunodéprimés de plus de 45 ans atteints de symptômes respiratoires et souvent fumeurs. Cette espèce se retrouve chez de nombreuses espèces animales.

Après une incubation silencieuse d'environ une semaine, la période d'invasion est marquée par un catarrhe rhino-trachéobronchique qui constitue la phase la plus contagieuse. Elle est suivie par la période des quintes où le diagnostic clinique est évident en raison de la toux paroxystique (chant du coq). Atteignant surtout les jeunes enfants, la coqueluche chez le nourrisson de moins de 3 mois est une maladie grave parfois mortelle, la mort survenant par asphyxie.

III.1.3. Physiopathologie

Le bacille a un tropisme pour les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. Les bactéries adhèrent aux cils vibratiles des cellules, provoquent une paralysie des cils et une activation des sécrétions muqueuses. Les cellules lésées et les sécrétions sont éliminées par la toux.

A la phase d'état de la maladie, il n'y a plus de *B. pertussis* viables dans les sécrétions. Les signes cliniques observés sont alors dus à des facteurs de virulence libérés par la bactérie.
B. pertusis possède plusieurs antigènes, un antigène capsulaire polyosidique, un antigène somatique thermostable.
Plusieurs facteurs de virulence sont produits :
— la toxine pertussique (PT), c'est une toxine protéique libérée partiellement par le germe. Cette protéine oligomérique agit sur différentes cellules eucaryotes en augmentant la concentration intra-cellulaire de l'AMPc (en particulier dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire). Elle provoque une hyperlymphocytose qui est un signe clinique important dans cette maladie.
— l'adénylate-cyclase exocellulaire de *B. pertussis* est excrétée sous la forme d'une protéine de 200 kDa dont un fragment de 43 kDa correspond à l'adénylate-cyclase, les autres parties possédant des fonctions de fixation et d'intemalisation, elle possède une activité hémolytique, elle est activée par la calmoduline intra-cellulaire. Son rôle essentiel est de diminuer les fonctions phagocytaires des polynucléaires et des macrophages.
— les hémagglutinines sont impliquées dans l'attachement de *B. pertussis* aux cellules épithéliales.
— d'autres toxines ont été décrites : une toxine dermonécrotique (HLT = heat labile toxin), une cytotoxine trachéale (TCT = trachéal cytotoxin) agissant sur les cellules ciliées.

III.1.4. Diagnostic bactériologique

III.1.4.1. Diagnostic direct

- **Prélèvements**

II doit être précoce, dès l'apparition des premiers signes cliniques. En effet, les bactéries se raréfient dès l'apparition des quintes.

Chez le nourrisson, l'aspiration nasopharyngée douce est recommandée.

Chez les adolescents ou les adultes, le recueil des mucosités se fait soit à l'aide d'un écouvillon souple en dacron, introduit par la narine jusqu'à la fosse nasale postérieure.

B. pertussis est très fragile et le prélèvement doit être acheminé immédiatement au laboratoire. Un milieu de transport Amies® peut être utilise si l'acheminement du prélèvement au laboratoire est trop long.

- **Culture**

La culture doit être tentée systématiquement (spécificité 100 %) dans les trois premières semaines de la maladie, même si la sensibilité n'est que de 50 à 60 % durant la 1re semaine de toux et qu'elle diminue fortement ensuite.

Le milieu de Bordet-Gengou (Fig. 24) est un milieu gélosé constitué d'une infusion de pomme de terre, de glycérine et de NaCl auquel est ajouté 15 % de sang frais stérile défibriné de

cheval, de mouton ou de lapin.

Le milieu de Regan-Lowe peut être également utilisé. La sélectivité de ces milieux de culture peut être augmentée par ajout de céphalexine à 40 µg/ml. La culture se fait en aérobiose à 36 °C en atmosphère humide. Les premières colonies hémolytiques n'apparaissent qu'entre 3 et 7 jours. Les colonies apparaissent en ≪ gouttes de mercure ≫ (Fig. 24). Un resultat de culture négative ne peut être rendu qu'après 10 jours d'incubation des milieux.

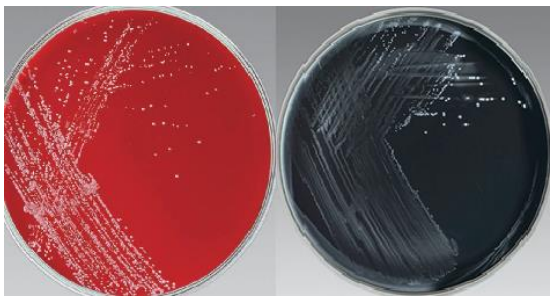

Figure 24 : Aspect des colonies de *Bordetella pertussis* sur milieu de Bordet-Gengou (à gauche) et milieu Regan-Lowe (à droite).

Le diagnostic d'orientation repose sur des tests assez indiqués dans le tableau XVI et l'identification est correctement realisée par la spectrométrie MALDI-TOF.

Tableau XVI : Caractère d'orientation diagnostique des *Bordetella*

Caractère	***B. pertussis***	***B. parapertusis***	***B. bronchiseptica***	***B. holmesii***
Délai de croissance sur Bordet-Gengou	**3–5 jours**	**2 jours**	**1 jour**	**2 jours**
Croissance sur gélose au sang	–	+	+	+
Mobilité	–	–	+	–
Oxydase	+	–	–	–
Uréase	–	+	+	–
Nitrate réductase	–	–	+	–

- **Recherche de constituants bactériens sans culture par biologie moléculaire**

En raison de sa sensibilité et de sa rapidité d'exécution, l'amplification génique (PCR standard ou par PCR en temps réel) est un diagnostic de choix de la coqueluche sur produit pathologique.

Différentes cibles peuvent être utilisées tells que le gène codant la toxine de *Pertussis.*

III.1.4.2. Diagnostic indirect

La sérologie n'a d'intérêt qu'après 4 à 5 semaines de toux chez une personne non vaccinée depuis trois ans afin de pouvoir l'interpréter correctement. En effet, les anticorps n'apparaissent véritablement qu'après 4 à 5 semaines de toux avec un pic à 5 à 6 semaines, et leur progression à l'exception du pic est parallèle à celle d'une personne vaccinée depuis moins de 3 ans.

Elle ne doit jamais être réalisée chez les nouveau-nés, les nourrissons et les enfants; elle était possible chez les adolescents et adultes après avoir correctement évalué l'intérêt de cette prescription. La technique de référence est la détection par technique ELISA d'IgG anti-toxine *Pertussis* (PT) spécifique de *B. pertussis* dans le sérum.

La sérologie de la coqueluche présente différents inconvénients qui doivent conduire à son abandon:

- Absence de test comerciaux validés,
- Une trés mauvaise spécificité: incapacité à différencier anticorps vacinnaux et anticorps infectieux.

III.2. *Francisella*

III.2.1. Généralités

Francisella tularensis a été isolée après la survenue d'une maladie nouvelle, pseudo-peste de l'écureuil, observée dans le Comté de Tulare en Californie en 1911.

En 1921, Francis, bactériologiste américain, étudie l'agent causal et la pathogénie et fait le rapprochement avec une maladie connue chez le lapin et les bovins depuis le début du siècle dans l'Ouest américain. Il reconnait le premier cas humain après contamination de laboratoire.
Du fait de son haut potentiel infectieux, l'espece *F. tularensis subsp. Tularensis* est considérée comme un agent potentiel du bioterorisme, classé dans la catégorie A du Centers for Disease control and prevention (CDC).

Les bactéries du genre *Francisella* sont responsables de la tularémie. Ce sont des coccobacilles à Gram négatif (0,2 µm × 0,2 à 0,7 µm), immobiles, aérobies stricts, sa culture est lente sur milieux spéciaux enrichis. Il est catalase positive, oxydase négative, produit du et acidifie certains sucres sans production de gaz.

Le genre *Francisella* est constitué de deux espèces : *F. tularensis*, agent de la tularémie et *F. novicida* isolée une seule fois et non pathogène.

Ce sont des pathogènes hautement contagieux dont l'isolement ne peut être réalisé que dans des laboratoires de sécurité de niveau P3.

La difficulté de culture et cette contrainte sécuritaire font que la recherche dans les laboratoires de routine est à proscrire.

III.2.2. Habitat et pouvoir pathogène

Les *Francisella* sont largement distribuées dans l'environnement et peuvent résister plusieurs semaines au moins dans le milieu extérieur ou dans des cadavres d'animaux.
Elles infectent de nombreuses espèces animales sauvages ou domestiques.

Les infections humaines surviennent principalement lors d'un contact direct avec un animal infecté (notament les chasseurs), rarement par piqure de tique, parfois par inhalation, voire ingestion.

La tularémie est due à l'espèce ***F. tularensis*** qui est un pathogène obligatoire chez l'homme et l'animal. Il existe trois sous-espèces, *tularensis* (type A), *holarctica* (type B) et *mediasiatica*.
Les manifestations cliniques de la tularemie dépendent notamment de la porte d'entrée de l'infection. On rencontre des formes ulcéroganglionnaires (60 à 80 % des cas) des membres

(membre supérieur le plus souvent), ganglionnaires, oculo-ganglionnaires, oropharyngées, pulmonaires, thyphoidiques, avec rarement une dissémination hématogène.

III.2.3. Diagnostic bactériologique

III.2.3.1. Diagnostic direct

- **Prélèvements**

Par ordre de fréquence et d'importance, l'isolement de *F. tularensis* est effectué à partir d'une lésion cutanée d'inoculation, d'une ponction ou biopsie ganglionnaires, plus rarement, du sang, d'un prélèvement conjonctival, d'un prélèvement pharyngé, d'une expectoration.
Les prélèvements doivent être ensemencés des réceptions au laboratoire. S'ils ne sont pas traités sur place, ils peuvent être places dans des milieux de transport.

- **Culture et identification**

L'isolement est difficile car la culture est lente, fastidieuse et peu sensible. On utilise des milieux riches : milieu de Francis, gélose ≪ chocolat ≫ avec Isovitalex®/Polyvitex®, ou milieu *Legionella* BCYE contenant de la cystéine. Les géloses seront incubées pendant 14 jours à 37°C en aérobiose (l'atmosphère CO_2 n'est pas utile voire néfaste), et les colonies commencent à apparaitre au bout de 2 à 3 jours.

Les colonies sont de 1 à 2 mm, grisâtres, glaireuses. Après coloration, on observe des coccobacilles à Gram négatif très fins.

F. tularensis est oxydase –, faiblement catalase + et possède une β-lactamase, uréase –, et n'est pas exigeant en facteurs X et V. Les souches de *F. tularensis* sont parfois capsulées, immobiles, oxydase –, nitrate réductase –, acidifient le glucose et le maltose, mais pas le saccharose.

On peut identifier le genre *Francisella* par agglutination avec un sérum spécifique. Il n'existe pas de galeries biochimiques permettant d'identifier les espèces du genre *Francisella*.

L'identification moderne se fait soit par PCR, soit directement sur la culture après inactivation par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

On peut rechercher le pouvoir pathogène sur animal notamment sur souris inoculée par voie intrapéritonéale.
Amplification génique

La PCR permet un diagnostic précoce ou confirme un diagnostic établi selon une approche immunologique. Elle est plus sensible que la culture et a été utilisée à partir de différents prélèvements cliniques. Elle peut être positive même sur des prélèvements réalisés tardivement (> 2 semaines de maladie).

III.2.3.2. Diagnostic indirect

La sérologie est la méthode la plus utilisée. Des titres significatifs d'anticorps ne sont habituellement détectés avant 2 à 3 semaines après le début des signes cliniques et atteignent habituellement un pic au bout de 1 à 2 mois.

Le seuil considéré comme significatif est le 1:160^{e}, mais l'idéal est de disposer d'une paire de sérums prélevés a 15 jours d'intervalle (dont le premier aussi précoce que possible) et d'observer une séroconversion. Les anticorps peuvent persister 10 ans et la presence d'IgM ne signe donc pas toujours une infection récente.

III.3. *Pasteurella*

III.3.1. Généralités

Le genre *Pasteurella* est ainsi désigné en hommage à Louis Pasteur dont les travaux sur le « choléra des poules », septicémie hémorragique décimant les élevages, aboutirent en 1880 à la première vaccination anti-bactérienne.

Les *Pasteurella* sont des petits bacilles à Gram négatif de la famille des *Pasteurellaceae*, à coloration habituellement bipolaire (Fig. 25) qui ont une forme allant de coccobacilles (0,3 à 1 µm) à des aspects plus longs (2 à 5 µm). Les chainettes sont rares. Ce sont des bactéries immobiles. La température de croissance optimale est de 37 °C. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies dont la croissance est accrue en microaérophilie. Elles sont le plus souvent oxydase + et catalase +. Toutes les souches sont sensibles au composé vibriostatique O129.

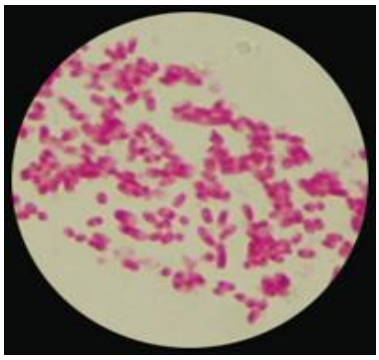

Figure 25 : Un exemple de coloration bi-polaire de *Pasteurella*

Quatre espèces sont principalement impliquées en pathologie humaine : *P. multocida*, *P. dagmatis*, *P. canis* et *P. stomatis*, avec une nette prédominance de la première espèce. L'espèce *multocida* est divisée en trois sous-espèces : *multocida*, *septica*, *gallicida*.

III.3.2. Habitat et pouvoir pathogène

Les *Pasteurella* sont des bacteries commensales du rhinopharynx de nombreux animaux, notamment de mammifères et d'oiseaux domestiques et sauvages, plus rarement au niveau des muqueuses digestives ou génitales. Elles sont présentes dans la salive de presque tous les chiens et chats. Elles peuvent survivre dans le milieu exterieur.

Les pasteurelloses d'inoculation sont assez fréquentes, consécutives le plus souvent à des morsures de chiens ou de chats, ceux-ci étant pour près de la moitié d'entre eux porteurs asymptomatiques au niveau de la cavité buccale ; mais griffures ou léchages des plaies sont parfois à l'origine de l'infection.

Le délai d'incubation est rapide et caractéristique dans le cas de la forme aigue: souvent 3 à 6h et toujours inférieur à 24h. Le patient présente une plaie très inflammatoire, gonflée, œdématiée, douloureuse. Une suppuration hémorragique peut être observée (exsudat purulent).

Typiquement, l'afflux de polynucléaires neutrophiles est important au site infectieux et l'inflammation se développe très rapidement après la morsure. Une lymphangite et adénopathie peuvent être associées. Les complications peuvent apparaitre, il faut systématiquement rechercher une arthrite, une ostéite. En l'absence de traitement, évolution peut se faire vers une forme subaigüe (ténosynovite des extenseurs des doigts, arthrite réactionnelle, voire algodystrophie en 4 à 6 semaines).

Le facteur majeur de pathogénicité est supporté par une toxine peptidique codée par le gène *tox A*, toxine qui a un pouvoir dermonecrotique et ostéolytique.

D'autres complications sont parfois retrouvées, on peut observer des sépticemies, des endocardites, des formes pleuropulmonaires, des méningites et des manifestations diverses purulentes, les formes avec hémocultures positives survenant surtout chez des patients immunodéprimés.

III.3.2. Diagnostic bactériologique direct

- **Prélèvements**

Le prélèvement des sérosités au niveau de la porte d'entrée en pressant les berges est recommandé dans les formes locales ou loco-régionales. Ce prélèvement peut être réalisé par un écouvillon ou par ponction à l'aiguille. Dans tous les cas, l'échantillon sera rapidement adressé au laboratoire, ou, à défaut, on utilise un milieu de transport.

Pour les formes systémiques, le diagnostic est le plus souvent porté lors d'une découverte fortuite à partir d'hémocultures, de cultures de LCR, de liquide pleural, de prélèvements respiratoires. L'orientation diagnostique se fait essentiellement d'après les renseignements cliniques, la notion de morsure animale étant primordiale.

- **Isolement et identification**

Il est indispensable d'ensemencer deux types de milieux enrichis :

■ Une gélose au sang cuit incubée à 37 °C sur **72 à 96 heures** en atmosphère de **CO_2** ;

■ Une gélose au sang incubée en anaérobiose pendant au moins **48 heures à 37 °C.**

Par ailleurs, on peut recourir à un milieu sélectif contenant 2 mg/l d'amikacine et 4 mg/l de vancomycine pour les prélèvements polymicrobiens.

Les *Pasteurella* ne poussent pas sur milieux citrate de Simmons et de MacConkey.

En bouillon, un trouble homogène apparait en 24 heures.

Sur gélose au sang cuit, les colonies lisses peuvent atteindre un diamètre de 2 mm en 48 heures; elles sont grisâtres ou jaunâtres (Fig. 26). Les souches capsulées sont muqueuses. Sur gélose au sang, on n'observe pas d'hémolyse.

Figure 26 : Culture de *Pasteurella* sur gélose au sang cuit

En gélose Viande Foie (VF), la croissance est augmentée dans la zone de microaérophilie (Fig. 27).

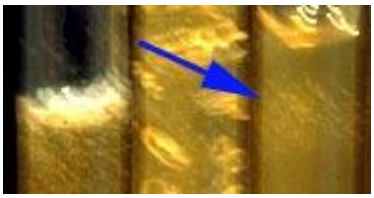

Figure 27 : Culture de Pasteurella sur gélose VF en microaérophilie

L'examen direct montre des petits bacilles à Gram négatif à coloration bipolaire immobiles (avec un aspect en navette).

Les caractères suivant orientent le diagnostic:

- L'oxydase est toujours positive si sa recherche est faite à l'aide de tétraméthyl-pphénylènediamine.
- La catalase, la nitrate-réductase, l'ODC et l'indole sont constamment positives.
- Les caractères suivants sont négatifs: gélatinase, LDC, ADH, uréase et H_2S.
- Toutes les souches sont sensibles au composé vibriostatique O/129.
- La fermentation du glucose se fait toujours sans production de gaz (sauf *P. dagmatis*). Les glucides suivants sont régulièrement attaqués: mannitol, galactose, fructose, mannose, saccharose. Par contre, sont régulièrement négatifs: sorbose, rhamnose, inositol, adonitol.

Les principaux caractères conduisant au diagnostic d'espèce sont résumés dans le tableau XVII.

Tableau XVII: Caractères distinctifs entre les principales espèces de *Pasteurella*

	Sensibilité au O129	**ODC**	**Indole**	**Uréase**	**Fermentation**		
					Glucose	**Maltose**	**Mannitol**
P. multocida	+	+	+	–	+	–	+
P. canis	+	+	d	–	+	–	–
P. dagmatis	+	–	+	+	+ gaz	+	–
P. stomatis	+	–	+	–	+	–	–
P. pneumotropica	+	+	+	+	+	d	–
M. haemolytica	+	–	–	+	+	+	

L'étude de la fermentation du sorbitol et du dulcitol permet chez *P. multocida* de reconnaître les trois sous-espèces indiquées ci-dessous:

Tableau VIII: Caractères distinctifs de trois sous-espèces de *P. multocida*

Sous-espèce de *P. multocida*	**Sorbitol**	**Dulcitol**
multocida	+	-
septica	-	-
gallicida	+	+

III.3.3. Diagnostic indirect

Le sérodiagnostic repose sur la mise en évidence d'anticorps dirigés contre la capsule et le lipopolysaccharide (LPS).

Cinq types capsulaires reconnus au sein de l'espèce *P. multocida* désignés par les lettres A à F, seuls les types A et D ont été isolés chez l'homme.

Le sérodiagnostic a peu d'intérêt en pratique, vu sa faible sensibilité.

III.4. *Haemophilus*

III.4.1. Généralités

La bactérie a été découverte par Pfeiffer, lors de l'épidémie de grippe des années 1890, dans les crachats de grippés. Pfeiffer en fait à tort à l'époque l'agent de la grippe (influenza) et la nomme *Bacillus influenzae*. Quelques années auparavant la même espèce avait été observée dans les sécrétions purulentes de sujets atteints de conjonctivite, en Egypte par Koch et aux USA par Weeks et nommée alors *Bacillus aegyptius* ou Bacille de Koch et Weeks.

Les besoins en facteurs de croissance, soupçonnés par Pfeiffer qui invente la gélose au sang (de pigeon), devenus les facteurs X pour inconnu (hémine) et V pour vitaminique (NAD) présents dans le sang, ont conduit à la dénomination moderne, *Haemophilus influenzae*. Ces besoins nutritionnels sont essentiels pour diviser ce genre en trois groupes: le groupe *H. influenzae* dépendant de l'hème (*H. influenzae*, *H. haemolyticus* et *H. aegyptius*); le groupe *H. parainfluenzae* indépendant de l'hème (*H. parainfluenzae, H. parahaemolyticus, H. paraphrohaemolyticus, H. pittmaniae* et *H. sputorum*); et le groupe contenant *H. ducreyi* qui a besoin d'hème, mais pas de NAD pour sa croissance.

H. influenzae est une espèce classée dans le genre *Haemophilus* au sein de la famille des *Pasteurellaceae*.

Les bactéries du genre *Haemophilus* sont de petits bacilles à Gram négatif, immobiles, non sporulés, parfois capsulés, aéro-anaérobies facultatifs, possédant une nitrate-réductase, présentant une réaction de la catalase et de l'oxydase variables, utilisant les hydrates de carbone par un processus fermentatif, avec l'aspect pléomorphe qui peut aller du coccobacille (0,3 × 0,5 µm) à des formes filamenteuses de plus de 10 µm de long. Leur température optimale de croissance est comprise entre 35 et 37 °C, à l'exception de *H. ducreyi* qui requiert plutôt 33 à 35 °C.

Le genre *Haemophilus*, dont l'espèce type est *H. influenzae*, est constitué de 14 espèces. Neuf espèces présentes chez l'homme et forment au moins trois groupes phylogénétiques distincts : le groupe *influenzae* (*H. influenzae/aegyptius* et *H. haemolyticus*), le groupe *parainfluenzae* (*H. parainfluenzae* et les espèces hémolytiques *H. parahaemolyticus/ paraphrohaemolyticus, H. pittmaniae* et *H. sputorum*) et *H. ducreyi*.

III.4.2. Habitat et pouvoir pathogène

Les *Haemophilus* font partie de la flore normale des muqueuses des voies réspiratoires supérieures et de la cavité buccale de l'homme (à l'exception de *H. ducreyi*) ; ils peuvent aussi

être isolés dans le tube digestif et au niveau de la muqueuse vaginale (les espèces du groupe *parainfluenzae*).

H. influenzae est un commensal habituel de l'homme, plus de 80 % des individus étant colonisés. C'est une bactérie pyogène responsable d'infections variées parfois sévères observées à tous les âges de la vie mais plus fréquemment chez l'enfant. Elle peut exprimer, de façon variable selon les souches, des facteurs de virulence en général absents des autres espèces du genre : *pili* et adhésives de la membrane externe, responsables de l'adhésion à la mucine et aux épithéliums, protéase secrétée clivant les IgA1 des muqueuses, Lip oligosaccharide capable d'induire la formation d'un biofilm et dont la variabilité antigénique contribue à l'échappement à la réponse anticorps, et enfin capsule polysaccharidique (6 sérotypes, de a à f) produite par une minorité de souches, mais à l'origine des infections les plus graves. Le sérotype b est le plus fréquent (Hib) ; il est dû à un polyribosylribitol phosphate ou PRP, antigénique qui, purifié, est utilisé comme vaccin. La vaccination systématique anti-Hib des nourrissons a réduit l'incidence des méningites, épiglottites et pneumonies bactériémiques dans les nombreux pays où elle a été conduite.

H. influenzae est impliqué dans deux catégories d'infections :

- Invasives telles que les méningites, pneumonies, septicémies, arthrites et les ostéomyélites), souvent associées aux isolats capssulés (surtout Hib) ;
- Non invasives telles que les otites moyennes aigues, conjonctivites, sinusites, bronchopneumonies et les infections du per partum, toujours dues à des isolats non capsulés.

H. haemolyticus, phénotypiquement très proche de *H. influenzae*, est dépourvu d'IgA protéase et de capsule. Il est étroitement lié *Haemophilus influenzae* non typable.

H. parainfluenzae fait partie du microbiote oropharyngé et génito-urinaire humain et est de plus en plus reconnu comme pathogène opportuniste causant des maladies invasives, chroniques ou récurrentes, y compris les infections des voies respiratoires, la méningite, l'endocardite, les infections osseuses et articulaires, et l'arthrite.

Haemophilus parainfluenzae fait parti du groupe HACEK (***H****aemophilus*, ***A****ggregatibacter*, ***C****ardiobacterium*, ***E****ikenella*, et ***K****ingella*).

H. ducreyi est l'agent du chancre mou, ulcère génital des régions tropicales transmis sexuellement.

III.4.3. Diagnostic bactériologique

III.4.3.1. Diagnostic direct

- **Prélèvements**

Les prélèvements sont conditionés par la présentation clinique. Tout échantillon provenant d'un patient suspect d'infections invasives doit être manipulé sous poste de sécurité microbiologique de classe II.

Des hémocultures doivent toute suspicion d'infection invasive à *H. influenzae*.

La ponction lombaire est indispensable en cas de méningite.

Elle est cruciale pour le diagnostic des cellulites (périorbitaire et épiglottite notamment), des ostéomyélites à *H. influenzae* et des endocardites à *H. parainfluenzae.*

Selon la localisation des infections non invasives**,** on procèdera au recueil du liquide de tympanocentèse, d'expectoration induite, à une ponction-aspiration du sinus maxillaire, à des écouvillonnages (par exemple muqueuse conjonctivale, vagin, urètre, chancre).

La colonisation étant présente chez plus de 80 % des sujets sains, l'analyse des secrétions nasales et nasopharyngées n'est pas justifiée. L'analyse du liquide gastrique chez le nouveau-né, du liquide amniotique et du placenta chez la mère permet le diagnostic des infections matérnofoétales.

Les produits d'autopsie contribuent au diagnostic des cas de mort in utero.

Les échantillons doivent être acheminés sans délai et à température ambiante au laboratoire compte tenu de l'urgence diagnostique et de la sensibilité des *Haemophilus* à la dessiccation et au froid. Le recours à un milieu de transport gélifié est possible si le délai est supérieur à 3 heures à température ambiante (la viabilité de *H. ducreyi* est toutefois préservée 3 jours à 4 °C).

- **Examen direct**

L'examen direct est utile pour les produits monomicrobiens et lors de méningite (LCR purulent) l'aspect coccobacillaire et le polymorphisme de bactéries à Gram négatif sont de bons éléments d'orientation. La lecture est plus difficile dans les produits souvent polymicrobiens comme les expectorations, les éléments à rechercher sont l'abondance de coccobacilles ou de bacilles fins accompagnant les polynucléaires et le polymorphisme.

L'encapsulation éventuelle est souvent.

La coloration de Gram permet d'observer toutes les espèces, y compris *H. ducreyi* et ses assemblages évocateurs (en banc de poisson, chaine de bicyclette, ou rails de chemin de fer) à partir de l'écouvillonnage d'une ulcération.

- **Culture**

Aucune des espèces d'*Haemophilus* n'est capable de pousser sur gélose ordinaire sans supplémentation par les facteurs X et/ou V.

H. influenzae **et** ***H. haemolyticus*** nécessitent une supplémentation en une source d'hème (hémine ou hématine, facteur X) et en bêta-NAD ou NADP (facteur V). Elle est obtenue en routine sur gélose à l'hémoglobine cuite (≪ chocolat ≫) supplémentée en polyvitaminés (contenant le bêta-NAD).

La gélose au sang (non supplémentée) avec une strie de *S. aureus* qui réalise un apport de facteur V permet la culture par le phénomène de satellitisme (Fig. 28).

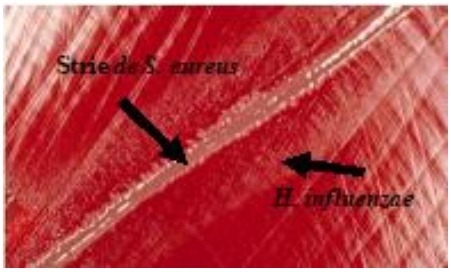

Figure 28 : Culture en satellitisme de *H. influenzae* sur gélose en sang en prise de *S. aureus*

L'incubation est effectuée en atmosphère enrichie de 5 % de CO2 et humide en raison de sa sensibilité à la dessiccation. En 18 à 24 heures à 35 à 37 °C, les colonies sur gélose chocolat (1 à 1,5 mm) sont lisses, légèrement convexes, incolores, à bord régulier. Les colonies des isolats capsules sont brillantes et irisées.

Naturellement résistants aux glycopeptides, lincosamides et à la bacitracine, *H. influenzae* et *H. haemolyticus* peuvent être cultives à partir d'échantillons polymicrobiens sur des milieux sélectifs contenant un ou plusieurs de ces antibiotiques qui inhibent la plupart des autres bactéries du tractus respiratoire, y compris les *Neisseria*.

H. influenzae **et** ***H. haemolyticus*** sont facilement cultivables à partir du sang en flacon d'hémoculture, la lyse des hématies libérant suffisamment des facteurs X et V pour permettre la pousse. Cependant, l'ensemencement en flacon d'hémoculture d'un liquide non hématique (LCR, liquide articulaire) n'est pas recommandé pour ces deux espèces.

Les espèces du groupe ***parainfluenzae*** synthétisent leur propre hème et ne requièrent pas de facteur X. L'aspect sur gélose au sang est néanmoins utile à la détection des espèces β-hémolytiques du groupe (*H. parahaemolyticus, H. pittmaniae* et *H. sputorum*), en dépit de la taille modeste (0,5 à 1 mm) de leurs colonies.

H. ducreyi pousse le mieux dans des conditions microaérophiles à 33-35 °C et dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2. La culture est réalisée sur gélose préparée extemporanément à l'hémoglobine cuite, supplémentée en sérum de veau fœtal (5 %) et rendue sélective par 3 mg/l de vancomycine. Au terme de la période d'incubation (2 à 4 jours), on obtient des colonies gris-jaunâtre de 0,5 mm et qui glissent sur la gélose à la manière d'un palet de hockey.

- **Éléments d'orientation**

Les espèces humaines du genre *Haemophilus* produisent toutes une catalase (à l'exception de *H. ducreyi*) et une oxydase.

La majorité des isolats cliniques de *H. influenzae* (les biotypes I, II, V et VII) produisent de l'indole.

Les *Haemophilus* sont naturellement sensibles au composé vibriostatique O129.

Dans le schéma phénotypique traditionnel, l'identification d'espèce se poursuit par la mise en évidence de l'exigence en facteurs X et/ou V (Fig. 29).

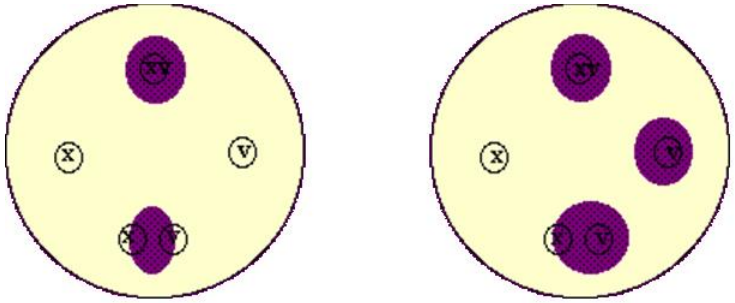

Figure 29 : Exigence en facteurs X et V pour *H. influenzae* (à gauche) et en facteur V pour *H. parainfluenzae (*à droite)

Une alternative pour démontrer l'incapacité des espèces ≪ X-dépendantes ≫ à synthétiser les précurseurs du facteur X à partir de l'acide δ-aminolevulinique (Test ALA).

Tableau XIX: Caractères principaux d'identification des espèces humaines d'*Haemophilus*.

Espèce	Exigence en		Test ALA[a]	β Hémolyse	catalase	Indole	Uréase	β-galactosidase	Acidification à partir du		
	X	V							Sucrose	Mannose	Lactose
H. influenzae/H. aegyptius	+	+	–	–	+	d	d	–	–	–	–
H. haemolyticus	+	+	–	*d*[b]	+	*d*	+	–	–	–	–
H. parainfluenzae	–	+	+	–	+	*d*	*d*	+	+	+	–
H. pittmaniae	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–
H. parahaemolyticus/ H. paraphrohaemolyticus	–	+	+	+	+	–	+	–	+	–	–
H. sputorum	–	+	+	+	+	–	+	+	+	–	–
H. ducreyi	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–

a Test de synthèse des précurseurs de l'hème à partir de l'acide δ-aminolévulinique.

b Caractère variable selon le biotype ou la souche

- **Identification d'espèce**

La détermination des caractères métaboliques nécessaires à l'identification de toutes les espèces d'*Haemophilus* est fastidieuse.

L'identification de toutes les espèces d'*Haemophilus* n'est obtenue en pratique diagnostique que par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette technique permet en particulier de différencier *H. influenzae* des 70 % d'isolats non hémolytiques d'*H. haemolyticus*, autrement indistinguables par les méthodes conventionnelles ou l'analyse des séquences de l'ADN 16S.

- **Typage**

Le biotypage d'*H. influenzae* repose sur trois caractères biochimiques, ornithine décarboxylase, uréase et production d'indole qui définissent 8 biotypes (tableau XX). Les souches capsulées Hib appartiennent presque tous aux biotypes I et II.

Les 6 sérotypes définis par Margaret Pittman en 1931 (a à f) sont identifiés par agglutination à l'aide de sérums spécifiques, mais la sensibilité inconstante de ceux-ci impose une confirmation génétique par PCR : (1) de la présence d'un gène d'encapsulation (*bexA*), (2) d'un gène spécifique du sérotype (*acs*, *bcs*, *ccs*, *dcs*, *ecs*, *fcs*).

Tableau XX: Caractéristiques des biotypes d'*Haemophilus influenzae*.

Biotype	Production d'indole	Uréase	Ornithine décarboxylase
I	+	+	+
II	+	+	–
III	–	+	–
IV	–	+	+
V	+	–	+
VI	–	–	+
VII	+	–	–
VIII	–	–	–

- **Recherche d'antigènes solubles**

Cette recherche n’est plus recommandée en rison de l’insuffisance de sensibilité et de spécificité de la technique.

- **Biologie moléculaire**

La détection par PCR dans le LCR d'ADN d'*H. influenzae* et le génosérotypage capsulaire sont devenus essentiels au diagnostic des méningites bactériennes communautaires, mais ne se substitute pas à la culture pas à la culture, indispensable pour antibiogramme.

III.4.3.2. Diagnostic indirect

Il n’existe pas de diagnostic sérologique des infections à *H. influenza.* On ne recourt au dosage des anticorps anti-Hib que dans le cadre exclusif de l’exploration d’un déficit immunitaire humoral chez un sujet vacciné.

III.5. *Bartonella*

III.5.1. Généralités

Ces bactéries sont classées parmi les protéobactéries du groupe α2 sur la base de la séquence de l'ARN 16S ribosomal. Elles appartiennent à la famille des *Bartonellaceae.*

Depuis la reclassification du genre *Bartonella* en 1993, le nombre d'espèces est passé actuellement de 1 à 45 dont 13 ont été impliqués dans des maladies humaines. De même, l'association de différentes espèces de *Bartonella* avec la maladie humaine continue de croître, tout comme l'éventail des présentations cliniques associées à ces bactéries.

Ce sont de petits bacilles à Gram négatif difficiles à mettre en évidence au Gram, auquel on préfère la coloration de Gimenez.

Ce sont des bactéries parasites des hémties, capables de se multiplier dans des cellules et hors de celles-ci.

III.5.2. Habitat et aspects cliniques

Le réservoir des bartonelles est variable. Ainsi pour *B. henselae,* c'est le chat et, notamment, les chatons âgés de moins de un an. D'autres réservoirs ont été individualisés selon l'espèce tels homme, lapin, rongeur, chevreuil, bovin.

Bartonella bacilliformis était la seule espèce reconnue dans le genre jusqu'en 1993. Elle est responsable d'une speticimie avec hémolyse (fièvre d'Oroya) correspondant à la phase d'invasionet aigue suivi d'une phase latent avec tumeurs cutanées rougeatres et friablles (verruga peruana). Ces affections sevissent au Perou et en Colombie (liée à l'habitat de son vecteur, mouche des sables, *Lutzomyia verrucarum*). ***B. henselae*** est impliquée dans la **maladie des griffes du chat**.

Après contact et le plus souvent après morsure ou griffure de chat, on peut observer la « maladie des griffes du chat ». Il s'agit d'une infection bénigne caractérisée par une pustule ou une papule au site d'inoculation, survenant 4 à 6 jours après griffure ou morsure, rapidement suivie d'une adénopathie associée ou non à d'autres manifestations telles que fièvre, fatigue, malaise, splénomégalie.

B. henselae peut aussi être retrouvée dans la neurorétinite, angiomatoses bacillaire, péliose, septicémie, endocardite, myocardite.

B. quintana est responsable de la fièvre des tranchées, endocardite, pericardite (SDF), angiomatose bacillaire, péliose, adénopathie chronique.

***B. elisabethae*:** endocardite

B. grahamii: neurorétinite

B. vinsonii subsp berkhoffii: endocardite

***B. vinsonii subsp arupensis*:** endocardite

B. koehlerae: endocardite

B. alsatica: endocardite

B. washoensis: myocardite

III.5.3. Diagnostic direct

- **Prélèvement**

Il s'agit le plus souvent de prélèvements (biopsies de ganglions, foie, peau, moelle osseuse) de patients présentant une maladie des griffes du chat, voire par hémoculture. Le sang peut être prélevé par le système de centrifugation-lyse avant de procéder à la mise en culture du culot.

- **Culture**

L'isolement par culture se pratique sur gélose au sang frais ou cuit incubée pendant 4 semaines aumoins sous 5 % de CO_2. La température optimale de croissance est 37 °C. Les colonies sont petites (< 1 mm), blanches et sèches ; elles s'enfoncent dans la gélose (Fig.30).
B. henselae est un bacille à Gram négatif de 0,5 à 0,6 μm × 1,0 à 2,0 μm légèrement incurvé et immobile. *B. henselae* apparait oxydase, catalase, uréase et indole négatifs, et présente une faible activité métabolique.

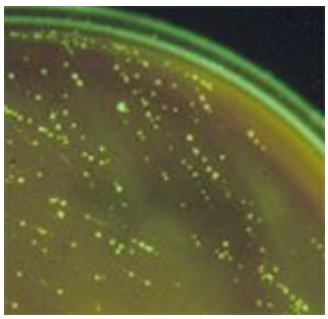

Figure 30 : culture de *B. henselae* sur gélose au sang

- **Diagnostic moléculaire**

En prarique, ce sont les outils de biologie moléculaire qui apportent l'identification de certitude. Elles sont utiles quand elles sont appliquées à des ganglions, des fragments de tissu ou de pus. Plusierus cibles peuvent etre utilisées (gène de la citrate synthétase ou sous-unité 16S de l'ARN ribosomal).

Une PCR permet un diagnostic rapide sur tissus (ganglion, peau, valve, etc.) (tableau XXI).

Tableau XXI : Les différentes approches dans le diagnostic des infections à *Bartonella*.

Entité clinique	PCR	Culture		Anatomopathologie	Sérologie
		Tissus	Sang		
Maladies des griffes du chat	++[a]	+ /-	-	+++[a]	+++
Angiomatose bacillaire	+++[b]	++[b]	+++	++[b]	+ /-
Endocardite	+[c]	++[c]	++	-	+++
a Ganglion ; b Lésions cutanées ; c Valve cardiaque.					

III.5.4. Diagnostic indirect

La sérologie par immunofluorescence indirecte est un bon outil en particulier pour la maladie des griffes du chat, les endocardites.

Des taux d'IgG ≥ 1:100 en immunofluorescence indirecte (IFI) sont significatifs pour la maladie des griffes du chat et ≥ 1:800 pour une endocardite.

III.6. *Brucella*

III.6.1. Généralités

C'est D. Bruce, médecin britannique, qui a isolé à Malte en 1887 la bactérie responsable de la « fièvre méditerranéenne » encore appelée fièvre de Malte, fièvre ondulante, ou mélitococcie. *Brucella* spp. sont des bactéries intracellulaires facultatives, agents d'avortements épizootiques chez plusieurs animaux notamment d'élevage et des maladies fébriles bactériémiques (fièvre de Malte) ou d'infections focalisées chez l'homme.

Ce sont des coccobacilles (0,5 à 1,5 µm de long) à Gram négatif, aérobies stricts, immobiles, ne formant pas de spore ni de capsule, catalase positive, oxydase habituellement positive. La plupart des souches isolées en pathologie humaine produisent une uréase d'action rapide et intense.

Les bactéries peuvent persister dans l'environnement pendant une longue période (semaines ou mois). Elles sont cependant sensibles aux désinfectants les plus couramment utilisés, à la pasteurisation, au chauffage et aux rayonnements ionisants.

III.6.2. Habitat et pouvoir pathogène

Le genre *Brucella* appartient à la famille des *Brucellaceae*. Actuellement, ce genre regroupe 11 espèces dont 4 espèces sont pathogènes pour l'homme: *B. melitensis* (transmise surtout par les caprins et les ovins), *B. abortus* (bovins), *B. suis* (biovars 1, 3 et 4) (porcins) et *B. canis* (canins).

La brucellose est une maladie zoonotique dont la source d'infection humaine naturelle est les animaux infectés.

La contamination humaine peut se faire soit par voie cutanéo-muqueuse (contact avec un animal infecté ou un objet contaminé: maladie professionelle) soit par voie digestive (ingestion d'aliments contaminés tels produits lactés, fromages...), par inhalation de poussière ou d'aérosol de litière ou lors de manipulation dans les laboratoires representent une des sources majeures d'infection.

Après une incubation d'une période variable (quelques jours à plusieurs semaines), la maladie se manifeste dans **sa phase aigue** par une fièvre élevée, permanente ou ondulante et un sepsis. Des sueurs nocturnes, des myalgies et des arthralgies (fievre de Malte) peuvent etre observées. Cet etat septique s'attenue ou disparait spontanement en 2 à 3 semaines. En l'absence de diagnostic et de traitement adéquat, la plupart des patients évoluent vers une **phase subaiguë**,

avec une bactériémie intermittente et de possibles localisations secondaires (surtout ostéoarticulaires, plus rarement neurologiques, cardiaques, hépatospléniques, ou génitales).
La maladie peut ensuite persister plusieurs mois, voire des années, sous formes chroniques avec ou sans découverte d'un foyer infectieux.

Brucella est un pathogène de classe III, considéré comme un agent potentiel du biotérrorisme.

La brucellose animale est est essentiellement une maladie de la reproduction:
- chez le mâle; épididymites, orchites, stérilité
- chez la femelle: atteinte de l'utérus, infection du foetus et avortement.

III.6.2. Diagnostic bactériologique

III.6.2.1. Diagnostic direct

II est indispensable que le clinicien précise au laboratoire qu'il demande une recherche de *Brucella* pour que les conditions de culture et de sécurités particulières soient mises en œuvre.

- **Prélèvements**

Les hémocultures sont le prélèvement de choix pour l'isolement des *Brucella* lors de la phase aigue (bactériémie constante). Lors de la phase subaigue, la myéloculture (mise en culture de moelle osseuse), les ponctions de liquide céphalorachidien, de ganglion ou de liquide articulaire peuvent aider au diagnostic.

Lorsque les cultures sont négatives ou non réalisées, un prélèvement sanguin permet d'effectuer les sérologies.
Le transport des prélèvements vers le laboratoire doit être rapide.

- **Culture**

Les bactéries du genre *Brucella* sont exigentes, de croissance lente, nécessitant l'utilisation de milieux gélosés riches (gélose au sang frais, gélose au sang cuit avec facteurs de croissance). L'incubation est en général entre à 35 à 37 °C, en atmosphère contenant 5 % de CO_2, pendant 3 à 4 semaines. Certaines souches (*B. abortus*, *B. ovis*) se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10 % de CO_2.

Les colonies sont très fines, de 0,5 mm de diamètre, transparentes, légèrement bleutées, bombées à bord régulier et non hémolytiques (Fig. 31).

Figure 31 : Colonies de *Brucella* spp.

Au cours de la brucellose, l'hémoculture est constamment positive pendant la phase aiguë, fréquemment positive pendant la phase subaiguë, exceptionnellement positive pendant la phase chronique.

- **Diagnostic d'espèce**

Le diagnostic d'espèce relève le plus souvent d'un laboratoire de référence.

Les *Brucella* spp. sont aérobies strictes et ont une catalase + et une oxydase + (sauf *B. ovis* et *B. neotomae*) (tableau XXII). Ces bacteries ne fermentent pas les sucres. La majorité des autres caractères métaboliques sont négatifs : production d'indole, réaction de Voges-Proskauer, citrate de Simmons, etc. En revanche, les *Brucella* spp. ont une nitrate réductase +, sauf *B. ovis*.

Tableau XXII: Différenciation des espèces de *Brucella*

	B. melitensis	*B. suis*	*B. abortus*	*B. canis*	*B. neotomae*	*B. ovis*
Oxydase	+	+	+	+	–	–
Exigence en CO_2	–	–	+[a]	–	–	+
Production d'H_2S	–	+++ (1–6 j)	+[b](2–5 j)	–	+	–
Hydrolyse de l'urée	>90 min	<90 min	>90 min	<90 min	>90 min	–
a: sauf bv 5, 6, 9; b: sauf bv 5						

- **Diagnostic génomique**

La biologie moléculaire est particulièrement utile dans le cas où l'administration d'une antibiothérapie empirique empêche l'isolement de *Brucella*. L'amplification peut s'effectuer à partir du sang ou du sérum, mais aussi dans diverses suppurations ou biopsies tissulaires.

Les techniques moléculaires ciblent habituellement le gène codant pour une protéine de surface Bscp31.

La séquence d'insertion *IS*711 est une bonne cible fréquemment utilisée car elle est spécifique de *Brucella* et présente en multiples copies dans le génome.

Une PCR multiplex (Bruce-Ladder) mise au point permet ainsi l'identification de toutes les espèces isolées aussi bien chez l'homme que chez les animaux.

III.6.2.2. Sérodiagnostic

La sérologie n'est utile que lorsque la culture bactérienne est négative ou non réalisée. Les tests sérologiques détectent principalement les anticorps anti-LPS.

Elle nécessite l'utilisation de plusieurs techniques, et pose le problème de manque de spécificité. En effet, il existe de nombreuses reactions sérologiques croisées, en particulier entre *Brucella spp.* et *Yersinia enterocolitica*.

III.7. *Legionella*

III.7.1. Généralités

A l'occasion du 58ème congrés de "l' American legion" en 1976 à l'hotel en Philadelphie-USA, 182 des 4400 participants étaient atteints d'une pneumopathie aigue febrile (29 décés). Ce n'est qu'on 1977 que la bactérie fut isolée par Mac Dad et Shepard. La pathologie est nommée la maladie du legionnaire et la bactéries *Legionella pneumophila.*

Ces gammaprotéobactéries appartiennent à l'ordre des *Legionellales* qui comprend également les genres *Rickettsiella* et *Coxiella*. *Legionella* est l'unique genre de la famille des *Legionellaceae.* Ce genre regroupe plus de 60 espèces.

Ces bacilles ont une taille comprise entre 0,3 et 0,4µm de largeur et entre 2 et 4µm de longueur. Parfois, des formes filamenteuses plus grandes allant jusqu'à 50µm de longueur peuvent être observées. Cette bactérie aérobie ne forme pas de spores ni de capsule, mobile grâce à un ou plusieurs flagelles.

Cette bactérie intracellulaire facultative a acquis la capacité de survivre et de se répliquer dans des cellules humaines.

III.7.2. Habitat et pouvoir pathogène

Les *Legionella* sont ubiquitaires dans les environnements hydrotelluriques tels que l'eau et les sols humides. Elles sont principalement présentes dans les réservoirs naturels d'eau comme les lacs rivières, étangs, flaques, etc. La concentration bactérienne dans ces environnements est faible, ce qui limite le risque pour l'homme. Les facteurs de risquesprincipaux sont le tabac, l'immunodépression et l'âge avancé.

Les infections sont souvent liées à des écosystèmes artificiels au sein desquels la bactérie trouve les conditions idéales à sa prolifération. Ainsi, les sources les plus fréquemment retrouvées sont les tours aéroréfrigérantes, les chauffe-eaux, les systèmes de distribution d'eau potable avec stagnation (bras morts, réservoirs), les bains bouillonnants, les piscines thermales, les fontaines décoratives, etc.

Parmi les 60 espèces et 80 sérogroupes de *Legionella* décrits, *L. pneumophila* le sérogroupe 1 est responsable de la grande majorité des cas de légionelloses. D'autres espèces de *Legionella* peuvent également être impliquées en clinique, mais elles concernent surtout des patients immunodéprimés. On retrouve principalement les espèces *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feelei*, *L. wadsworthii* et *L. anisa*.

La légionellose, contractée suite à l'inhalation de gouttelettes d'eau contaminées, existe sous 3 formes cliniques.

La maladie des légionnaires ou légionellose est caractérisée par une pneumonie aiguë. Après une période d'incubation de 2 à 10 jours, les patients présentent un syndrome pseudogrippal avec une fièvre, une toux sèche, des céphalées, des myalgies, de l'anorexie. A la phase d'état, le tableau associe une fièvre élevée, une dyspnée et une toux importante pouvant s'accompagner d'expectorations. La pneumonie est souvent associée à des signes digestifs à type de diarrhée ou à des signes confusionnels. Elle peut s'accompagner dans les formes sévères de signes de défaillance multiviscérale. La mortalité est d'environ 20%.

La fièvre de Pontiac est un syndrome pseudogrippal sans pneumonie après une période d'incubation d'un à deux jours. La guérison est spontanée en quelques jours et peut passer inaperçue. Le diagnostic est principalement rétrospectif grâce à la sérologie. Les antigènes urinaires peuvent se positiver.

Les formes extrapulmonaires sont rares et apparaissent surtout chez des patients immunodéprimés. Le coeur est le site extrapulmonaire le plus fréquemment touché avec des manifestations sous forme de myocardite, péricardite ou endocardite sur valve prothétique. D'autres formes ont été décrites : neurologiques, digestives, rénales, musculaires, cutanées ou articulaires.

III.7.3. Physiopathologie

Legionella est une bactérie dont les réservoirs naturels sont les lacs et cours d'eau où elle se réplique à l'intérieur d'amibes vivant dans le même environnement. Une température entre 25 et 40°C et la présence d'un biofilm contenant différents microorganisms comme les amibes sont des facteurs favorisant l'augmentation de la densité de bactérie dans le milieu. Elle peut infecter accidentellement l'homme en se multipliant dans les macrophages alvéolaires suite à l'inhalation de microgouttelettes d'eau contaminées, entraînant une légionellose. La capacité de *Legionella* à infecter ses cellules hôtes, amibes ou macrophages, est dépendante du système de sécrétion de type IV (SST4). Ce dernier, principal facteur de virulence de la bactérie, favorise l'entrée dans la cellule hôte par phagocytose, la formation d'une vacuole en recrutant des vésicules du réticulum endoplasmique, et l'échappement de la fusion phagosome-lysosome. Une fois phagocytée, et internalisée dans la vacuole protectrice, *Legionella* adopte sa forme replicative (phénotype non virulent, absence de flagelle). Une fois la phase de réplication terminée, le manque de nutriment induit sa transformation en une forme infectieuse, elle devient mobile et résistante au stress extérieur via l'expression de facteurs de virulence. La bactérie se retrouve libre dans le cytoplasme et va induire une lyse de la cellule hôte via la formation de pores.

III.7.4. Diagnostic biologique

Les critères de déclaration consistent en une pneumopathie associée à au moins un des résultats suivants :

Cas confirmé :

- isolement de *Legionella* dans un prélèvement bronchique
- et/ou augmentation du titre d'anticorps (x 4) avec un deuxieme titre minimum de 128
- et/ou presence d'antigene soluble urinaire
- et/ou immunofluorescence directe positive.

Cas probable :

- titre unique d'anticorps élevé (≥ 256).
- PCR positive.

III.7.4.1. Prélèvements et transport

- **Recherche d'antigènes urinaires**

  Dix millilitres d'urines fraichement émises sont recueillis dans un flacon stérile et acheminées rapidement au laboratoire à température ambiante. Les antigènes sont stables pendant 1 mois à température ambiante ou au moins 6 mois à + 4°C ou à -20°C.

- **Prélèvements pour culture**

  Les principaux prélèvements ensemencés pour la culture sont : les expectorations sur les lavages broncho-alvéolaires, les aspirations trachéale ou bronchique. D'autres prélèvements peuvent être réalisés : des biopsies pulmonaires, des culots de centrifugation de liquide pleural, des hémocultures, des fragments d'organes divers.

III.7.4.2. Examen direct

Legionella spp. est très difficilement visible à l'examen direct en coloration de Gram. Il faut que l'inoculum bactérien soit important et il est nécessaire d'utiliser un microscope à fluorescence. Elle se présente comme un bacilli pléiomorphe, faiblement négatif à la coloration de Gram.

III.7.4.3. Recherche d'antigènes urinaires

La détection des antigènes urinaires représente le test de diagnostic de première ligne, par sa rapidité, sa précocité et sa simplicité de réalisation.

Les tests les plus couramment utilisés, pour la detection de *L. pneumophila* sérogroupe 1, sont fondés sur des techniques d'immunochromatographie sur membrane (révélation colorimetrique ou fluorescence) ou par méthode ELISA. Ils permettent ainsi de poser un diagnostic dans un délai compris entre 15 minutes et 4 heures. L'antigène mis en evidence est un polysacchaide d'environ 10kDa.

Deux prétraitements avant analyse peuvent être requis. Pour certains réactifs, une concentration des urines avant analyse est fortement recommandée, cette concentration peut être réalisée par ultrafiltration par centrifugation. Pour toute urine détectée positive, il est recommandé de tester une seconde fois les urines après chauffage pendant 5 minutes à 100°C pour éliminer les protéines de l'échantillon et améliorer la réaction d'agglutination.

III.7.4.4. Amplification génique

La PCR est réalisée sur des prélèvements pulmonaires. Elle peut également être réalisée sur sérum ou sur sang total (prélevé sur EDTA), mais ne doit pas être privilégiée du fait de sa moindre sensibilité. La PCR n'est pas recommandée sur urines (faible sensibilité). Il existe des réactifs commercialises dont les principaux gènes cibles des PCR sont, pour *Legionella* spp., l'ARN ribosomal 5S ou 16S, l'espace intergénique 23S–5S et, pour *Legionella pneumophila*, le gène *mip* (*macrophage infectiosity potentiator*).

III.7.4.5. Culture

Devant tout antigénurie positive, il est recommandé de réaliser un prélèvement pulmonaire. La stratégie de mise en culture des prélèvements est représentée dans la figure 32.

Prétraitement de l'échantillon

- Si le prélèvement est très fluide ou en quantité importante, une concentration par centrifugation est nécessaire.
- S'il s'agit d'un prélèvement épais ou d'une expectoration, les échantillons épais doivent être fluidifies par un agent mucolytique (dithiothreitol ou N-acetyl-cysteine). Il est préférable de réaliser ensuite un lavage, pour éliminer ces fluidifiants.
- Les échantillons respiratoires contaminées par la flore oropharyngée, une décontamination est efectuée avant ensemencement :

- Acidification : traitement du prélèvement volume à volume par une solution tampon de pH = 2, pendant 5 à 15 minutes à température ambiante. Une neutralisation de l'acidité n'est pas nécessaire avant ensemencement ;
- Et/ou traitement par la chaleur : chauffer le prélèvement 30 minutes à 50 °C.

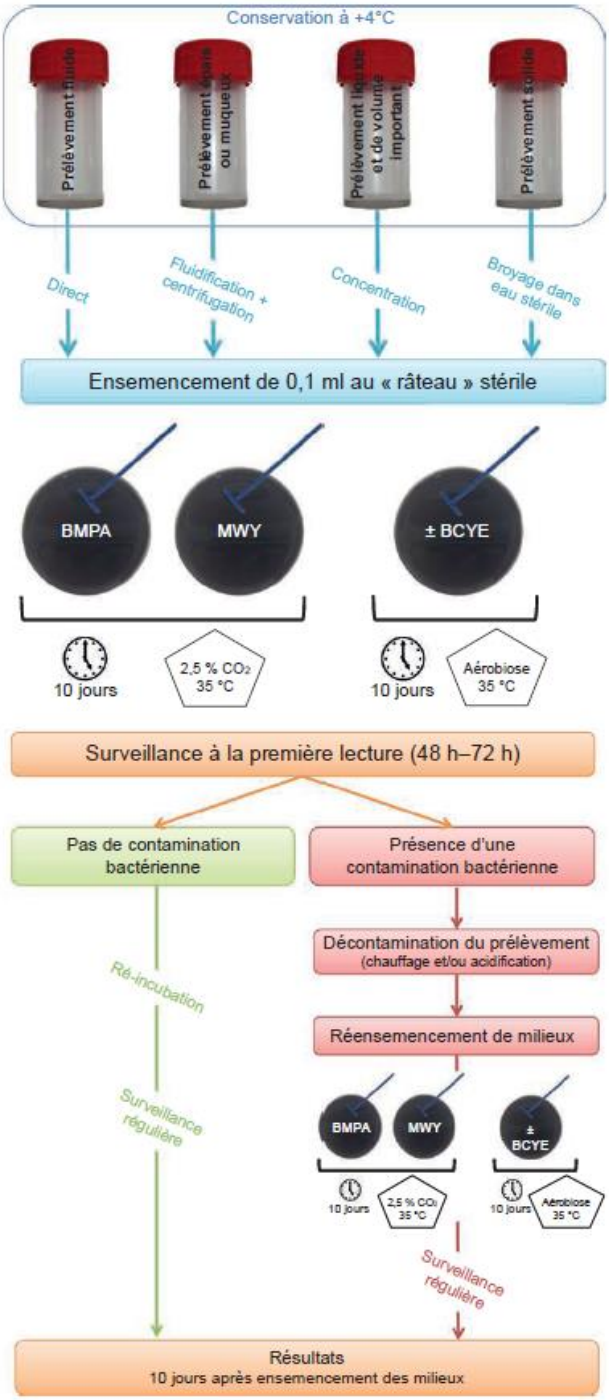

Figure 32 : Mise en culture d'un prélèvement pour recherche de *Legionella*.

Culture et identification

Le milieu de base est la gélose BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) contenant de l'extrait de levure, de la cysteine, du pyrophosphate de fer et du charbon. Ce milieu supplémenté par 0,1 % d'alpha-cétoglutarate (BCYEα) et tamponné à 6,9 par du tampon ACES constitue le milieu de choix pour la culture de *Legionella*.

L'utilisation d'une gélose sélective par l'ajout d'antibiotiques et/ou d'antifongiques est recommandée pour les prélèvements contaminés :

- ✓ **Milieu BMPA** : milieu BCYE additionné de céfamandole, polymyxine B et anisomycine,
- ✓ **Milieu GVPC :** milieu BCYE additionné de glycine, alpha-cétoglutarate, vancomycine, cycloheximide et polymyxine B
- ✓ **Milieu MWY :** milieu BCYE additionné de glycine, polymyxine B, anisomycine et vancomycine.

Il est recommandé d'ensemencer 100 µl de prélèvement puis de réaliser un étalement sur chaque milieu approprié :

- Milieu avec un antibiotique de type BMPA ou MWY, ou à défaut, GVPC ;
- Milieu BCYE non séléctif ;
- Gélose au sang comme contrôle.

Les géloses doivent etre incubées en atmosphère humide, aérobie ou sous 2,5 % de CO_2, à 35 °C. Les cultures seront examinées à 3 jours, 5 jours et 10 jours après l'ensemencement.

Le délai d'obtention des colonies de *Legionella* en primoculture est long, minimum 72 heures. Les colonies evocatrices de *Legionella* sont petites, avec un aspect translucide typique dit en ≪ verre fritté ≫ quand elles sont observées à la loupe binoculaire (Fig. 33).

Après repiquage sur BCYE avec et sans cysteine et/ou sur gélose au sang, une croissance sur milieu avec cysteine (BCYE, BMPA, MWY, GVPC) associée à une absence de culture sur milieu sans cysteine (BCYE sans cysteine ou gélose au sang) permettra une identification en faveur d'une *Legionella*.

La biologie moléculaire (le gène *mip*), la MALDI-TOF ou des tests sérologiques, seront alors utilisés pour confirmer l'appartenance au genre *Legionella* et identifier l'espèce et/ou le sérogroupe.

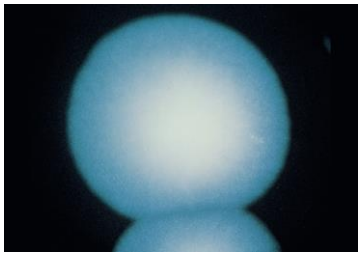

Figure 33 : Aspect des colonies de *Legionella* à la loupe binoculaire (grossissement × 30)

IV. Bacilles à Gram négatif Microaérophiles

IV.1. *Campylobacter*

IV.1.1. Généralités

En 1913 un bacille mobile, vibrio-like, a été rendu responsable d'avortements épizootiques ches les bovidés. Ce bacille a été désigné comme *Vibrio fetus* par Smith et Taylor (U.S.A.) en 1919. En 1949, un bactériologiste français, Vinzent, a rapporté le premier cas d'infection humaine à *Vibrio fetus.*

Les *Campylobacter* ont été individualises en 1963 par leur GC % (29 à 38 %) très inferieur à celui des *Vibrio* (40 à 52 %) par Sébald et Veron qui ont proposé ce genre nouveau.

Les *Campylobacter* sont considérés comme étant la principale cause bactérienne de gastro-entérites dans le monde.

Les *Campylobacter* sont des bacilles à Gram négatif fins, de 0,5 à 5 µm de long, incurvés en forme de virgule, en forme de S, de « vol de mouette » ou de forme hélicoïdale pour les formes longues (Fig. 34). Ces bactéries sont mobiles par une ciliature polaire monotriche (vol de moucheron). Leur métabolisme respiratoire est microaérophile. Ainsi, les conditions idéales pour la croissance des *C. jejuni* et *C. coli* sont 5 % d'O_2, 10 % de CO_2 et 85 % de diazote (N_2).

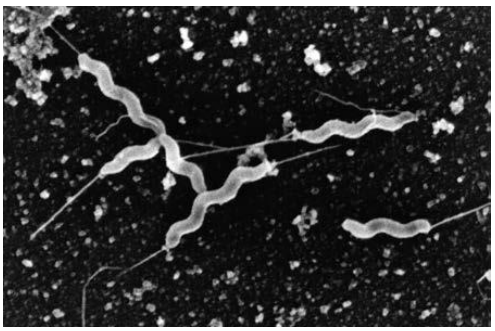

Figure 34 : Vue en microscopie électronique à balayage de *C. jejuni*

Le genre *Campylobacter* contient 45 espèces et certaines inluant des sous-espèces. Les bactéries du genre *Campylobacter* appartiennent à la classe des *Epsilonproteobacteria*, à l'ordre des *Campylobacterales*, et à la famille *Campylobacteriaceae*. Les principales espèces sont *C. jejuni* et *C. coli*, responsables d'entérites, et *C. fetus*, responsable de septicémies chez l'immunodéprimé.

IV.1.2. Habitat et pathologies associées

Les oiseaux sauvages et domestiques constituent le principal réservoir de la bactérie. La température corporelle des oiseaux est comprise entre 40 et 42°C, température optimale pour la

croissance des espèces thermotolérantes *C. jejuni* et *C. coli* et compatible avec le portage la bactérie au niveau intestinal et à de fortes concentrations (jusqu'à 10^9 UFC/g de fèces) chez ces animaux. Les bactéries du genre *Campylobacter* peuvent infecter de nombreuses autres espèces animales d'élevage incluant les bovins, les caprins, les ovins et les porcins. Les oiseaux et mammifères sauvages ainsi que les animaux de compagnie peuvent également être contaminés par la bactérie.

Selon les études, 40 à 80 % des carcasses de poulet à la distribution sont contaminées. *Campylobacter* ne peut se multiplier dans les aliments à la différence des *Salmonella*. La transmission est essentiellement d'origine alimentaire mais du fait qu'il ne se multiplie pas dans les aliments, il est rarement à l'origine d'épidémie.

La source principale est constituée par la volaille crue introduite dans la cuisine et à partir de laquelle des contaminations croisées sont possibles. Toute volaille peut être considérée comme recouverte de Campylobacters.

L'ingestion de quelques centaines de bactéries suffit pour provoquer une campylobactériose dont les premiers symptômes apparaissent après une période d'incubation de 1 à 5 jours.

Les symptômes cliniques d'une infection **à *C. jejuni*** se caractérisent principalement par des crampes abdominales, de la fièvre, des diarrhées aqueuses souvent sanguinolentes, pouvant être parfois couplées à des maux de tête ou à des nausées. L'infection ne dure habituellement que quelques jours (7-10 jours) et se résorbe généralement de façon spontanée chez des patients immunocompétents. Cependant, dans quelques rares cas les campylobactérioses peuvent être à l'origine de complications post-infectieuses, dont le syndrome de Guillain-Barré est l'une des plus sévères.

Ce syndrome qui atteint le système nerveux périphérique, qui engendre une altération des gaines de myéline entourant les nerfs. Cette démyélinisation des nerfs serait due au mimétisme antigénique entre les lipooligosaccharides (LOS) de certaines souches de *C. jejuni* et les gangliosides humains, engendrant une réaction croisée des anticorps et du système immunitaire. Ce syndrome est grave et entraine souvent des séquelles neurologiques.

C. coli est à l'origine des mêmes manifestations cliniques que *C. jejuni*. L'intensité des signes cliniques est cependant moins importante.

Contrairement à *C. jejuni, C. fetus* est rarement à l'origine d'entérite. Il provoque le plus souvent des syndromes fébriles prolongés compliqués.

IV.1.3. Physiopathologie

En raison de leur grande mobilité les *Campylobacter* sont aptes à traverser le mucus. Ils peuvent pénétrer dans les entérocytes. Le caractère invasif de la bactérie (*C. jejuni*) se traduit par la présence de leucocytes et de sang dans les selles des malades. Des toxines ont été mises en évidence chez des souches de *C. jejuni.* L'une d'elles a des propriétés voisines de la toxine cholérique. Une autre toxine distendant le cytosquelette. *C. fetus* possède une microcapsule S qui le rend résistant à la phagocytose.

IV.1.4. Diagnostic bactériologique

IV.1.4.1. Diagnostic direct

- **Prélèvement**

Campylobacter fait partie des bactéries à rechercher systématiquent lors d'une coproculture. Leur recherche se fait souvent sur un échantillon de selles ou sur le produit d'un écouvillonnage rectal. Les *Campylobacter* sont sensibles à la dessiccation, l'écouvillon alors doit etre ensemencé immédiatement ou conservé en milieu de transport (Cary-Blair 1,6 % agar, 4 °C).

D'une mnière fortuite, ces bactéries peuvent etre isolées dans d'autres prèlevements tels que l'hémoculture.

- **Examen direct**

Un examen direct entre lame et lamelle, permet de mettre en evidence des bacilles très mobiles en « vol de moucheron ». L'examen d'un frottis permet de mettre en évidence, la présence de polynucléaires et d'hématies et d'une population monomorphe de bacilles incurvés à Gram négatif.

- **Recherche de *Campylobacter* dans les selles par méthode immunologique et moléculaire**

Plusieurs trousses de détection d'antigènes spécifiques de *Campylobacter* dans les selles ont été récemment mises sur le marché (Fig. 35). Leur inconvinient est d'être limité à la rechcerche de *C. jejuni* et *C. coli.*

Figure 35 : Exemple de kit de détection rapide de *Campylobacter* sur selle

Des trousses sont également commercialisées pour détecter *Campylobacter* dans les selles par PCR temps réel.

- **Culture**

La culture est effectuée sur un milieu riche (sang), sélectif (antibiotiques : deux à trois antibiotiques parmi les suivants sont utilisés : triméthoprime, polymyxine, vancomycine, colistine, bacitracine, amphotéricine B, céfalotine, céfopérazone, rifampicine, actidione) et qui absorbe les radicaux oxygénés libres toxiques. Les exemples de milieux utilisés contenant du sang (Skirrow, Butzler) ou du charbon (Karmali).

Des milieux prêts à l'emploi sont commercialisés chromogène ou non (Fig. 36).

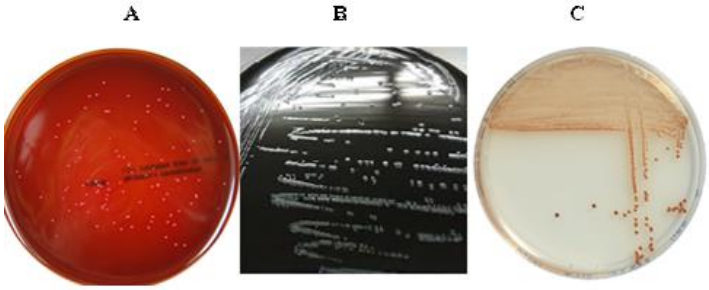

Figure 36 : Culture de *Campylobacter* sur gélose Skirrow (A), Karmali (B), sur gélose chromogène CampyFood (C).

Il est recommandé d'incuber les milieux au moins 48 heures en atmosphère microaérobie, de préférence à 35°C pour ne pas inhiber la croissance des espèces thermosensibles (bien que la majorité des souches de *Campylobacter* entéropathogènes soient thermorésistantes).

L'atmosphère microaérobie est obtenue en jarre étanche à l'aide de générateurs chimiques de gaz exempts d'hydrogène et consommant une partie de l'oxygène de l'enceinte (Fig. 37). Une incubation prolongée de 5 à 8 jours est parfois nécessaire.

Figure 37 : Jarre utilisée pour la création de l'atmosphère de microaérobie

La culture se traduit par de petites colonies lisses, luisantes. L'identification au niveau du genre est basée sur la morphologie particulière et des tests d'orientation simples comme l'oxydase qui est positive. L'identification au niveau de l'espèce peut être réalisée par quelques tests phénotypiques tels que l'hydrolyse de l'hippurate, la sensibilité aux antibiotiques, la culture à 25°C, la recherche d'une activité catalasique (tableau XXIII).

Les spectromètres de masse MALDI-TOF sont très performants pour identifier les différentes espèces de *Campylobacter*.

Tableau XXIII: Caractères d'identification des différentes espèces de *Campylobacter*

		Campylobacter jejuni subsp jejuni	***Campylobacter jejuni subsp doylei***	***Campylobacter coli***	***Campylobacter fetus subsp veneralis***	***Campylobacter fetus subsp fetus***
Catalase		+	+f/–	+	+	+
croissance	**25°C**	–	–	–	+	+
	42°C	+	–	+	–	–
Indoxyl acetate estérase		+	V	+	–	–
Uréase		–	–	–	–	–
Hippurate		+	V	–	–	–
Céfalotine		R	S	R	S	S
Acide nalidixique		S	S	S	R	R
Nitrate réductase		+	–	+	+	+
H_2S sur TSI		–	–	+f	–	–
S : sensible; R : résistant; V : variable; f : faible.						

IV.1.4.2. Diagnostic indirect

La sérologie n'a d'intérêt que dans les pathologies post-infectieuses comme l'arthrite réactionnelle et le syndrome de Guillain-Barre. Elle peut se faire par la réaction de fixation du complément ou par ELISA.

IV.2. *Helicobacter pylori*

IV.2.1. Généralités

En 1875, des scientifiques allemands découvrirent une bactérie hélicoïdale dans des estomacs humains. Celle-ci ne pouvant être cultivée, les recherches la concernant furent finalement abandonnées. Cette bactérie fut redécouverte en 1982 par deux chercheurs australiens, J. Robin Warren (pathologiste) et Barry J. Marshall (gastroentérologue). Elle fut alors assimilée au genre *Campylobacter* sur la base de sa morphologie spiralée et de la présence de flagelles engainés. L'intérêt des médecins pour l'infection à *H. pylori* a connu un développement majeur dans les années suivantes, après la démonstration par B. Marshall du rôle direct de cette infection dans l'apparition d'une gastrite. Cette découverte leur valut le prix Nobel 2005 de physiologie et de médecine.

Helicobacter pylori est une bactérie pathogène spiralée (Fig. 38), mobile, non sporulante, microaérophile à Gram négatif de 0,5 à 0,9 µm de large sur 2 à 4 µm de long, appartenant à la classe des ε-Proteobacteria et l'ordre des *Campylobacterales* et à la famille des *Helicobactereaceae*. Cette bactérie est extrêmement mobile grâce à la présence de 2 à 6 flagelles polaires engaînés, lui permettant d'atteindre la couche de mucus protégeant la muqueuse gastrique et d'entrer en contact avec les cellules de l'épithélium gastrique. Ces flagelles sont indispensables à la mobilité et à la capacité de colonisation de la bactérie. *H. pylori* est capable de résister aux conditions d'acidité extrême de l'environnement gastrique grâce à la présence d'une uréase active.

Figure 38: *Helicobacter pylori* sur les cellules de l'estomac.

IV.2.2. Habitat et pouvoir pathogène

L'homme est le seul réservoir connu de *H. pylori.* Les rares animaux chez qui *H. pylori* a pu être isolé sont des animaux vivant proches de l'homme et vraisemblablement contaminés à son contact. Il est généralement admis que l'acquisition survient pendant la petite enfance probablement via les membres proches de la famille. La transmission est strictement interhumaine. Trois voies de transmission sont suspectées : gastro-orale, oro-orale et féco-orale.

L'estomac de l'homme est le seul site ou *H. pylori* peut être isolé sous forme cultivable. *Helicobacter pylori* colonise l'estomac de la moitié de l'humanité. Elle est plus forte chez les personnes de bas niveau socio-économique.

Il est responsable de nombreuses pathologies gastroduodénales de la gastrite chronique aux ulcères gastriques et duodénaux jusqu'au cancer gastrique et au lymphome du MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*).

L'éradication de la bactérie de la muqueuse gastrique entraîne la guérison de la gastrite, des ulcères et de certains lymphomes du MALT, empêche les rechutes et prévient l'évolution vers le cancer gastrique. *H. pylori* est la seule bactérie responsable d'un cancer chez l'homme.

H. pylori est particulièrement bien adapté à la colonisation de la muqueuse gastrique grâce à de nombreux facteurs bactériens tels qu'une uréase et des flagelles. D'autres facteurs sont responsables d'une inflammation locale au site de colonisation tels que le lipopolysaccharide (LPS), des adhésines, un appareil de sécrétion de type IV (T4SS) et une cytotoxine vacuolisante (VacA).

La prédisposition génétique individuelle pourrait être le point central dans une variété de processus relatifs à la carcinogenèse gastrique. Le support génétique de cette susceptibilité serait représenté par certains polymorphismes de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire : gène de l'interleukine 8 (IL-8), de l'IL-1β et du TNFα.

IV.2.3. Diagnostic

Le diagnostic de l'infection à *H. pylori* est recommandé par les conférences de consensus dans les cas suivant :

- Suspicion de maladie ulcéreuse duodénale ou gastrique, ou de lymphome gastrique du MALT, de gastrite atrophique, de dyspepsie persistante, de lésions gastriques pré-néoplasiques, après chirurgie pour cancer de l'estomac ;
- Prévention des lésions induites par prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou d'aspirine au long cours ;
- Prévention du cancer gastrique en cas d'antécédent familial au premier degré, de chirurgie bariatrique par *by-pass* et de prise prolongée d'anti-sécrétoires ;
- Anémie ferriprive inexpliquée ;
- Carence inexpliquée en vitamine B12 ;
- Purpura thrombopénique chronique idiopathique.

Il existe deux approches diagnostiques : une **approche invasive** ayant recours à la fibroscopie gastrique avec biopsies et une **approche non invasive** regroupant les tests diagnostiques ne nécessitant pas de fibroscopie gastrique.

IV.2.3.1. Méthodes invasives

Ce sont des méthodes les plus sensibles et les plus spécifiques, nécessitant une biopsie de la muqueuse gastrique au cours d'un examen fibroscopique.

IV.2.3.1.1. Test à l'uréase

Cette méthode est adaptée à une recherche rapide en salle d'endoscopie dés obtention des biopsies. Ce test détecte *H. pylori* par son **activité uréasique** abondante (hydrolyse l'urée en ammoniaque).

Une biopsie est mise dans un milieu réactionnel d'une trousse commerciale (exemple CLOtest: Fig. 39). Une modification de la couleur de l'indicateur dans un délai de 60 minutes indique la présence de la bactérie. La sensibilité et la spécificité des différents tests commercialisés sont de l'ordre de 90 % chez des patients non traités.

Figure 39: Test de détection rapide sur biopsie de *H. pylori*

Ce test est contributif en cas de positivité précoce car il permet en salle d'endoscopie de conclure à la présence d'*H. pylori* et de mettre en route aussitôt un traitement d'éradication.

IV.2.3.1.2. Examen anatomopathologique

C'est la méthode de détection la plus utilisée. La sensibilité et la spécificité de cet examen sont supérieures à 95 %. La détection de la bactérie dépend de la densité bactérienne, du nombre (un minimum de cinq biopsies est nécessaire) et de la taille des biopsies, de la méthode de coloration et de l'expérience de l'anatomo-pathologiste. Les biopsies sont fixées par le formol assurant leur conservation à température ambiante lors de l'acheminement au laboratoire d'anatomopathologie.

Cette méthode permet l'examen de la gastrite constamment associée à *H. pylori* et la recherche de complications telles que l'atrophie, la métaplasie intestinale avec dysplasie, le lymphome ou le cancer.

IV.2.3.1.3. Examen bactériologique standard

La culture est la méthode diagnostique la plus spécifique. L'intérêt principal de la culture est la détermination de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques.

- **Prélèvement et transport**

Deux biopsies prises l'une dans l'antre et l'autre dans le fundus sont nécessaires. *H. pylori* est très sensible à la dessiccation. Les biopsies doivent alors être acheminées au laboratoire dans les 2 heures qui suivent le prélèvement dans 0,5 ml d'eau physiologique stérile. Si le transport au laboratoire est prolongé plusieurs heures, un milieu de transport doit être utilisé et transporté à 4 °C (bouillon Brucelle avec 20 % de glycérol, milieu de transport de Stuart, Portagerm® pylori). Si le délai de transport dépasse 24 heures, la biopsie doit être congelée dans un tube sec et acheminée en carboglace ou azote liquide.

Les biopsies doivent être broyées à l'aide d'un pilon (Fig. 40) ou bien dilacérées au scalpel dans une boîte de Petri stérile.

Figure 40: Broyeur de Potter

- **Recherche de l'activité uréasique**

Si l'activité uréasique n'a pas été recherchée au lit du malade, elle peut être effectuer au laboratoire en introduisant une partie du produit du broyage dans 100 µl de milieu urée-indole. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 2h.

- **Examen direct**

Le produit de broyage est étalé en frottis sur une lame et coloré par la méthode de Gram. *H. pylori* apparaît comme un bacille incurvé, ou spiralé, à Gram négatif.

- **Mise en culture**

Le produit de broyage ou de dilacération est ensemencé sur milieu constitué d'une base gélosée (milieu cœur-cervelle, *Brucella*, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton) additionnée de 10 % de sang de cheval ou de mouton. Des mélanges sélectifs peuvent être utilisés pour inhiber la croissance des contaminants occasionnels. Le mélange de Skirrow utilisé pour

l'isolement sélectif de *Campylobacter* est adapté à l'isolement sélectif d'*H. pylori* (vancomycine, 10 mg/l; triméthoprime, 5 mg/l; amphotéricine B, 2 mg/l; polymyxine, 2500 UI/l).

L'incubation des géloses est effectuée à 37 °C en atmosphère microaérobie (5 %) et humide. Cette atmosphère est obtenue dans une jarre étanche à l'aide de sachets générateurs d'atmosphère microaérobie (Campygen®, Oxoid).

En primoculture, les colonies n'apparaissent pas avant 3 jours. Ells doivent être incubées 10 jours avant d'être déclarées négatives. En subculture, la croissance est plus rapide, en 2 à 4 jours.

Les exigences culturales (microaérophilie, gélose au sang, milieu sélectif), l'aspect spiralé à l'observation microscopique après coloration de Gram d'une colonie étalée sur une lame permettent d'identifier *Helicobacter*. La présence d'une activité catalasique, oxydasique et uréasique forte permet l'identification de l'espèce *pylori*.

- **Détection moléculaire**

La PCR en temps réel permet de façon plus rapide que la culture la detection de la bactérie à partir d'une biopsie gastrique. De plus, grâce à la meilleure stabilité de l'ADN, le transport et la culture de *H. pylori* ne sont plus limitants. Des trousses commerciales sont disponibles et permet d'avoir un résultat en 2 à 4h.

Différentes régions de l'ADN génomique bactérien peuvent être ciblées par cette méthode diagnostique en utilisant pour leur amplification des amorces spécifiques des gènes codant pour l'uréase (*ureA* codant la sous-unité A de l'uréase), l'ARN ribosomal 16S ou encore la phosphoglucosamine mutase (*glmM*).

La PCR a l'énorme avantage d'apporter un résultat bien plus rapide que la culture souvent couplée à la détection des mutations conférant la résistance aux antibiotiques.

IV.2.3.2. Méthodes non invasives

Ces tests ne nécessitent pas la pratique d'une gastroscopie.

IV.2.3.2.1. Test respiratoire à l'urée marquée

Ce test détecte la présence d'*H. pylori* quelle que soit sa situation dans la cavité gastrique. Sa sensibilité dépasse 90 %. Il est basé sur l'activité uréasique de la bactérie.

En présence de *H. pylori*, l'ingestion d'urée marquée par un isotope non radioactif du carbone (^{13}**C**) est suivie du rejet de **CO_2 marqué** dans l'air expiré par le patient dont la quantité peut être mesurée (Fig. 41).

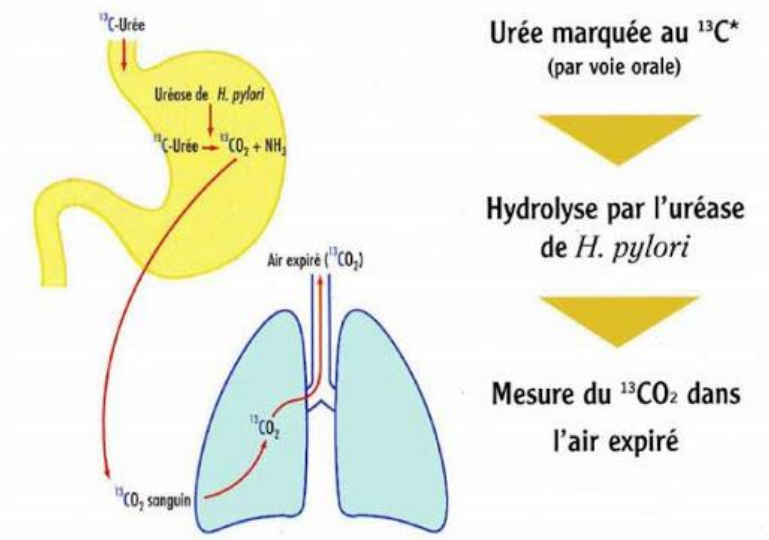

Figure 41 : Principe du test respiratoire à l'urée pour la détection de *H. pylori*

Ce test nécessite (exemple Helicobacter Test INFAI: Fig. 42) que les malades soient à jeun pour ingérer, 5 minutes avant l'urée marquée, une solution d'acide citrique (1 g à 1,4 g d'acide citrique dans 200 mL d'eau) afin de retarder la vidange gastrique. Le prélèvement peut être adressé au laboratoire sans condition particulière de transport.

Le test doit être réalisé avant tout traitement ou au moins 4 semaines après la fin d'un traitement antibiotique et à deux semaines de l'arrêt des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP). Ses performances sont excellentes pour contrôler l'éradication.

Figure 42: Test respiratoire de détection de *H. pylori*

IV.2.3.2.2. Détection des antigènes dans les selles

H. pylori est eliminé dans les selles sous forme non viable. Des antigènes spécifiques de cette bactéries peuvent être détectés par une technique ELISA ou immunochromatographique (exemple BIONEXIA H. pylori Ag : Fig. 43). Le plus pratique en utilisation clinique est le test immunochromatographique conditionné en tests unitaires et réalisé en 5 minutes.

Figure 43 : Test de détection des antigènes de *H. pylori* dans les selles

La sensibilité et la spécificité de ce test sont légèrement inférieures au test respiratoire. Ils sont recommandés pour le contrôle d'éradication quand le test respiratoire n'est pas disponible.

IV.2.3.3. Diagnostic indirect

De nombreuses trousses sont commercialisées. Seuls les tests ELISA évaluant le taux sérique des immunoglobulines G anti-*H. pylori* ont des résultats performants. Le taux des anticorps reste élevé pendant la durée de l'infection et diminue progressivement dans les 4 à 6 mois qui suivent la disparition de la bacterie. Du fait de ce délai, le test ne peut être utilise pour évaluer le résultat de l'éradication. La sérologie est peu coûteuse et facile à réaliser. Elle est recommandée dans les situations où les autres tests pourraient être faussement négatifs : ulcères hémorragiques, atrophie glandulaire, lymphome du MALT, utilisation récente d'antibiotiques ou d'IPP.

Références bibliographiques

1. Abdallah M., Benoliel, C., Drider D., Dhulster P. et Chihib N. E. 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology* 196 : 453–472.
2. Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. 1992. Bactériologie clinique. Ed. Ellipses, 2ème édition. 511p.
3. Benaibout M.K. 2006. *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme : Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'Homme par la contamination de l'environnement. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ENVT. 151 p.
4. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens:microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews, 9: 148-165.*
5. Bronowski C., James C.E., and Winstanley C. 2014. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters,* 356 : 8-19.
6. Brzuszkiewicz, E., A. Thürmer, J. Schuldes, A. Leimbach, H. Liesegang, F. D. Meyer, J. Boelter, H. Petersen, G. Gottschalk, and R. Daniel. 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic Escherichia coli (EAHEC). Archives of Microbiology. 193:883-891.
7. Cattan S., Thizy G., Michon A., Arlet J. B., Lanternier F., Lebeaux D., Jarraud S., Pouchot J., Lafonta E. 2019. Actualités sur les infections à *Legionella*. *La Revue de médecine interne*, 40 : 791–798.
8. Cros C. 2019. L'étude des antimicrobiens comme modulateurs du Système de Sécrétion de Type VI de *Vibrio cholerae.* Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences en microbiologie et immunologie. Université de Montréal. 221 p.
9. Croxen, M. A., R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodarska, and B. B. Finlay. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews. 26 :822-880.
10. Denis F. 2016. Bactériologie médicale : Techniques usuelles. 3ème édition. Ed. Elsevier Masson. 600p.
11. Dobrindt, U., F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch, and J. Hacker. 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *Journal of Bacteriology.* 185:1831-1840.
12. Dobrindt, U. 2005. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 295 :357-371.
13. Doganay M., Dinler-Doganay G., Ulu-Kilic A., and Ingram R. 2019. *Brucella:* Potential Biothreat Agent. In Defense Against Biological Attacks. Ed. Springer. Volume II. pp 139-159.
14. Dortet L, Legrand P, Soussy CJ, Cattoir V. 2006. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 4471-8.
15. Ducluzeau R., and P. Raibaud. 1985. Microbial ecology of the digestive system. *Revue internationale de physiobiologie et de pharmacologie appliquées aux effets de l'agression.* 26:161-163.

Références bibliographiques

16. Frank, C., D. Werber, J. P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. an der Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode, M. Wadl, A. Zoufaly, S. Jordan, M. J. Kemper, P. Follin, L. Müller, L. A. King, B. Rosner, U. Buchholz, K. Stark, G. Krause, and H. I. Team. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxinproducing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England Journal of Medecine.* 365 (19):1771-1780.

17. Godineau-Gautheyi N, Lesage D, Tessier F, Kollia D, Daguet GL. 1988. *Acinetobacter calcoaceticus* variété *Antitratus* ou *Acinetobacter baumannii*. Etude de la sensibilité aux antibiotiques de 65 souches hospitalières. *Médecine maladies infectieuses*, 2: 124-129.

18. González-Díaz A., Tubau F., Pinto M., Sierra Y., Cubero M., Càmara J., Ayats J., Bajanca-Lavado P., Ardanuy C. & Marti S. 2019. Identification of polysaccharide capsules among extensively drug-resistant genitourinary *Haemophilus parainfluenzae* isolates. Scientific Reports 9.

19. Grimont. F, Grimont P. A.D. 2002. Enterobacter In : Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (2éd, Vol 2 : The Proteobacteria, Partie B : The Gammaproteobacteria. Ed. Springer, pp : 661-671.

20. Guinée, P. A. M., W. H. Jansen, T. Wadström, and R. Sellwood. 1981. *Escherichia coli* Associated with Neonatal Diarrhoea in Piglets and Calves. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science.* 13:126-162.

21. Harris T. M., Price E.P., Sarovich D. S., Nørskov-Lauritsen n., Beissbarth J., Chang A. B., Smith-Vaughan H. C. 2020. Comparative genomic analysis identifies X-factor (haemin)-independent Haemophilus haemolyticus: a formal reclassification of 'Haemophilus intermedius' Microbial Genomics, 6.

22. Henry I. 2011. Epidémiologie analytique de *Salmonella subsp. enterica* et de *Campylobacter spp.* dans les élevages de poulets de chair à la Réunion. Investigation des sources infectieuses de *Salmonella subsp. enterica* de la production à la transformation. Thèse de doctorat. Université de la Réunion. 256p.

23. Hurtado G. 2016. Régulation de l'expression des fimbriae Pef et de l'invasine Rck par les nucléoprotéines H-NS, Hha et YdgT chez *Salmonella* Typhimurium. Thèse de doctorat. Université François – Rabelais de Tours. 317p.

24. Janda J. M. Sharon L. Abbott, McIver. C. J. 2016. *Plesiomonas shigelloides* Revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 29 : 349- 374.

25. Jneid B. 2016. Evaluation de l'effet protecteur de protéines du système de sécrétion de type III de bactéries entéropathogènes pour la vaccination et l'immunothérapie. Thèse de doctorat. Université PARIS-SACLAY. 208p.

26. Joly-Guillou, M. L. 2005. Clinical impact and pathogenicity of Acinetobacter. Clinical Microbiology and Infection, 11: 868-873.

27. Karmali M. A., V. Gannon and Sargeant J. M. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology.* 140 :360-370.

28. Kim Y., Bae I.K., Lee H., Jeong S.H., Yong D., and Lee K. 2014. In vivo emergence of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79:362–366

29. King L. A., Nogareda F., Weill F. X., Mariani-Kurkdjian P., Loukiadis E., Gault G., Jourdan-DaSilva N., Bingen E., Macé M., Thevenot D., Ong N., Castor C., Noël H., Van Cauteren D., M.Charron, V. Vaillant, B. Aldabe, V. Goulet, G. Delmas, E. Couturier, Y. Le Strat, C. Combe, Y.Delmas, F. Terrier, B. Vendrely, P. Rolland, and H. de Valk. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4

Références bibliographiques

associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. Clinical Infectious Diseases. 54 :1588-1594.

30. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. 2013. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front microbiology*, 16: 375.

31. Lehner A, Roger S., Fanning S. and Iversen C. 2011. Enterobacter In : Molecular detection of human bacterial pathogens. USA, CRC, pp : 853-863.

32. MacKenzie KD, Palmer MB, Koster WL, White AP.2017. Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic *Salmonella* Strains to Colonize Multiple Host Species. *Frontiers in Veterinary Science,* 4:138.

33. Mahon C. R., Lehman D. C., Manuselis G. 2015.Textbook of Diagnostic Microbiology. 5 eme edition. Ed. Elsevier. 1098p.

34. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. 2010. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of global infectious diseases,* 2: 291-304.

35. Marcos MA, Vila J, Jimenez de Anta MT. Epidemiology of infections caused by Acinetobacter baumannii. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1993;11: 450-4.

36. Mariani-Kurkdjian P., Bingen E., Gault G., Jourdan-da Silva N., Weill F. 2011. *Escherichia coli* O104:H4 south-west France. *The Lancet Infectious Diseases*; 11: 732-3.

37. Mariani-Kurkdjian P. et Bingen E. 2012. Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Réanimation*, 21: 268-279.

38. Mariani-Kurkdjian P. et Bonacorsi S. 2014. Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entéro-hémorragiques. *Feuillets de Biologie,* 317 : 41-42.

39. Marineli F, Tsoucalas G, Karamanou M, Androutsos G. 2013. Mary Mallon (1869-1938) and the history of typhoid fever. *Annals of Gastroenterology*, 26:132-134.

40. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews,* 37: 130-155.

41. Müller, D., L. Greune, G. Heusipp, H. Karch, A. Fruth, H. Tschäpe, and M. A. Schmidt. 2007. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 73 (10):3380-3390.

42. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews.* 11 (1):142-201.

43. Okaro U., Addisu A., Casanas B., Anderson B. 2017. Bartonella Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. Clinical Microbiology Reviews, 30 : 709-746.

44. Parsot C. 2005. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. FEMS Microbiology Letters 252 :11–18.

45. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews,* 21: 538-582.

46. Référentiel en microbiologie médicale: Société Française de Microbiologie. 2015. Tomes 2. 5e édition. 403p.

47. Russo TA, Johnson JR. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection,* 5: 449–456.

48. Smati, M., O. Clermont, A. Bleibtreu, F. Fourreau, A. David, A.-S. Daubie, C. Hignard, O. Loison, B. Picard, and E. Denamur. 2015. Quantitative analysis of

Références bibliographiques

commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *Microbiology Open*. 4 :604-615.

49. Tortora G.J., Funke B R., Case C. L. 2019. Microbiology an Introduction. 3eme édition. Ed. Pearson. 965p.

50. Tran Dien A. 2018. Génomique épidémiologique de *Salmonella*. Thèse de doctorat préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech). 211p.

51. Valenza G., Tuschak C., Nickel S., Krupa E., Lehner-Reindl V., Höller C. 2015. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of Pseudomonas aeruginosa as intestinal colonizer in the community. Infect. Dis. Lond. Engl. 47, 654–657.

52. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. ISME J. 2011;5: 173–183.

53. Waldor, Matthew K., & Mekalanos, J. J. 1996. Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*, 272 : 1910-1914.

Sites internet

- **http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/index.html**
- **https://www.sfmmicrobiologie.org/wpcontent/uploads/2019/07/BACTERIE_Pseudomonas.pdf**
- **http://www.microbes-edu.org**
- https://microbiologiemedicale.fr/gelose-yersinia-cin/
- http://www.eolabs.com/product/pp0110-campylobacter-selective-skirrow-agar/
- https://www.fishersci.ca/shop/products/thermo-scientific-remel-bordet-gengou-agar-with-blood-2/r01240